Wpływ nanocząstek na aktywność ludzkich neutrofili: analiza zdolności wytwarzania rodników tlenowych w obecności nanohydrokoloidów Ag i Cu

Effect of colloidal silver and copper nanoparticles on generation of radical oxygen species (ROS) in human neutrophils

Maja Kosecka-Strojek¹, Paweł Kaszycki², Kinga Regdos², Krzysztof Guzik³, Dariusz Ropek⁴, Jacek Międzobrodzki^{1*}

¹Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

²Zakład Biochemii, Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

³Zakład Immunologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

⁴Katedra Ochrony Środowiska Rolniczego, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Rosnąca skala praktycznego użycia nanocząstek srebra i miedzi, a zwłaszcza perspektywa wykorzystania tych nanostruktur do stosowania wewnątrzustrojowego, skłoniły nas do zbadania wpływu nanokoloidów Ag i Cu na potencjał fizjologiczny neutrofili, mierzony chemiluminometrycznie zdolnością do generowania rodników tlenowych, czyli do tzw. wybuchu tlenowego. Neutrofile inkubowane z nanokoloidami nie wykazywały podniesionej aktywności wytwarzania rodników tlenowych. Podczas aktywacji neutrofili stymulatorem wybuchu tlenowego (drobiny lateksu polistyrenowego), obecność nanostruktur Ag i Cu nie wpływała dodatkowo na aktywność fizjologiczną komórek, co dowodzi zarówno braku cytotoksyczności, jak i braku stymulacji metabolizmu neutrofili przez badane nanokoloidy.

Słowa kluczowe: nanokoloidy, nanomateriały, nanocząstki srebra, nanocząstki miedzi, neutrofile, chemiluminescencja, wybuch tlenowy

ABSTRACT

Introduction: Silver and copper nanoparticles (AgNPs, CuNPs) applied as hydronanocolloids are known to produce strong antibacterial and antifungal activities. They are extensively used in a number of applications including pharmacy, medicine and cosmetology (especially for surface-applied treatment of skin lesions) as well as agriculture, industry (paint, construction, etc.) and home or office (mainly disinfection applications). Moreover, there is a promising

perspective of an intra-systemic NP use, especially to optimize targeted drug delivery. For the above reasons NPs cause risk of penetrating human body and exerting toxic effects and/or stress reactions. This issue has inspired the authors to launch studies on the influence of colloidal AgNPs and CuNPs on physiological potential of neutrophils, blood-cells acting as the first line of immunological defense.

Methods: Physiological activity of neutrophils was evaluated by measuring their ability to generate oxygen radicals (radical oxygen species, ROS) due to the respiratory (oxidative) burst mechanism. Human, peripheral blood-isolated neutrophils were stimulated with a standard activating agent (polystyrene latex particles) to develop high physiological potential revealed by enhanced ability to produce oxygen radicals. The cells were treated with silver and copper hydronanocolloids (each applied at concentrations ranging from 0.4 to 50 mg/kg) alternatively: in the absence and presence of the mentioned activator. The level of generated ROS upon oxidative burst was monitored chemiluminometrically.

Results: The tested Ag and Cu-nanocolloids were not toxic against neutrophils although they hampered mitochondrial dehydrogenase activities when applied at higher levels. At lower concentrations they tended to stimulate ROS generation; however the treatment did not launch the oxidative burst. In the case of the latex-stimulated neutrophils, both types of nanoparticles in all experimental variants did not influence the levels of produced ROS.

Conclusions: The obtained results indicate that the exposure of human neutrophils to colloidal AgNPs and CuNPs does not lead to an enhanced ROS generation, which may enable direct intra-blood application of the tested nanostructures, provided further necessary toxicological studies are carried out.

Keywords: nanocolloids, nanomaterials, silver nanoparticles, copper nanoparticles, neutrophils, chemiluminescence, respiratory burst

WSTĘP

Ważnym kierunkiem i wyzwaniem nanotechnologii jest wykorzystywanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych nanomateriałów. Bakteriobójcza i grzybobójcza aktywność nanocząstek srebra, miedzi, innych metali oraz ich tlenków została wykazana w licznych pracach badawczych (10, 17, 20, 23). Mechanizmy oddziaływania różnorodnych nanostruktur zawierających metale na komórki pro- i eukariotyczne (w tym ludzkie i zwierzęce) są w ostatnich latach intensywnie badane i poznawane (1, 2, 3, 8, 10, 20).

Uzyskane dotąd wyniki badań otwierają optymistyczną perspektywę wykorzystania nanostruktur w celu pozyskania nowych leków przeciwdrobnoustrojowych, opracowania nośników związków o charakterze biobójczym, adiuwantów w innowacyjnych szczepionkach lub nośników farmaceutyków (16, 17, 24). Sprzyja temu zjawisko narastającej lekooporności patogenów na antybiotyki. Nanomateriały są już od lat obecne w praktyce farmakologicznej, przyczyniając się do opracowania modyfikowanych strukturalnie leków tak, aby wytworzyć funkcjonalne obiekty o skali submikroskopowej. Ostatnio szczególnie obiecującą drogą jest produkcja nanostruktur jako specyficznych nośników leków (22). Przy konstruowaniu nanoukładów, w tym nośnikowych, zabiegi prowadzące do modyfikacji strukturalnych stanowią często uzupełnienie technologii ich syntezy, zwłaszcza dominującej metody chemicznej syntezy organicznej (21).

Ważną rolę odgrywają przy tym nanocząstki zbudowane z kilkudziesięciu do kilku tysięcy atomów takich metali, jak srebro, złoto, miedź, iryd czy chrom (19).

Liczne korzyści wynikające ze stosowania produktów nanotechnologicznych nie mogą przesłaniać możliwych zagrożeń wynikających z szerokiego zakresu ich użycia. Powracającą kwestią jest toksyczność nanomateriałów w stosunku do człowieka. Nanostruktury przedostają się do płynów ustrojowych, tkanek i narządów człowieka, stwarzając liczne zagrożenia. Jest to obszar tylko częściowo rozpoznany (11, 13, 18), a wiele opisanych bądź postulowanych skutków zdrowotnych wymaga potwierdzenia i dalszych analiz. Z pewnością badania te należy rozszerzyć o określenie wpływu nanomateriałów na tkanki pacjenta i poszczególne komórki narządów, będących celem leków wprowadzanych na nanonośnikach. Obecna wiedza na temat ewentualnych skutków interakcji komórek pacjentów z nanocząstkami jest wciąż niewystarczająca i trudno przewidzieć, jakie to może mieć znaczenie lub jakie mogą być tego odległe konsekwencje (17). Pytania budzą mechanizmy i następstwa kontaktu nanodrobin z neutrofilami, pełniącymi kluczową rolę we wrodzonej obronie immunologicznej organizmu, jako pierwsza linia obrony przed obcymi cząstkami (4). W niniejszej pracy przedstawiono interakcje zachodzące między nanokoloidami miedzi i srebra a neutrofilami. Celem pracy było zbadanie wpływu tych nanoukładów na aktywność fizjologiczną neutrofilii, którą oceniano poprzez analizę intensywności oddychania mitochondrialnego oraz określenie zdolności do generowania reaktywnych form tlenu w procesie wybuchu tlenowego.

MATERIAŁ I METODY

Nanokoloidy miedzi i srebra. Badania prowadzono z wykorzystaniem komercyjnych preparatów nanocząstek miedzi i srebra w postaciach hydrokoloidalnych (oznaczanych, odpowiednio, CuNPs i AgNPs, z ang. *NanoParticles*), uzyskanych opatentowaną (Patent RP nr 3883399) metodą fizyczną firmy „Nano-Tech Polska”. Koloid nanocząstek miedzi (aXonnite® Copper) o stężeniu 0,005%, (50 mg/L, 50 ppm) składał się z nanocząstek miedzi metalicznej 4N i wody demineralizowanej, podobnie jak i koloid nanocząstek srebra (aXonnite® Silver) o stężeniu 0,005% (50 mg/L, 50 ppm), który składał się z nanocząstek srebra metalicznego 4N i wody demineralizowanej (3, 7, 12). Średnica stosowanych nanocząstek mieściła się w zakresie 2 do 35 nm. Ich zbliżony do sferycznego kształt oraz wielkość oceniono na podstawie analiz z wykorzystaniem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) pracującego pod napięciem 200 keV, gwarantującym brak uszkodzeń badanych nanostruktur (3).

Neutrofile. Neutrofile izolowano z krwi obwodowej łącznie od 14 zdrowych dawców. Do próbek krwi dodawano jako antykoagulant izocytrynian sodu (końcowe stężenie 0,01 M). Krew pozyskiwano z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecnicstwa w Krakowie. Izolację prowadzono z dolnej frakcji uzyskanej po izolacji komórek jednojądrzastych (PBMC), będącą mieszaniną neutrofilii i erytrocytów. Neutrofile oddzielano od czerwonych krwinek wykorzystując różnice w szybkości ich sedimentacji. Osad zawieszano w roztworze 1% alkoholu poliwinylowego (PVA, Merck-Schuchardt oHG) w soli fizjologicznej, po czym zawiesinę pozostawiano do sedimentacji w ciemności. Frakcję wzbogaconą w neutrofile płukano przez wirowanie w buforze PBS (10 minut, 280×g, 20°C). Domieszkę erytrocytów poddawano lizie w buforze litycznym RBC (Du Pont, Wilmington, USA) zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie neutrofile płukano, jak wyżej. Jeżeli w osadzie komórek po wirowaniu ponownie obserwowano erytrocyty, lizę powtarzano. Uzyskaną czystą frakcję neutrofilii zawieszano w pożywce hodowlanej RPMI 1640 (Gibco, Life Technologies).

Analizy cytotoksyczności nanokoloidów i oddziaływania na metabolizm neutrofilii. Aktywność metaboliczną neutrofilii wyznaczano metodą pomiaru intensywności respiracji mitochondrialnej (aktywność dehydrogenazowa) z wykorzystaniem barwnika MTT (*ang. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). W teście tym, aktywnie oddychające komórki zdolne są do redukowania rozpuszczalnej, żółtej soli tetrazolowej MTT do nierozpuszczalnego formazanu o barwie purpurowej, którego stężenie, po solubilizacji, mierzy się spektrofotometrycznie. W każdej z serii pomiarowych testowano następujące stężenia nanokoloidów, przygotowane przez rozcieńczenie roztworu wyjściowego 50 mg/L buforem RPMI Medium 1640 (Gibco): 0,4, 2,0, 10 oraz 50 mg/L. Komórki (ok. $5,0 \times 10^5$) umieszczano w próbkach typu Eppendorf, wirowano (temp. 4°C, 370×g, 1200 obr./min przez 6 min) w wirówce Eppendorf Centrifuge 5415 R, po czym do peletu komórkowego dodawano po 200 µl wcześniej przygotowanego rozcieńczenia odpowiedniego nanokoloidu. Neutrofile inkubowano z badanym roztworem wariantowo, 5, 10 oraz 15 min. Po upływie tego czasu zawiesiny komórek ponownie wirowano, usuwano nadsącz, a w jego miejsce dodawano 100 µl roztworu MTT. Następnie, komórki inkubowano 2,5 godz. w temp. 37°C, po czym zawiesinę ponownie wirowano, usuwano rozpuszczony MTT, a osad komórek zadawano izopropanolem zakwaszonym HCl w celu ekstrakcji kryształków formazanu. Próbkę wirowano, a następnie frakcję izopropanolową przenoszono do studzienki na płytce 96-dółkowej, gdzie mierzono absorbancję przy $\lambda=560$ nm (Molecular Devices Microplate Reader z oprogramowaniem SoftMax Pro 4.7 Software, Molecular Devices, LLC, USA) wobec izopropanolu jako próby ślepej.

Potencjał fizjologiczny neutrofilii związany ze skłonnością do wybuchu tlenowego, oceniano poprzez pomiar zdolności komórek do wytwarzania rodników tlenowych. Analizy prowadzono metodą chemiluminometryczną (14) w aparacie MicroLumat LB 96 P (EG&G Berthold, Niemcy). Do odczytu intensywności chemiluminescencji stosowano plastikowe mleczne płytki z 96 mikrostudzienkami, do których wprowadzano kolejno 150 µl buforu do chemiluminescencji, 2 µl CaCl_2 , 30 µl badanego nanokoloidu w odpowiednim stężeniu i $2,5 \times 10^5$ neutrofilii w 10 µl zawiesiny. Dla każdej z próbek przeprowadzano 6 serii pomiarowych, trwających po 20 minut. Wyniki rejestrowano za pomocą programu WinGlow. Przygotowano rozcieńczenia badanych nanokoloidów w wodzie destylowanej w zakresie stężeń, analogicznym do opisanego wyżej (0,4, 2,0, 10 i 50 mg/L). Ponadto, zawiesiny neutrofilii traktowanych nanokoloidami stymulowano standardowym aktywatorem chemiluminescencji – drobinami lateksu polistyrenowego o średnicy ziaren $\varnothing=80$ µm (wyprodukowane w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN w Krakowie; dodawano po 10 µl zawiesiny aktywatora do każdej ze studzienek).

Opracowanie statystyczne wyników. Testy oddziaływania preparatów nanokoloidów Cu i Ag na neutrofile prowadzono w sześciu niezależnych seriach pomiarowych, każda z wykorzystaniem neutrofilii pochodzących z krwi obwodowej innego dawcy. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą modułu Anova programu Statistica 13, dla poziomu istotności $p=0,05$. Istotność różnicy między średnimi zawartościami badanych związków dla poszczególnych wariantów określono przy użyciu testu Tukeya.

WYNIKI

Analizy aktywności respiracyjnej neutrofilii traktowanych zawiesinami nanokoloidalnych cząstek miedzi i srebra (CuNPs i AgNPs) wykazały tendencję do hamowania intensywności oddychania mitochondrialnego podczas inkubacji z wysokimi stężeniami nanocząstek.

Na Ryc. 1 i 2 przedstawiono przykładowe wyniki pomiaru aktywności dehydrogenazowej po 10 minutach inkubacji z CuNPs (Ryc. 1) i AgNPs (Ryc. 2). W przypadku CuNPs, nanokolloidy w stężeniach do 10 mg/L nie wykazywały hamującego wpływu, a jedynie podane w stężeniu 50 mg/L, po 10 min hamowały aktywność oddechową. Silniejszy efekt hamujący obserwowano w przypadku AgNPs; nanostruktury te nie wpływały negatywnie na metabolizm oddechowy w stężeniach 0,4 i 2,0 mg/L, natomiast stosowane w stężeniach 10 i 50 mg/L znacząco hamowały aktywność respiracyjną.

Ryc. 1. Aktywność dehydrogenazowa neutrofilii traktowanych przez 10 min nanokolloidami miedzi (preparat aXonnite® Copper). Kontrolę stanowiły zawiesiny neutrofilii nieinkubowane z preparatami nanocząstek.

Ryc. 2. Aktywność dehydrogenazowa neutrofilii traktowanych przez 10 min nanokolloidami srebra (preparat aXonnite® Silver). Kontrolę stanowiły zawiesiny neutrofilii nieinkubowane z preparatami nanocząstek.

Badania chemiluminometryczne pokazały, że chemiluminescencja naturalna neutrofilii nietraktowanych nanokoloidami (próba kontrolna), wyrażona w jednostkach względnych RLU (RLU, *ang. relative luminescence unit* – względna jednostka luminescencji), wynosiła średnio $3,07 \times 10^6 \pm 1,66 \times 10^6$ RLU. Wartość ta wzrastała podczas traktowania nanocząstkami w wariantach niższych stężeń. W przypadku CuNPs (Ryc. 3, słupki ciemne) zastosowanych w stężeniach 0,4, 2,0 i 10 mg/L, intensywności chemiluminescencji wynosiły odpowiednio $1,04 \times 10^7 \pm 1,55 \times 10^6$, $7,37 \times 10^7 \pm 3,97 \times 10^6$ i $7,81 \times 10^7 \pm 4,6 \times 10^6$ RLU. Inkubacja z nanocząstkami Cu w stężeniu 50 mg/L nie skutkowała znaczącą zmianą sygnału luminescencyjnego ($4,88 \times 10^6 \pm 1,66 \times 10^6$ RLU). Z kolei, nanokoloid srebra (Ryc. 4, słupki ciemne) wywoływał wzrost liczby rodników tlenowych w stężeniach 0,4 i 2,0 mg/L, odpowiednio do wartości $1,14 \times 10^7 \pm 2,09 \times 10^6$ i $1,25 \times 10^7 \pm 2,25 \times 10^6$ RLU. Traktowanie większymi dawkami, tj. 10 i 50 mg/L nie powodowało istotnych statystycznie zmian w stosunku do próby kontrolnej (odpowiednio $1,39 \times 10^6 \pm 1,05 \times 10^5$ i $2,23 \times 10^6 \pm 1,09 \times 10^6$ RLU).

Ryc. 3. Wyniki chemiluminometrycznej analizy aktywności wytwarzania rodników tlenowych przez neutrofile traktowane koloidalnymi nanocząstkami miedzi (preparat aXonnite® Copper, słupki ciemne) oraz w warunkach dodatkowej aktywacji lateksem polistyrenowym (słupki jasne). Kontrolę stanowiły zawiesiny neutrofilii nieinkubowane z preparatem nanocząstek, odpowiednio bez dodatku lateksu oraz aktywowane zawiesiną lateksu.

Neutrofile aktywowane lateksem polistyrenowym emitowały chemiluminescencję o intensywności blisko dwa rzędy wielkości większej (wzrost średniej wartości sygnału z $3,07 \times 10^6 \pm 1,66 \times 10^6$ RLU do średnio $1,72 \times 10^8 \pm 5,59 \times 10^7$ RLU, Ryc. 3 i 4, słupki jasne, kontrola), co potwierdza, że drobiny tego aktywatora pobudzały komórki do reakcji w postaci wybuchu tlenowego. W warunkach zastosowania lateksu, dodanie do studzienek nanokoloidu miedzi lub srebra w różnych stężeniach nie wpływało znacząco na sygnał mierzonej chemiluminescencji (Ryc. 3 i 4, słupki jasne); średnie wartości, odpowiednio dla CuNPs i AgNPs wynosiły: $1,44 \times 10^8 \pm 4,23 \times 10^7$ RLU i $2,17 \times 10^8 \pm 6,0 \times 10^6$ RLU).

Ryc. 4. Wyniki chemiluminometrycznej analizy aktywności wytwarzania rodników tlenowych przez neutrofile traktowane koloidalnymi nanocząstkami srebra (preparat aXonnite® Silver, słupki ciemne) oraz w warunkach dodatkowej aktywacji lateksem polistyrenowym (słupki jasne). Pozostałe informacje – jak w opisie pod Ryc. 3

DYSKUSJA

Wykorzystywanie nanopreparatów zawierających małe cząstki w zakresie wielkości od 1 do 100 nm jest coraz popularniejsze w różnych dziedzinach, takich jak elektronika, kataliza, rolnictwo, przemysł budowlany, farbiarski, kosmetyka, farmacja, medycyna, jak również praktyka życia codziennego (biuro, dom, tekstylia, środki higieny osobistej i inne) (6, 7, 13, 17, 19, 20). Dynamiczny rozwój technologii nanomateriałowych pozwala na opracowanie innowacyjnych produktów i zastosowanie wielu nieznanych wcześniej, nowatorskich rozwiązań. Nanocząstki miedzi i srebra, w tym zwłaszcza preparaty aplikowane w postaci hydronanokoloidów, już znajdują zastosowanie jako środki bakteriobójcze i przeciwgrzybicze (7).

Nanocząstki, obecne w wielu produktach i materiałach, dodawane do pasz, żywności, kosmetyków, leków czy opatrunków, jak również te przedostające się do środowiska w postaci odpadów, nie pozostają bez wpływu na organizmy żywe. Mogą kumulować się w tkankach tworząc złoże w organellach komórkowych, wpływać na strukturę i właściwości błon biologicznych, uszkadzać DNA, zaburzać procesy metaboliczne oraz wywoływać reakcje stresu komórkowego, m.in. indukując wytwarzanie wolnych rodników tlenowych (1, 2, 3, 8, 11, 17, 20). W przypadku nanocząstek srebra, stwierdzono ich negatywne działanie na komórki układu immunologicznego, m.in. cytotoksyczność wobec makrofagów (25) i ludzkich limfocytów T (5).

Szczególna perspektywa zastosowania nanopreparatów podawanych drogą infuzji w postaciach iniekcji i wlewów stała się inspiracją do podjęcia badań nad wpływem nanokoloidów miedzi i srebra na neutrofile krwi obwodowej. Ważne jest uzyskanie jednoznacznej informacji, czy te preparaty, używane obecnie przede wszystkim do dezynfekcji (7), nadawałyby się do stosowania wewnętrznego. Jest to pytanie bardzo istotne w kontekście prowadzonych prac nad wykorzystaniem nanocząstek jako leków, bądź jako nośników le-

ków podawanych wewnątrzustrojowo (16, 17, 22, 24).

Neutrofile są najliczniejszymi komórkami odpornościowymi we krwi, a ich uszkodzenie mogłoby mieć poważne konsekwencje dla zdrowia pacjenta (4). Z drugiej strony, koloidalne nanocząstki metali mogą działać prozapalnie i/lub negatywnie oddziaływać na poszczególne elementy układu immunologicznego. Rolą neutrofilii, uczestniczących w pierwszych etapach odpowiedzi na obecność obcych dla organizmu cząstek jest, między innymi, podwyższona produkcja reaktywnych form tlenu, opisana jako wybuch tlenowy (4). Mając na uwadze powyższe, dużą wagę ma ocena zachowania się neutrofilii podczas ekspozycji na nanocząstki pojawiające się we krwi. Atrakcyjnym podejściem badawczym kondycji fizjologicznej i stanu czynnościowego neutrofilii jest metoda chemiluminometryczna, opracowana i stosowana przez autorów (14, 15). Wykorzystuje ona zjawisko chemiluminescencji w zawiesinie badanych neutrofilii. Zjawisko to powstaje, gdy naturalna emisja kwantów światła w wyniku zachodzących w komórce reakcji chemicznych (bioluminescencja) jest wzmacniana przez obecność dodatkowego związku w środowisku reakcji (luminol, lucygenina, lucyferaza). Komórki neutrofilii, pobudzone (powierzchniowo lub fagocytujące) przez czynniki, takie jak np. napotkane we krwi patogeny lub aktywator lateksowy podawany w czasie eksperymentu, wytwarzają liczne rodniki tlenowe. Pomiar poziomu chemiluminescencji wywołanej obecnością reaktywnych form tlenu pozwala na określenie, w jakim stanie fizjologicznym znajdują się komórki.

W niniejszej pracy zastosowano dwa modele eksperymentalne oddziaływania nanocząstek z neutrofilami: inkubację z komórkami wyizolowanymi bezpośrednio z krwi obwodowej oraz traktowanie neutrofilii aktywowanych drobinami lateksu polistyrenowego. Oba modele dowiodły braku wpływu badanych nanokoloidów miedzi i srebra na potencjał fizjologiczny neutrofilii człowieka, mierzony poziomem wydzielanych reaktywnych form tlenu. Nanocząstki prawdopodobnie nie były fagocytowane przez neutrofile i dlatego nie pobudzały komórek do wybuchu tlenowego, mając jednocześnie ograniczony potencjał aktywowania neutrofilii powierzchniowo. Obserwowano ponad dwukrotny wzrost sygnału chemiluminescencji przy niższych stężeniach nanocząstek (0,4, 2,0 i 10 mg/L dla CuNPs, 0,4 i 2,0 mg/L dla AgNPs, Ryc. 3 i 4). Jakkolwiek wyniki te oznaczają podwyższoną produkcję rodników tlenowych, odnotowane zmiany nie mogą zostać uznane za przejaw wybuchu tlenowego. W tym ostatnim przypadku bowiem mobilizacja neutrofilii skutkowałaby wzrostem intensywności luminescencji przynajmniej o rząd wielkości.

W drugim modelu doświadczalnym, komórki aktywowano cząstkami lateksu polistyrenowego. Wiadomo, że drobinny polistyrenu pobudzają receptory powierzchniowe lub są fagocytowane, czemu towarzyszy podwyższony poziom chemiluminescencji (15). Należy przy tym uwzględnić fakt, że pomiary prowadzono na neutrofilach izolowanych, a sam proces izolacji komórek mógł osłabić ich zdolność do reagowania na działanie relatywnie słabszych czynników pobudzających. Niemniej jednak, wyraźny efekt aktywujący za pomocą drobin lateksu dowodzi utrzymania zdolności izolowanych neutrofilii do aktywnej produkcji rodników tlenowych w procesie wybuchu tlenowego. W konsekwencji zastosowania nanokoloidów Cu i Ag, podanych we wszystkich wariantach stężeń, wartości sygnału chemiluminescencji nie wykazywały statystycznie znaczących zmian w stosunku do kontroli, tj. komórek stymulowanych wyłącznie lateksem. Otrzymany wynik świadczy o braku dodatkowego aktywującego działania nanostruktur na neutrofile i jest zgodny z obserwacjami wcześniejszymi (tzn. analizami w warunkach braku aktywowania lateksem). Z drugiej strony, rezultat ten oznacza brak nega-

tywnego (cytotoksycznego) wpływu na stymulowane lateksem komórki, nawet w stężeniach nanocząstek hamujących oddychanie mitochondrialne (patrz niżej). Widoczne jest wprawdzie duże zróżnicowanie danych pomiarowych uzyskanych w poszczególnych powtórzeniach, skutkujące stosunkowo dużymi odchyleniami standardowymi przy niektórych wartościach sygnału chemiluminescencji; jest to jednak uzasadnione zastosowanym podejściem badawczym, w którym komórki za każdym razem były pobierane od innego dawcy i w związku z tym mogły różnić się stanem czynnościowym, a w konsekwencji reagowaniem na pobudzenie.

W testach aktywności respiracyjnej, nanokoloidy Cu i Ag firmy „Nano-Tech Polska” nie były toksyczne wobec neutrofilii człowieka, aczkolwiek zastosowane wyższe stężenia obniżały intensywność procesów oddechowych. Całkowite zahamowanie aktywności dehydrogenazowej nastąpiło jedynie przy największych stężeniach użytych CuNPs i AgNPs (50 mg/L, Ryc. 1 i 2). W przypadku AgNPs, znaczny efekt hamujący odnotowano również podczas traktowania roztworem 10 mg/L. Z kolei, testowane stężenia CuNPs w zakresie 0,4 – 10 mg/L nie były hamujące. Należy podkreślić, że zaobserwowane przypadki obniżenia tempa metabolizmu mitochondrialnego neutrofilii nie implikują spadku przeżywalności komórek; nie muszą też oznaczać obniżenia ich zdolności do reagowania wybuchem tlenowym na czynniki stymulujące. Brak toksycznego działania nanokoloidów znalazł potwierdzenie w wynikach stabilnego poziomu wybuchu tlenowego podczas aktywowania lateksem, obserwowanego przy wszystkich stężeniach obu rodzajów nanocząstek.

Podsumowując, uzyskane wyniki sugerują kontynuację prac badawczych nad możliwością wewnątrznaczyniowego zastosowania nanomateriałów o charakterze hydrokoloidów nanocząstek metali. Można przypuszczać, że w warunkach *in vivo*, po zetknięciu się nanocząstek z granulocytami krwi, również nie wystąpiłby efekt stymulacji neutrofilii do wybuchu tlenowego, co obniżyłoby ryzyko wystąpienia negatywnych reakcji w obrębie układu immunologicznego, wywołanych potencjalnym stosowaniem nanokoloidów. Mając jednak na uwadze zakres przeprowadzonych dotąd badań, ograniczony wyłącznie do analizy wpływu badanych nanostruktur na fizjologiczny stan neutrofilii, podczas prób korzystania z tych preparatów należy zachować ostrożność, ponieważ mechanizmy oddziaływania nanocząstek na wewnętrzne organy organizmu człowieka, a także inne komórki i tkanki, nie zostały jeszcze wystarczająco dobrze poznane.

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego jest członkiem Konsorcjum, które uzyskało status Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW). Badania zostały częściowo sfinansowane z dotacji przyznanej przez MNiSW na działalność statutową Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

PIŚMIENNICTWO

1. Asharani PV, Low KahMun G, Hande MP, Valiyaveetil S. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS Nano 2009; 3: 279-90.
2. Bankier C, Cheong Y, Mahalingam S i inni. A comparison of methods to assess the antimicrobial activity of nanoparticle combinations on bacterial cells. PLoS One 2018; 13: e0192093.
3. Chwalibog A, Sawosz E, Hotowy A i inni. Visualization of interaction between inorganic nanoparticles and bacteria or fungi. Int J Nanomedicine 2010; 5: 1085-94.

4. *Dąbrowski Z.* Fizjologia krwi. Wybrane zagadnienia. Część 2. Wyd. 1. Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa 2000.
5. *Eom HJ, Choi J.* p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environ Sci Technol* 2010; 44: 8337-42.
6. *Heiligtag FJ, Niederberger M.* The fascinating world of nanoparticle research. *Mater Today* 2013; 16: 262-71.
7. <https://nano-tech.pl/> (dostęp 22.12.2018)
8. *Ivask A, Juganson K, Bondarenko O* i inni. Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells in vitro: a comparative review. *Nanotoxicology* 2014; 1: 57-71.
9. *Karlsson HL.* The comet assay in nanotoxicology research. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398: 651-66.
10. *Kim KJ, Sung WS, Moon SK* i inni. Antifungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes. *J Microbiol Biotechnol* 2008; 18: 1482-4.
11. *Łebkowska M, Załęska-Radziwiłł M.* Występowanie i ekotoksyczność nanocząstek. *Ochrona Środowiska* 2011; 33: 23-6.
12. *Markowska K, Grudniak AM, Krawczyk K* i inni. Modulation of antibiotic resistance and induction of stress response in *Pseudomonas aeruginosa* by silver nanoparticles. *J Med Microbiol* 2014; 63: 849-54.
13. *Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A* i inni. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br J Pharmacol* 2009; 150: 552-8.
14. *Międzobrodzki J, Panz T, Płonka PM* i inni. Platelets augment respiratory burst in neutrophils activated by selective species of gram-positive or gram-negative bacteria. *Folia Histochem Cytobiol* 2008; 46: 383-8.
15. *Międzobrodzki J, Zemanek G, Baran J.* Chemiluminescencja – opis zjawiska, możliwości jego detekcji i wykorzystania. *Mikrobiol Med* 1999; 18: 41-5.
16. *Mohan T, Verma P, Rao DNS.* Novel adjuvants and delivery vehicles for vaccines development: a road ahead. *Indian J Med Res* 2013; 138: 779-95.
17. *Nawrotek P, Augustyniak A.* Nanotechnologia w mikrobiologii – wybrane aspekty. *Post Mikrobiol* 2015; 54: 275-82.
18. *Oberdorster G.* Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *J Intern Med* 2010; 267: 89-105.
19. *Pike-Bieguński MJ.* Nanotechnologia w medycynie i farmacji. *Lek w Polsce* 2005; 15: 30-7.
20. *Prabhu S, Poulose EK.* Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett* 2012;2; doi.org/10.1186/2228-5326-2-32.
21. *Pulit J, Banach M, Kowalski Z.* Właściwości nanocząsteczek miedzi, platyny, srebra, złota i palladu. *Czasopismo Techniczne. Chemia* 2011; 108: 197-209.
22. *Velavan P, Karuppusamy C, Venkatesan P.* Nanoparticles as drug delivery systems. *J Pharm Sci Res* 2015; 7: 1118-22.
23. *Wang L, Hu C, Shao L.* The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine* 2017; 12: 1227-49.
24. *Wanigasekara J, Witharana C.* Applications of nanotechnology in drug delivery and design - an insight. *Curr Trends Biotechnol Pharm* 2016; 10: 78-91.

25. *Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL*. Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* 2009; 5: 1553-61.

Otrzymano: 11 I 2019 r.

Adres Autora: 30-387 Kraków, ul. Gronostajowa 7, Zakład Mikrobiologii, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie.

*Autor do korespondencji: jacek.miedzobrodzki@uj.edu.pl