

AUTOREFERAT

dr Anna Maria Barbasz
Zakład Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Instytut Biologii
Wydział Geograficzno-Biologiczny
Uniwersytet Pedagogiczny
im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie

Kraków 2018

dr Anna Barbasz

Zakład Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Instytut Biologii

Wydział Geograficzno-Biologiczny

Uniwersytet Pedagogiczny im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie

ul. Podchorążych 2 30-084 Kraków

anna.barbasz@up.krakow.pl

I. IMIĘ I NAZWISKO: Anna Maria Barbasz

II. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE:

- **2009 r. – stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii** uzyskałam na podstawie rozprawy doktorskiej pt.: „Adsorpcja i aktywacja układu produkcji kinin na powierzchni monocytów i makrofagów”, wykonanej w Zakładzie Biochemii Analitycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Promotor: prof. dr hab. Andrzej Kozik
- **2005 r. – stopień magistra biologii, specjalność: biochemia** uzyskałam na podstawie pracy magisterskiej pt.: „Badanie wiązania wielkocząsteczkowego kininogenu do powierzchni komórek mysich makrofagów RAW 264,7” wykonanej w Zakładzie Biochemii Analitycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Promotor: prof. dr hab. Andrzej Kozik. Ukończyłam kierunek biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

III. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH:

- **Adiunkt (od 15.10.2009 do chwili obecnej)** w Instytucie Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie.

IV. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2016 poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.):

Tytuł osiągnięcia naukowego:

Osiągnięciem, stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, jest cykl siedmiu oryginalnych prac eksperymentalnych, ujętych pod wspólnym tytułem:

„Biochemiczne aspekty cytotoksyczności nanocząstek srebra i złota”

Słowa kluczowe: nanocząstki, cytotoksyczność, srebro

Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

A1. Barbasz A., Oćwieja M., Barbasz J.(2015) **Cytotoxic activity of highly purified silver nanoparticles sol against cells of human immune system**. Applied Biochemistry and Biotechnology 176(3); 817-834 (**IF₂₀₁₅=1,606**, punkty MNiSW=**20pkt**, liczba cytowań wos: 15). DOI: 10.1007/s12010-015-1613-3 autor korespondencyjny

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- zaplanowaniu doświadczeń biologicznych
- hodowli i różnicowaniu dwóch linii komórek ludzkich
- opracowaniu procedur i protokołów oznaczanie żywotności komórek
- przeprowadzeniu doświadczeń
- analizie danych i interpretacji wyników
- napisaniu manuskryptu
- roli autora korespondującego

Mój udział procentowy szacuję na 75%

A2. Barbasz, A. Oćwieja, M., Walas, S. (2017). **Toxicological effects of three types of silver nanoparticles and their salt precursors acting on human U-937 and HL-60 cells**. Toxicology Mechanisms and Methods, 27(1), 58-71.(**IF₂₀₁₆=1,595**, punkty MNiSW =15pkt, liczba cytowań wos: 1) DOI: 10.1080/15376516.2016.1251520 autor korespondencyjny

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń biologicznych
- hodowli i różnicowaniu dwóch linii komórek ludzkich
- przeprowadzeniu doświadczeń obrazujących oddziaływanie nanocząstek srebra z wybranym białkiem

- wyznaczeniu medialnych dawek śmiertelnych
- analizie danych i interpretacji wyników
- napisaniu manuskryptu
- roli autora korespondującego

Mój udział procentowy szacuję na 70%

A3. Barbasz, A., Oćwieja, M., Roman, M. (2017). Toxicity of silver nanoparticles towards tumoral human cell lines U-937 and HL-60. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 156 (1): 397-404 (IF₂₀₁₆ =3.887, punkty MNiSW =35pkt, liczba cytowań w_{oS}: 1) DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.05.027

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń biologicznych
- hodowli dwóch linii komórek ludzkich
- opracowaniu procedur i protokołów pod kontem badań integralności błony komórkowej, obrony antyoksydacyjnej komórek
- analizie danych i interpretacji wyników
- przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu

Mój udział procentowy szacuję na 50%

A4. Oćwieja M., Barbasz A., Walsa S., Roman M., Paluszkiewicz C. (2017) Physicochemical properties and cytotoxicity of cysteine-functionalized silver nanoparticles. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 160 (1); 429-437. (IF₂₀₁₆ =3.887, punkty MNiSW =35pkt, liczba cytowań w_{oS}: 0) DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.09.042

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- zaplanowaniu i przeprowadzeniu doświadczeń biologicznych
- hodowli dwóch linii komórek ludzkich
- analizie danych i interpretacji wyników doświadczeń biologicznych

Mój udział procentowy szacuję na 30%

A5. Barbasz A., Oćwieja M. (2016) Gold nanoparticles and ions – friends or foes? As they are seen by human cells U-937 and HL-60. Journal of Experimental Nanoscience 11(7), 564-58 (IF₂₀₁₆=0,863, punkty MNiSW=20pkt, liczba cytowań w_{oS}: 3). DOI:10.1080/17458080.2015.1096024 autor korespondencyjny

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- zaplanowaniu doświadczeń biologicznych
- hodowli i różnicowaniu dwóch linii komórek ludzkich
- przeprowadzeniu doświadczeń
- analizie danych i interpretacji wyników
- napisaniu manuskryptu
- roli autora korespondującego

Mój udział procentowy szacuję na 70%

A6. Barbasz A., Kreczmer B., Oćwieja M (2016) **Effects of exposure of callus cells of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt (AgNO₃)**. Acta Physiologiae Plantarum 38(76) (IF₂₀₁₆= 1,354, punkty MNiSW = 25 liczba cytowań wos: 10) DOI: 10.1007/s11738-016-2092-z autor korespondencyjny

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- zaplanowaniu doświadczeń biologicznych
- przeprowadzeniu doświadczeń
- opracowaniu procedur i protokołów pod kontem badań wpływu nanocząstek srebra na komórki kalusów
- analizie danych i interpretacji wyników
- zgromadzeniu i przeglądzie fachowej literatury oraz przygotowaniu manuskryptu
- roli autora korespondującego

Mój udział procentowy szacuję na 60%

A7. Barbasz A., Kreczmer B., Oćwieja M. (2018) **How the surface properties affect the nanocytotoxicity of silver? Study of the influence of three types of nanosilver on two wheat varieties**. Acta Physiologiae Plantarum (2018) 40(31) (IF₂₀₁₆ = 1.364, punkty MNiSW = 25 liczba cytowań wos: 0) DOI :10.1007/s11738-018-2613-z. autor korespondencyjny

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na:

- zaplanowaniu doświadczeń biologicznych
- przeprowadzeniu doświadczeń
- analizie danych i interpretacji wyników
- napisaniu manuskryptu
- roli autora korespondującego

Mój udział procentowy szacuję na 75%

Łącznie dla ww. cyklu publikacji:

Sumaryczna ilość punktów MNiSW Punkty MNiSW przypisano na podstawie ujednolicony wykaz czasopism naukowych za lata 2013-2016 z dnia 26.01.2017.	175	
Impact Factor (IF) <i>Impact Factor (IF) - zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku publikacji z 2017 i 2018 podano IF₂₀₁₆)</i>	14,556	
Liczba cytowań według baz:	Web of Science	30
	Scopus	29
	Google Scholar	34

Oświadczenia współautorów prac, szczegółowo określające ich indywidualny wkład w powstanie tych prac zamieszczone są w **Załączniku nr 4**.

Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wprowadzenie

W ostatnich kilkudziesięciu latach nanocząstki metali znalazły szereg zastosowań w wielu gałęziach nauki i przemysłu. Mianem nanocząstek definiuje się obiekty, których jeden wymiar przestrzenny mieści się w zakresie od 1 do 100nm (Kelsall i wsp., 2008). Nanocząstki srebra (AgNPs), z racji działania antybakteryjnego, przeciwwirusowego i przeciwgrzybicznego są wykorzystywane jako substancje ochronne. Unikalna fizykochemia powierzchni AgNPs pozwala na modulowanie ich kształtu, rozmiaru a przede wszystkim aktywności biologicznej na etapie syntezy. Naukowcy opracowali wiele metod syntezy nanocząstek srebra opartych zarówno o procesy dyspersyjne jak i kondensacyjne. Według innej klasyfikacji metody syntezy nanocząstek srebra dzieli się na procesy fizyczne, chemiczne oraz biologiczne. Do metod fizycznych zalicza się min. ablacja laserowa, metody sonochemiczne czy fotochemiczne (Mafuné i wsp., 2000). Metody biologiczne polegają na syntezie nanocząstek srebra z wykorzystaniem metabolizmu mikroorganizmów lub roślin wyższych (Mandal i wsp., 2006; Huang i wsp., 2007). Za najbardziej wydajne i łatwe uznaje się metodę chemiczną. Najczęściej stosowaną jest synteza metodą redukcji chemicznej jonów srebra z soli srebra (np. AgNO_3) z użyciem czynnika redukującego. W celu zwiększenia stabilności nanocząstek, proces często prowadzi się w obecności wysokocząsteczkowych stabilizatorów organicznych (np. poliwinylopirolidonu, chitozanu), lub środków powierzchniowo czynnych (jak np. dodecylosulfonianu sodu), który ma chronić nanocząstki srebra przed agregacją (Song i Kim., 2009). Synteza na drodze redukcji chemicznej przebiega w trzech etapach. W pierwszym etapie w wyniku redukcji soli srebra powstają wolne atomy srebra. Następnie atomy srebra w procesie nukleacji, zderzają się ze sobą i tworzą stabilne jądra (o średnicy ok. 1-2 nm). W drugim etapie obserwuje się wzrost nanocząstek, wynikający z dalszej redukcji jonów srebra na powierzchni powstałych jąder, z dyfuzji atomów lub z ich agregacji. W ostatnim etapie dodaje się środki stabilizujące powstałe nanocząstki (Nath i Chilkoti, 2004; Goia i Matijević, 1998).

Według wielu teorii biobójcze właściwości AgNPs są ściśle związane z uwalnianiem z ich powierzchni srebra jonowego na skutek procesów utleniającego roztwarzania (Kittler i wsp., 2010). Z drugiej zaś strony wiadomo, że aktywność nanocząstek srebra bezpośrednio

bądź pośrednio modyfikują również molekuly stabilizatorów zaadsorbowane na ich powierzchni, które w zależności od struktury i właściwości mogą maskować lub wzmacniać aktywność biologiczną nanocząstek nawet w porównaniu do srebra jonowego o tym samym stężeniu (Jiang i wsp.; 2009, Kujda i wsp.; 2015; Mulvaney i wsp.; 1991; Oćwieja i wsp.; 2014; Silva i wsp., 2014). Nie wyjaśnione pozostają wciąż przemiany jakim ulegają nanocząstki w warunkach fizjologicznych.

Następstwem tak szerokich zastosowań AgNPs stały się badania ich wpływu na organizmy żywe i środowisko naturalne. Nanocytotoksykologia stara się zgłębić zagadnienia związane z wpływem nanocząstek na komórki organizmów żywych. Do tej pory wykazano toksyczne działanie AgNPs względem licznych szczepów bakterii, a także grzybów, wirusów oraz glonów (Marambio-Jones i Hoek 2010). W przypadku bakterii zaproponowano następujące mechanizmy działania AgNPs: 1) początkowy wychwyt jonów srebra, uwolnionych z powierzchni nanocząstek, który powoduje przerwanie produkcji ATP i wstrzymanie replikacji DNA, 2) generowanie reaktywnych form tlenu przez wspólne działanie nanocząstek i jonów srebra, 3) uszkodzenie błon komórkowych. Oddziaływanie AgNPs z powierzchnią bakterii powoduje uszkodzenie komórek i przenikanie AgNPs do wnętrza komórki. Otwory w błonach komórkowych obserwowano w przypadku komórek *E. coli* po kontakcie z AgNPs (Choi i Hu, 2008, Raffi i wsp., 2008; Sondi i Salopek-Sondi 2004). Działanie przeciwbakteryjne zależy od budowy ściany komórkowej bakterii. Bakterie gram-dodatnie, o grubszej warstwie peptydoglikanu w ścianie komórkowej, są mniej wrażliwe na cytotoksyczne działanie nanocząstek srebra, niż bakterie gram-ujemne (Kim i wsp., 2007; Shivastava i wsp., 2007).

W przypadku badań prowadzonych na mysich makrofagach (RAW 264,7), stwierdzono, iż wraz ze wzrostem stężenia i wydłużeniem czasu inkubacji, żywotność spada, a sfagocytowane nanocząstki blokują cykl komórkowy oraz indukują stan zapalny poprzez wzmożenie produkcji reaktywnych form tlenu i sekrecję TNF- α . Proces ten nazwano „mechanizmem konia trojańskiego” (Park i wsp., 2010; Orłowski i wsp. 2012).

Obecne w środowisku AgNPs mogą wnikać do organizmu ludzkiego przez inhalację, iniekcje, wraz z pokarmem lub przez skórę (Wijnhoven i wsp. 2009). Prowadzone dotychczas badania wskazują na toksyczne działanie AgNPs, choć dokładny mechanizm ich działania nie został w pełni poznany i opisany (Bondarenko i wsp., 2013; Schrurs i Lison, 2012). Po wnikięciu do organizmu AgNPs w początkowym etapie podlegają „rozpoznaniu” przez komórki ludzkiego układu immunologicznego, a następnie są translokowane wraz z krwią i ewentualnie mogą ulegać akumulacji w głównych organach, szczególnie w nerkach,

wątrobie, śledzionie lub mózgu co wykazano na modelu szczurzym (Tang i wsp. 2009). Wykazano, iż nanocząstki mniejsze niż 30 nm mogą wnikać do wnętrza komórek w drodze endocytozy, a mniejsze niż 12 nm mogą przenikać barierę krew-mózg (Oberdörster i wsp., 2004; Sonavane i wsp., 2008; Conner i Schmid, 2003). W układzie krwionośnym powierzchnia nanocząstek jest modyfikowana na skutek adsorpcji albumin, które stanowią blisko 60% wszystkich białek osocza. Albuminy osocza odpowiadają za transport egzogennych substancji takich jak kwasy tłuszczowe, hem, bilirubina, leki czy jony metali (Hu i wsp., 2009; Tian i wsp., 2005). Albumina wykazuje duże powinowactwo do nieorganicznych nanocząstek i jest stosowana do ich ochrony przed agregacją (Brewer i wsp., 2005; Zhang i wsp., 2005).

Wielu badaczy wykazało cytotoksyczny wpływ AgNPs na ludzkie komórki (Arora i wsp., 2008; AshaRani i wsp., 2009; Braydich-Stolle i wsp., 2005; Hussain i wsp., 2005; Hsin i wsp., 2008; Park i wsp., 2007; Foldbjerg i wsp., 2009; Kawata i wsp., 2009; Shin i wsp., 2007). Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za cytotoksyczność AgNPs wydaje się być ich rozmiar (Choi i Hu, 2008; Jiang i wsp., 2009; Park i wsp. 2011a, 2011b). Można ogólnie stwierdzić, że mniejsze nanocząstki wykazują większą toksyczność względem komórek, co jest ściśle związane z tym, że są one bardziej podatne na proces utleniającego roztwarzania. Jednakże mnogość czynników bezpośrednio wpływających na proces utleniającego roztwarzania nanocząstek srebra ogranicza pełny opis tych procesów (Levard i wsp., 2012).

Również nanocząstki złota (AuN) są przedmiotem szczególnej uwagi ze względu na ich interesujące właściwości elektrochemiczne, optyczne i termiczne oraz potencjalne zastosowania w medycynie, biologii, chemii, fizyce i materiałoznawstwie (Rashid i wsp., 2006). W literaturze AuN opisuje się zarówno jako toksyczne i nietoksyczne (Goodman i wsp., 2004; Connor i wsp., 2005; Prnodet i wsp., 2006).

Cel badań

Głównym celem badań stanowiących przedmiot osiągnięcia naukowego była kompleksowa biochemiczna analiza wpływu właściwości powierzchniowych nanocząstek srebra i złota na wybrane komórki. **W szczególności scharakteryzowano żywotność komórek, stabilność błony komórkowej, produkcję mediatorów stanu zapalnego oraz enzymów antyoksydacyjnych, działanie proapoptotyczne w badanych komórkach względem nanocząstek srebra i złota otrzymanych metodami redukcji chemicznej, oraz substratów użytych do ich syntezy. Badania wykonano na dwóch liniach ludzkich komórek układu immunologicznego (U-937 i HL-60) oraz na komórkach kalusa pszenicy (*Triticum aestivum* L.).**

Omówienie wyników badań

Powszechność występowania AgNPs w środowisku wymaga przeprowadzenia kompleksowych badań nad wpływem nanocząstek na funkcjonowanie komórek ludzi oraz roślin. Podczas syntezy nanocząstek srebra metodami redukcji chemicznej aniony pochodzące z soli srebra stanowiącej prekursor jonów srebra, nie biorą udziału w reakcjach chemicznych. Z drugiej strony, utlenione formy reduktorów oraz cząsteczki środków stabilizujących, adsorbują się na powierzchniach nanocząstek lub mogą też tworzyć specyficzne kompleksy i w ten sposób pośrednio wpływać na aktywność biologiczną badanych suspensji koloidalnych. Z tego powodu przebadano szczegółowo bioaktywność ośmiu rodzajów nanocząstek srebra otrzymanych przy użyciu wybranych soli srebra, reduktorów organicznych i nieorganicznych oraz dodatkowych czynników stabilizujących, a także jednego rodzaju nanocząstek złota. W Tab.1.i Tab.2. zestawiono informacje o badanych nanocząstkach (A1-A7). Do syntezy nanocząstek wykorzystano organiczny reduktor (kwas taninowy) lub związek nieorganiczny (borowodorek sodu). Rozmiar pozyskanych nanocząstek mieścił się w zakresie od 8 do 22 nm. Wszystkie stosowane w badaniach nanocząstki zostały scharakteryzowane z użyciem wybranych metod fizykochemicznych. Zastosowano pomiary ruchliwości elektroforetycznej oraz metody spektroskopowe (powierzchniowo wzmocniona spektroskopia ramanowska (SERS), która pozwoliła na określenie właściwości elektrokinetycznych nanocząstek oraz struktury chemicznej stabilizatorów zaadsorbowanych na nanocząstkach, bezpośrednio odpowiadającej za kontakt z

komórkami). Profil uwalniania srebra jonowego z powierzchni AgNPs świadczący o ich podatności na procesy utleniającego roztworzenia badano za pomocą adsorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS).

W pierwszej części badań skupiono się na określeniu znaczenia soli prekursorowej dla bioaktywności nanocząstek srebra (A1, A2). Zastosowane w pracy A1 nanocząstki zostały oczyszczone z nadmiaru reagentów za pomocą metody ultrafiltracji membranowej oraz scharakteryzowane za pomocą wybranych metod fizykochemicznych. Celem pracy było zbadanie wpływu nanocząstek srebra na funkcjonowanie ludzkiej linii komórkowej HL-60 i U-937. Eksperymenty przeprowadzono na komórkach niezróżnicowanych i zróżnicowanych do granulocytów oraz do mieszaniny monocytów i makrofagów.

Tabela 1. Zestawienie informacji o badanych nanocząstkach: rodzaju prekursora jonów, reduktora oraz stabilizatora użytego do syntezy. Nazwy nanocząstek są identyczne jak w publikacjach własnych, A1-A7).

Nazwa	Prekursor jonów srebra/ złota	Reduktor użyty do syntezy	Stabilizator	Publikacja
AgN	AgNO ₃	Kwas taninowy (C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆)	-	A1, A6
TAN	AgNO ₃	Kwas taninowy (C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆)	-	A2
TAA	CH ₃ COOAg	Kwas taninowy (C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆)	-	
TAC	AgClO ₄	Kwas taninowy (C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆)	-	
SBNM	AgNO ₃	Borowodorek sodu (NaBH ₄)	-	A3, A7
SBTC	AgNO ₃	Borowodorek sodu (NaBH ₄)	Cytrynian sodu (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	
SBATE	AgNO ₃	Borowodorek sodu (NaBH ₄)	Chlorowodorek cysteaminy (HSCH ₂ CH ₂ NH ₂ *HCl)	
AgNPs funkcjonalizowane cysteiną	AgNO ₃	Borowodorek sodu (NaBH ₄)	Cysteina	A4
AuN	HAuClO ₄	Kwas taninowy (C ₇₆ H ₅₂ O ₄₆)	-	A5

Komórki układu immunologicznego obecne w organizmie ludzkim, zapewniają jego ochronę przed infekcjami powodowanymi przez drobnoustroje lub obce cząstki, między innymi również nanocząstki metali. Linia modelowa komórek promielocytarnych HL-60 wykorzystywanych do badań jest nieprzylegająca w standardowych warunkach hodowli.

Charakterystyczne dla komórek HL-60 jest ich zdolność do różnicowania się na kilka typów komórek linii mielomonocytovej. Różne czynniki powodują różnicowanie tych komórek na cztery sposoby, do: granulocytów, monocytów, komórek makrofagopodobnych i eozynofili (Colins 1987).

Tabela.2. Wybrane właściwości fizykochemiczne badanych nanocząstek (A1-A7).

Nazwa	Średnica hydrodynamiczna [nm] wyznaczona za pomocą techniki DLS	Potencjał zeta [mV] wyznaczony z ruchliwości elektroforetycznej nanocząstek dla T=298K , I=0.001M, pH=7.0
AgN	17,0±5,0	-76±3
TAN	13,6±6,1	-75±2
TAA	14,7±4,3	-74±3
TAC	15,5±4,0	-77±3
SBNM	9,0±3,0	-55±1
SBTC	13,0±4,0	-76±4
SBATE	8,0±4,0	+62±1
AgNPs funkcjonalizowane cysteiną	22,0±4,0	-60±2
AuN	20,9±10,0	-64±5

W badaniach wybrano dwa sposoby różnicowania: do monocytów i makrofagów (przez zastosowanie różnicowania 3 nM PMA w ciągu sześciu dni) i do granulocytów (przez traktowanie 1,5% DMSO, przez sześć dni) na podstawie Murao i wsp., 1983, (A1, A2, A6). Z badań innych autorów ustalono, że dodatek związku polarnego, takiego jak DMSO, powoduje istotne zmiany właściwości morfologicznych, funkcjonalnych, enzymatycznych i powierzchniowych membranowych antygenów komórek, a w konsekwencji tworzenie dojrzałych granulocytów (Colins 1987). Komórki linii HL-60, zróżnicowane do komórek podobnych do neutrofilii, wykazują zwiększoną ekspresję antygeny CD11b, zdolność do redukcji NBT i są zdolne do fagocytozy (Olins i wsp., 2000). Różnicowanie *in vitro* poza

zmianami w funkcjach komórek powoduje istotne zmiany w składzie lipidów błony komórkowej i płynności błony komórkowej (Ip i Cooper, 1980).

Ponadto ludzkie monocytarne komórki U-937 traktowane estrami forbolu różnicują w monocyty i makrofagi (Harris i Ralph, 1985). Po różnicowaniu zawierają niespecyficzne esterazy, β -glukuronidazę, elastazę i lizozym. Komórki U-937 są zdolne do produkcji reaktywnych form tlenu tylko po aktywacji estrami forbolu (Harris i Ralph, 1985).

W badaniach dotyczących działania AgN na żywotność komórek po traktowaniu ich tym związkiem wykorzystano test MTT. Frakcja żywych komórek HL-60 zmniejszała się proporcjonalnie do stężenia AgN niezależnie od czasu kontaktu, podczas gdy żywotność komórek U-937 była zależna zarówno od stężenia, jak i czasu. Istotne różnice w przeżyciu komórek zaobserwowano w zależności od stopnia zróżnicowania komórek. **Dla obu linii komórkowych zaobserwowano zwiększoną przeżywalność wyspecjalizowanych komórek w porównaniu do nieróżnicowanych komórek.** Z wykorzystaniem mikroskopii sił atomowych (AFM) udało się zaobserwować otwory o średnicy około 700-2000 nm na powierzchni komórek po zetknięciu z nanocząstkami srebra (A1). Na tej podstawie można domniemywać, że mechanizm działania AgN na komórki ludzkie może być bardzo podobny do mechanizmu opisanego dla bakterii. Obecność AgN zwiększa także poziom wewnątrzkomórkowego antyoksydantu - glutationu i tlenku azotu - jednego z mediatorów stanu zapalnego. Przez wykazanie braku wpływu odcieku pozostającego po syntezie AgN na żywotność komórek, stwierdzono, że cytotoksyczność należy przypisać bezpośredniemu działaniu samych nanocząstek srebra (A1).

Następnie porównano wpływ prekursorowej soli srebra na bioaktywność nanocząstek srebra. Porównano wpływ trzech soli: azotanu (V) srebra (AgNO_3), octanu srebra (CH_3COOAg) i nadchloranu srebra (AgClO_4) oraz odpowiednich nanocząstek (TAN, TAA, TCA) (A2) otrzymanych przy użyciu wskazanych soli i kwasu taninowego jako czynnika redukującego. **W przypadku obu linii komórkowych sole srebra były bardziej toksyczne niż odpowiednie nanocząstki zastosowane w tym samym stężeniu.** Na podstawie wyników doświadczalnych wyznaczono medialną dawkę śmiertelną soli srebra i nanocząstek srebra (Tab. 3).

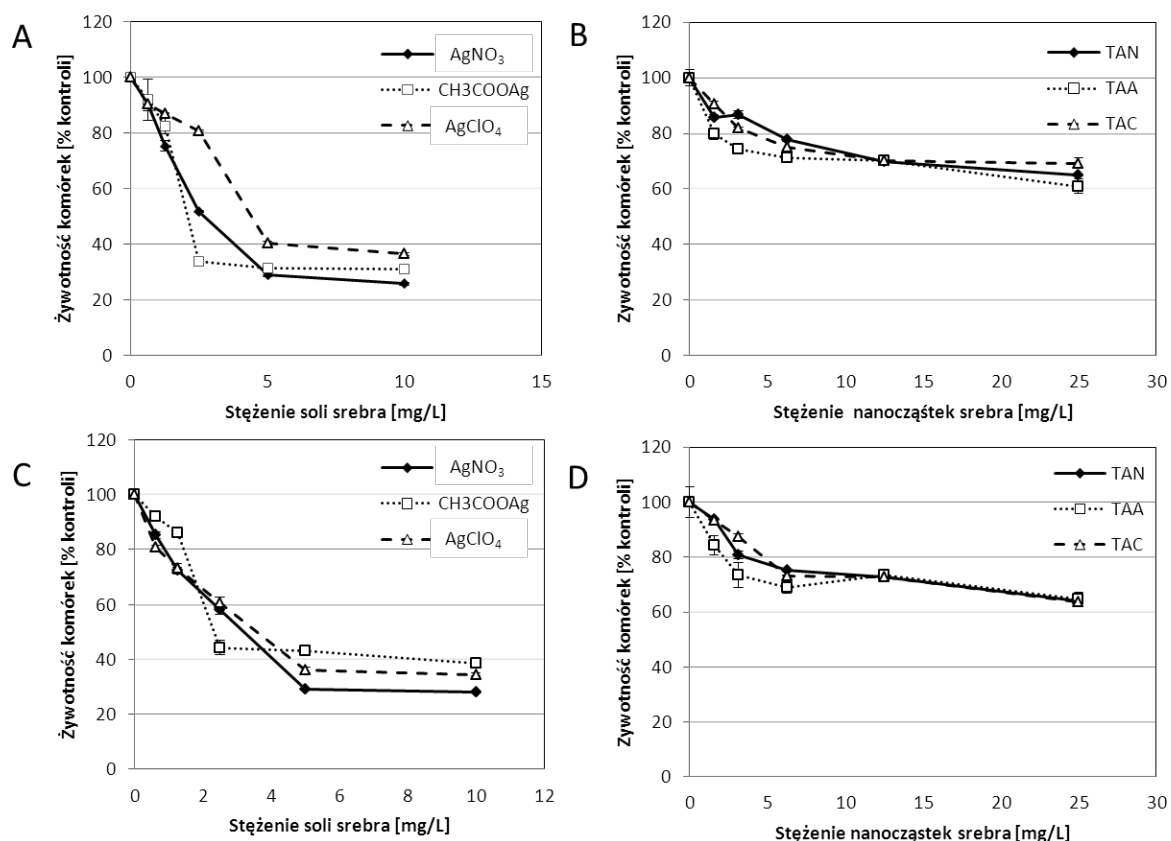
Stwierdzono, że żywotność komórek po traktowaniu dwiema formami srebra zależała od dawki srebra i stopnia różnicowania komórek. Dodatek soli srebra w dawkach większych niż 5 mg/L powodował zmniejszenie żywotności komórek o ponad 60%, podczas gdy dodatek nanocząstek zmniejszał żywotność komórek średnio o 30% (Rys. 1). Cytotoksyczność badanych nanocząstek zależy od ich dawki i rodzaju komórek, na których działają.

Oznaczenie LD₅₀ wskazało TAC i ich sól prekursorową (AgClO₄) jako najbardziej cytotoksyczne z badanych substancji.

Tabela 3. Medialna dawka śmiertelna (LD₅₀) wyznaczona dla komórek ludzkich traktowanych przez 24 godziny solami srebra lub nanocząstkami srebra.(A2)

		LD ₅₀ [mg/L/1x10 ⁶ komórek]				
		U-937		HL-60		
		promonocyty	monocyty /makrofagi	promielocyty	granulocyty	monocyty
Sól	AgNO ₃	23,76	23,99	21,20	21,65	20,79
Nanocząstki	TAN	37,68	37,82	106,84	101,57	66,91
Sól	CH ₃ COOAg	24,04	26,51	21,34	23,96	20,27
Nanocząstki	TAA	32,88	34,32	107,07	72,97	83,68
Sól	AgClO ₄	22,40	20,09	20,65	27,10	22,32
Nanocząstki	TAC	30,33	32,58	82,17	71,74	77,53

Obecność wszystkich typów nanocząstek zwiększała produkcję NO przez komórki odpornościowe, a nanocząstki TAC były najbardziej immunogenne wśród analizowanych AgNPs. TAC wykazywały najwyższe powinowactwo do BSA, a nadmiar białka był w stanie wyeliminować cytotoksyczne działanie nanocząstek. To zróżnicowane działanie wskazuje, że **informacje o prekursorze syntezy powinny być dołączone do dostępnych w handlu suspensji nanocząstek.** Uzyskane i oczyszczone metodą filtracji membranowej, **nanocząstki srebra wykazywały zróżnicowane działanie w stosunku do układów biologicznych, w zależności od użytej soli prekursorowej.**

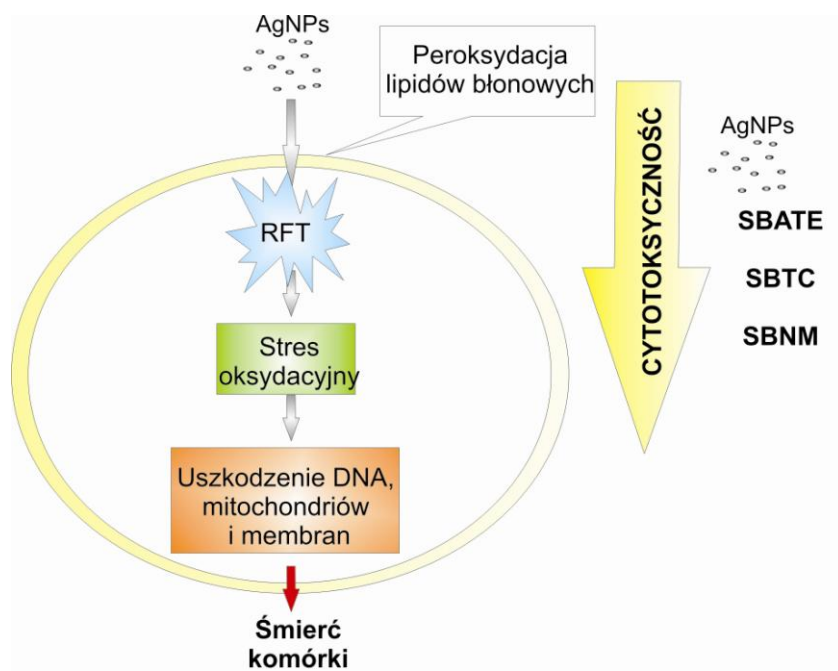


Rys.1. Żywotność komórek U-937 po traktowaniu solami srebra lub AgNP. i A, B -komórki U-937 lub C, D - U-937 aktywowane przez 1 dzień za pomocą 1 μ M PMA. Żywotność komórek mierzono za pomocą testu MTT. Żywotność wyrażono jako procent grupy kontrolnej (komórki nie poddane traktowaniu PMA), po 24 godzinach inkubacji z solami srebra lub AgNP. Punkty danych to średnie $\pm$ SD (5 oznaczeń).(A3)

Właściwości redukujące kwasu taninowego wykorzystano także w syntezie nanocząstek złota (AuN) (A5). Aby ocenić cytotoksyczność AuN zbadano również wpływ odcieku pozostającego po syntezie oraz soli złota (HAuCl₄). Wykazano, że odporność komórek na działanie toksyczne AuN zależy nie tylko od czasu inkubacji i dawkowania, ale także od etapów różnicowania komórek. Stwierdzono, że po inkubacji promonocytów U-937 z 25 mg/L AuN żywotność komórek zmniejszyła się o 25%, a makrofagów o 50%. W przypadku komórek HL-60, niezależnie od różnicowania, żywotność komórek zmniejszyła się o około 20% po traktowaniu suspensją AuN o stężeniu 25 mg/L. Udowodniono, że AuN indukował ponad piętnastokrotny wzrost produkcji tlenu azotu i zmniejszenie wewnątrzkomórkowego poziomu glutationu, co wskazywało na odpowiedź zapalną komórek. Mimo, że aniony tetrachloro-złota (III) (AuCl₄⁻) nie wykazały znaczącego wpływu na żywotność komórek, spowodowały pięciokrotny wzrost poziomu syntezy tlenu azotu. **Wykazano, zatem znaczący wpływ anionów tetrachlorozłocianowych na propagację**

stanu zapalnego, oraz że AuN cechuje niższa w porównaniu do nanocząstek srebra cytotoksyczność.

Dalsze badania prowadzono biorąc pod uwagę strukturę stosowanych czynników stabilizujących zaadsorbowanych na powierzchni nanocząstek, ładunek powierzchniowy nanocząstek i proces uwalniania jonów srebra (A3). Nanocząstki zostały otrzymane metodą redukcji chemicznej za pomocą borowodoru sodu. Dodatkowo zastosowano cytrynian sodu lub chlorowodorek cysteaminy w celu wytworzenia ujemnego lub dodatniego ładunku powierzchniowego nanocząstek (Tabela 1 i 2). Ocenę żywotności komórek, integralności błony komórkowej, aktywności przeciwutleniającej i indukcji stanu zapalnego wykorzystano do oceny różnicy w odpowiedzi komórkowej na traktowanie nanocząstkami. Wyniki wykazały, że dodatnio naładowane nanocząstki (SBATE) były najmniej toksyczne, chociaż wykazywały podobny profil uwalniania jonów, co obdarzone ujemnym ładunkiem nanocząstki otrzymane przy użyciu borowodoru sodu (SBNM). Nanocząstki stabilizowane cytrynianem (SBTC) indukowały aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w komórkach HL-60 i całkowitą aktywność przeciwutleniającą w komórkach U-937, pomimo odporności na utleniające roztwarzanie nanocząstek. Toksyczność niezmodyfikowanych nanocząstek (SBNM) przejawiała się w zakłóceniu integralności błony, zmniejszeniu mitochondrialnych funkcji komórek i indukcji stanu zapalnego. Odkrycia te pozwoliły stwierdzić, że mechanizmy cytotoksyczności nanocząstek srebra są kombinacją efektów pochodzących od powierzchniowego ładunku nanocząstek, uwolnionych jonów srebra oraz obecności specyficznych cząsteczek czynnika stabilizującego. Z drugiej strony odpowiedź komórkowa na traktowanie nanocząstkami zależy od dawki srebra i indywidualnych cech komórek (Rys.2.).



Rys.2. Schemat przedstawiający mechanizm działania nanocząstek srebra (A3).

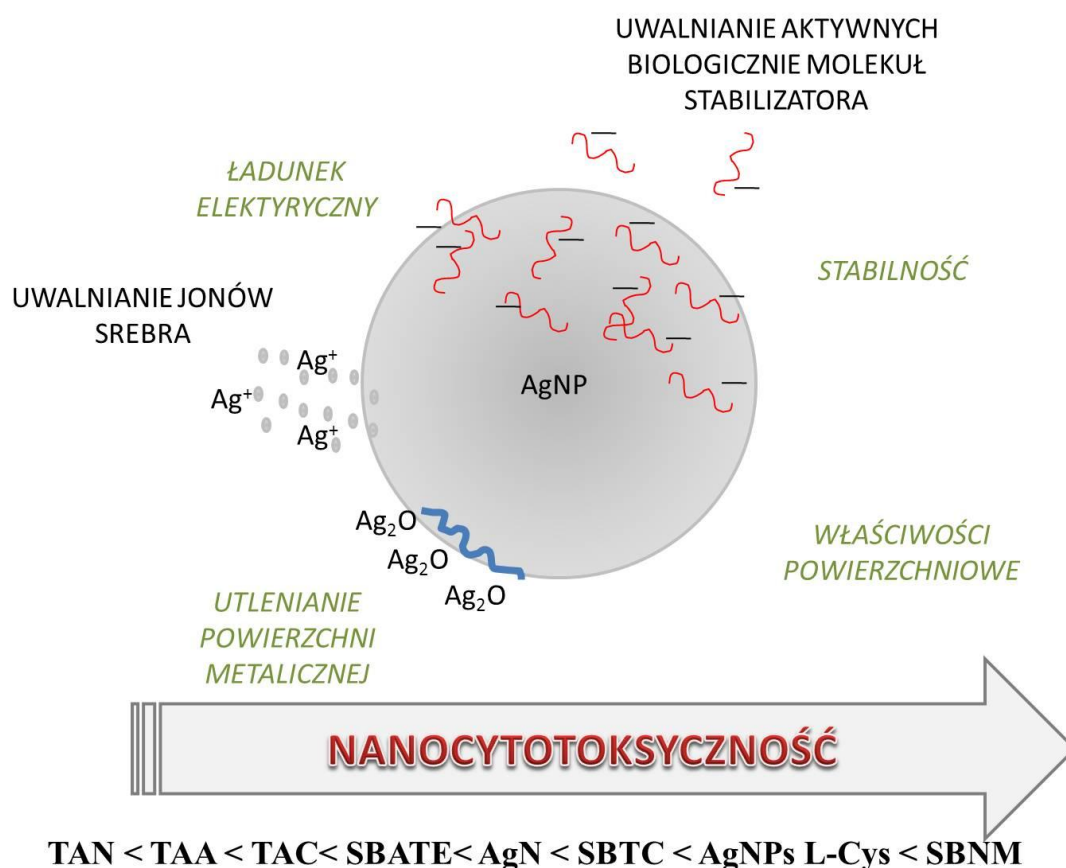
W badaniach wykazano także silną cytotoksyczność nanocząstek srebra funkcjonalizowanych cysteiną (A4). Metody przygotowania stabilnych nanocząstek srebra funkcjonalizowanych cysteiną znajdują się w centrum zainteresowania naukowców pracujących z nanomateriałami i systemami biologicznymi. Biorąc pod uwagę, że w zależności od pH roztworu wodnego cysteina występuje w postaci kationu, anionu lub jonu obojnego, oczekiwano, że ładunek powierzchniowy takich stabilizowanych cysteiną AgNPs powinien silnie zależeć od pH. Powinno to pozwolić na naśladowanie właściwości różnych białek i znaczne poszerzenie zastosowań tak stabilizowanych AgNPs. Ważnym osiągnięciem było otrzymanie stabilnych funkcjonalizowanych cysteiną AgNPs o zmiennym ładunku w zależności od pH. W publikacji A4 szczegółowo opisano właściwości fizykochemiczne otrzymanych AgNPs. Cytotoksyczność AgNP funkcjonalizowanych cysteiną badano przez ocenę zmian funkcji mitochondriów (test MTT) i integralności błony komórkowej (test LDH). Wyniki wykazały zależny od dawki wpływ AgNPs na żywotność komórek. Stwierdzono, że stężenie AgNPs wynoszące 15 mg/L spowodowało całkowite zniszczenie komórek obu typów. W tym miejscu warto podkreślić, że zgodnie z najnowszą wiedzą, **działanie cytotoksyczne stabilizowanych cysteiną AgNPs w stosunku do linii komórek nowotworowych nie zostało wcześniej opisane w literaturze.**

Uzyskane dla komórek ludzkich wyniki, zestawiono w tabeli 4.

Tabela.4. Medialna dawka śmiertelna (LD₅₀) wyznaczona dla nieróżnicowanych komórek po 24h inkubacji z nanocząstkami srebra.

Nazwa		LD ₅₀ [mg/L/1x10 ⁶ komórek]	
		U-937	HL-60
AgN	Reduktor organiczny	11,32	20,05
TAN		37,68	106,84
TAA		32,88	107,07
TAC		30,33	82,17
SBNM	Reduktor nieorganiczny	3,50	3,43
SBTC		11,78	13,03
SBATE		45,67	13,90
AgNPs funkcjonalizowane cysteiną		5,70	2,25

Podsumowując wszystkie uzyskane wyniki można określić skalę cytotoksyczności dla 8 rodzajów przebadanych nanocząstek srebra względem ludzkich komórek oraz wskazać mechanizmy cytotoksyczności nanocząstek srebra:



Rys. 3. Mechanizmy wpływające na cytotoksyczność nanocząstek srebra oraz skala nanocytotoksyczności dla badanych AgNPs (w oparciu o wynik badań własnych A1-A4).

Wpływ nanocząstek srebra na komórki kalusa pszenicy (*Triticum aestivum* L.)

Nie tylko organizmy zwierzęce niekorzystnie reagują na obecność AgNPs. Także w stosunku do wielu gatunków roślin opisano toksyczność AgNPs (Kumari i wsp., 2009; Yin i wsp., 2011; Lee i wsp., 2012, Vannini i wsp., 2014, A6, A7). AgNPs wpływają na fizjologię roślin, w tym kiełkowanie nasion, wzrost i metabolizm komórkowy. AgNPs powodują zmniejszenie funkcji mitochondriów, uszkodzenia błony komórkowej i stres oksydacyjny, powodujący uszkodzenie komórek (Gorczyca i wsp., 2015;A6). Generowane są także reaktywne formy tlenu. Komórkowy system obrony przeciwko reaktywnym formom tlenu oparty jest na antyoksydacyjnym działaniu askorbinianu, glutationu, α -tokoferolu oraz enzymów, głównie dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydaz i katalazy (Asada, 1992; Noctor i Foyer, 1998). Ponadto toksyczność nanocząstek może być związana z możliwym uwalnianiem substancji toksycznych z ich powierzchni, takich jak jony metali lub cząsteczki stabilizatorów (Franklin i wsp., 2007; Navarro i wsp., 2008).

Do badań wpływu nanocząstek srebra na komórki roślinne wybrano kalusy pszenicy (*Triticum aestivum* L.), rośliny ważnej agronomicznie. Pszenica stanowi bowiem jedno z najpowszechniej uprawianych zbóż zarówno w Polsce, jak i na świecie. Kultury kalusowe wykorzystywane są jako model do wykazania bezpośredniego działania substancji biologicznie czynnych na membrany komórek roślinnych. Zbadano cytotoksyczność azotanu(V)srebra, AgN, SBTC, SBNM i SBATE. Wszystkie z badanych nanocząstek powodowały zmiany w morfologii komórek oraz uszkodzenie membran komórkowych jako rezultat stresu oksydacyjnego. Jako inicjację mechanizmów obronnych wykazano wzrost syntezy głównie nieenzymatycznych antyoksydantów (A6, A7). Ponadto, wyniki pokazały, że dla komórek pszenicy dodatnio naładowane nanocząstki srebra (SBATE) są bardziej cytotoksyczne niż naładowane ujemnie, powodując większe zmiany parametrów biochemicznych. Mechanizm cytotoksyczności AgNPs jest sumą wpływu ładunku powierzchniowego i uwalniania jonów srebra z nanocząstek. Można stwierdzić, że **ładunek powierzchniowy AgNPs ma kluczowe znaczenie dla stymulacji „odpowiedzi” komórek roślinnych na obecność nanocząstek srebra.**

Najważniejsze osiągnięcia prezentowanych badań

- Wykazanie korelacji między aktywnością cytotoksyczną nanocząstek srebra, a fizykochemicznymi właściwościami ich warstwy stabilizującej, które mogą implikować efekty pośrednie (np. wpływ na kinetykę uwalniania srebra jonowego) bądź bezpośrednie (np. toksyczność zaadsorbowanych molekuł – synergizm, kompleksowanie jonów srebra, oddziaływania z błonami komórkowymi).
- Badania na poziomie komórkowym toksyczności nanocząstek srebra pozwoliły stwierdzić jak duże jest znaczenie procedury syntezy nanocząstek srebra, a tym samym ich właściwości powierzchniowych.
- Rodzaj soli srebra użytej do syntezy wpływa na bioaktywność nanocząstek.
- Nanocząstki srebra otrzymane i stabilizowane za pomocą reduktora nieorganicznego (borowoderek sodu) są dużo bardziej cytotoksyczne niż otrzymane za pomocą reduktora organicznego (kwas taninowy).
- Stabilizator wpływa na cytotoksyczność nanocząstek srebra.
- Jony złota wykazują działanie prozapalne, jednak nanocząstki złota są mniej cytotoksyczne niż nanocząstki srebra względem badanych komórek.
- Nanocząstki powodują peroksydację lipidów membran, poprzez indukcję stresu oksydacyjnego wpływają na generację reaktywnych form tlenu, przez co uszkodzeniu ulegają struktury komórkowe, a to prowadzi do śmierci komórki.
- Ładunek powierzchniowy AgNPs ma kluczowe znaczenie dla rozwoju odpowiedzi komórek roślinnych na obecność nanocząstek srebra. Nanocząstki obdarzone ładunkiem dodatnim są bardziej cytotoksyczne niż nanocząstki o ładunku ujemnym.

Podsumowując, właściwości fizykochemiczne nanocząstek srebra mają kluczowe znaczenia dla ich bioaktywności. Zarówno prekursor jonów srebra dostarczony w postaci soli, reduktor użyty do syntezy oraz czynniki stabilizujące znacząco wpływają na cytotoksyczność nanocząstek srebra. Przez dobór odpowiednich warunków syntezy oraz związków stabilizujących możliwe będzie pozyskanie nanocząstek srebra o ściśle określonych parametrach fizykochemicznych i zdefiniowanej cytotoksyczności. Pozwala to sądzić, iż możliwe jest opracowanie metodyki syntezy nanocząstek srebra o działaniu przeciwbakteryjnych, przeciwwirusowym czy przeciwwgrzybicznym a równocześnie o niewielkiej cytotoksyczności względem komórek ludzkich. Modyfikacje powierzchni nanocząstek za pomocą np. aminokwasów, mogą stanowić punkt wyjścia do syntezy

nowych złożonych leków, przez możliwość dołączania do powierzchni nanocząstek wybranych białek.

Literatura

Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM (2008) Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters* 179(2): 93–100. doi:10.1016/j.toxlet.2008.04.009

Asada K (1992) Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85(2):235-241 doi: 10.1111/j.1399-3054.1992.tb04728.x

AshaRani PV, Low KahMun G, Hande MP, Valiyaveetil S (2009) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano* 3(2): 279–290. doi:10.1021/nn800596w

Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A (2013) Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Archives of toxicology* 87(7): 1181-1200. doi:10.1007/s00204-013-1079-4

Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ, Hofmann MC (2005) In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences* 88(2): 412–419. doi: 10.1093/toxsci/kfi256

Brewer S, Glomm W, Johnson M, Knag M, Franzen S (2005) Probing BSA Binding to Citrate-Coated Gold Nanoparticles and Surfaces. *Langmuir* 21: 9303-9307. doi:10.1021/la050588t

Choi O, Hu ZQ (2008) Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ Sci Technol* 42:4583–4588. doi: 10.1021/es703238h

Collins SJ (1987) The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70(5): 1233-1244.

Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927): 37-44. doi:10.1038/nature01451

Connor EE, Mwamuka J, Gole A, Murphy C J, Wyatt MD.(2005) Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small*;1(3), 325-327. doi: 10.1002/sml.200400093

Foldbjerg R, Olesen P, Hougaard M, Dang DA, Hoffmann HJ, Autrup H (2009) PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol Lett* 190:156–162. doi:10.1016/j.toxlet.2009.07.009

Franklin NM, Rogers NJ, Apte SC, Batley GE, Gadd GE, Casey PS (2007) Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environmental Science & Technology* 41(24):8484-8490. doi: 10.1021/es071445r

Goia, D. V., Matijević, E. (1998). Preparation of monodispersed metal particles. *New Journal of Chemistry*, 22(11), 1203-1215.

Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM.. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate chemistry* 2004;15(4), 897-900. doi 10.1021/bc049951i

Gorczyca A, Pocięcha E, Kasprówicz M, Niemiec M. (2015) Effect of nanosilver in wheat seedlings and *Fusarium culmorum* culture systems. *European Journal of Plant Pathology* 142(2), 251-261.

Harris P, Ralph P (1985) Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *Journal of Leukocyte Biology* 37(4): 407-422.

Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ (2008) The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol Lett* 179: 130–139. doi:10.1016/j.toxlet.2008.04.015

Hu YJ, Liu Y, Xiao XH (2009) Investigation of the interaction between berberine and human serum albumin. *Biomacromolecules* 10: 517–21. doi: 10.1021/bm801120k

Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., Hong, J. (2007). Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology*, 18(10), 105104.

Hussain SM, Hess KL, Gearhart JM, Geiss KT, Schlager J (2005) In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *J Toxicology in Vitro* 19(7): 975–983. doi:10.1016/j.tiv.2005.06.034

Ip, S. H., Cooper, R. A. (1980). Decreased membrane fluidity during differentiation of human. *Blood*, 56(2), 227.

Jiang, J., Oberdörster, G., Biswas, P. (2009). Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(1), 77-89.

Kawata K, Osawa M, Okabe S (2009) In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol* 43: 6046–6051. doi: 10.1021/es900754q

Kelsall, R. W., Hamley, I. W., Geoghegan, M., Kurzydłowski, K. J. (Eds.). (2008). *Nanotechnologie*. Wydawnictwo Naukowe PWN.

Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, Y. K. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101.

Kittler, S., Greulich, C., Diendorf, J., Koller, M., Epple, M. (2010). Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. *Chemistry of Materials*, 22(16), 4548-4554.

Kujda M, Oćwieja M, Adamczyk Z, Bocheńska O, Graś G, Kozik A, Barbasz J (2015) Charge stabilized silver nanoparticles applied as antibacterial agents. *J Nanosc Nanotechnol* 10: 3574-3583. doi: 10.1166/jnn.2015.9727

Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2009) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Science of the Total Environment* 407(19); 5243-5246. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.06.024

Lee WM, Kwak JI, An YJ (2012) Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: media effect on phytotoxicity. *Chemosphere* 86(5);491-499. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.10.013

Levard, C, Hotze, EM, Lowry GV, Brown Jr, G.E (2012). Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental science & technology*, 46(13), 6900-6914.

Mafuné, F., Kohno, J. Y., Takeda, Y., Kondow, T., Sawabe, H. (2000). Formation and size control of silver nanoparticles by laser ablation in aqueous solution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(39), 9111-9117.

Mandal, D, Bolander ME, Mukhopadhyay D, Sarkar G, Mukherjee P (2006). The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. *Applied microbiology and biotechnology*, 69(5), 485-492.

Maramba-Jones C, Hoek EMV (2010) A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J Nanopart Res* 12: 1531-1551. doi:10.1007/s11051-010-9900-y

Mulvaney P, Linnert T, Henglein A (1991). Surface chemistry of colloidal silver in aqueous solution: observations on chemisorption and reactivity. *The Journal of Physical Chemistry*, 95(20), 7843-7846.

Murao SI, Gemmell MA, Callahan MF, Anderson NL, Huberman E (1983) Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ and phorbol-12-myristate-13-acetate. *Cancer research* 43(10): 4989-4996.

Nath N, Chilkoti A (2004). Label free colorimetric biosensing using nanoparticles. *Journal of fluorescence*, 14(4), 377-389.

Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Behra R (2008) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology* 42(23);8959-8964. doi: 10.1021/es801785m

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology* 49(1);249-279. doi: 10.1146/annurev.arplant.49.1.249

Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C (2004) Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation toxicology* 16(6-7): 437-445. doi: 10.1080/08958370490439597

Ocwieja M, Gorczyca A, Niemiec M, Adamczyk Z, Pocięcha E (2014) Effect of charge-stabilized silver nanoparticles with various surface properties on physiological state of seedlings of *Triticum aestivum*. *FEBS JOURNAL* 281, 622-623

Olins AL, Herrmann H, Lichter P, Olins DE (2000). Retinoic acid differentiation of HL-60 cells promotes cytoskeletal polarization. *Experimental cell research*, 254(1), 130-142.

Orłowski P, Krzyżowska M, Winnicka A, Chwalibóg A, Sawosz E (2012). Toxicity of silver nanoparticles in monocytes and keratinocytes: potential to induce inflammatory reactions. *Centr Eur J Immunol*, 37, 123-130.

Park J, Lim DH, Lim HJ, Kwon T, Choi JS, Jeong S, Choi IH, Cheon J (2011a) Size dependent macrophage responses and toxicological effects of Ag nanoparticles. *Chem Commun (Camb)* 47: 4382–4384. doi: 10.1039/C1CC10357A

Park MV, Neigh AM, Vermeulen JP, de la Fonteyne LJ, Verharen HW, Briedé JJ, van Loveren H, de Jong WH (2011b) The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 32(36): 9810-9817. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.08.085

Park S, Lee YK, Jung M, Kim KH, Chung N, Ahn EK, Lim Y, Lee KH (2007) Cellular toxicity of various inhalable metal nanoparticles on human alveolar epithelial cells. *InhalToxicol* 19: 59–65. doi: 10.1080/08958370701493282

Park EJ, Yi J, Kim Y, Choi K, Park K (2010). Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in vitro*, 24(3), 872-878.

Pernodet N, Fang X, Sun Y, Bakhtina A, Ramakrishnan A, Sokolov J, Ulman A, Rafailovich, M. (2006). Adverse effects of citrate/gold nanoparticles on human dermal fibroblasts. *Small*, 2(6), 766-773. doi 10.1002/smll.200500492

Raffi M, Hussain F, Bhatti TM, Akhter JI, Hameed A, Hasan MM (2008). Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. *Journal of materials science and technology*, 24(2), 192-196.

Rashid MH, Bhattacharjee RR, Kotal A, Mandal TK. Synthesis of spongy gold nanocrystals with pronounced catalytic activities. *Langmuir* 2006;22(17), 7141-7143. doi: 10.1021/la060939j

Schrurs F, Lison D (2012) Focusing the research efforts. *Nature nanotechnology* 7(9): 546-548. doi:10.1038/nnano.2012.148

Shin SH, Ye MK, Kim HS, Kang HS (2007) The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol* 7: 1813–1818. doi:10.1016/j.intimp.2007.08.025

Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18(22), 225103.

Silva T, Pokhrel LR, Dubey B, Tolaymat TM, Maier KJ, Liu X (2014) Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. *Science of the Total Environment* 468-469: 968-976. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.09.006

Sonavane G, Tomoda K, Makino K (2008) Biodistribution of colloidal gold nanoparticles after intravenous administration: effect of particle size. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 66(2): 274-280. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.07.004

Sondi I, Salopek-Sondi B (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, 275(1), 177-182.

Song JY, Kim BS (2009). Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess and biosystems engineering*, 32(1), 79.

Tang J, Xiong L, Wang S, Wang J, Liu L, Li J, Yuan F, Xi T (2009) Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol* 9: 4924–4932. doi: 10.1166/jnn.2009.1269

Tian JN, Liu JQ, Hu Z, Chen XG (2005) Interaction of wogonin with bovine serum albumin. *Bioorg Med Chem* 13:4124–4129. doi:10.1016/j.bmc.2005.02.065

Vannini C, Domingo G, Onelli E, De Mattia F, Bruni I, Marsoni M, Bracale M (2014) Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. *Journal of plant physiology* 171(13);1142-1148. doi:10.1016/j.jplph.2014.05.002

Wijnhoven SW, Peijnenburg WJ, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EH, Roszek B, Biddchops J, Gosens I, Van De Meent D, Dekkers S, De Jong WH, van Zjjverden M, Sips AJAM, Geertsma RE (2009) Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 3(2): 109-138. doi: 10.1080/17435390902725914

Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman BP, Auffan M, Wiesner M, Bernhardt ES (2011) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental science & technology* 45(6);2360-2367. doi: 10.1021/es103995x

Zhang J, Han B, Chen J, Li Z, Liu Z, Wu W (2005) Synthesis of Ag/BSA composite nanospheres from water-in-oil microemulsion using compressed CO₂ as antisolvent. *BiotechnolBioeng* 89 (3): 274-279. doi: 10.1002/bit.20290

V. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO - BADAWCZYCH

a) Podsumowanie dorobku naukowo-badawczego

Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje łącznie 20 oryginalnych prac naukowych w tym 17 opublikowanych w czasopismach z listy JCR oraz 29 doniesień konferencyjnych. Sumaryczne zestawienie informacji na temat dorobku naukowo - badawczego oraz wskaźników dokonań naukowych ujęto w formie tabeli (Tab. 5). Ponadto badania opisane powyżej były zostały wykonane w ramach sześciu projektów, w których byłam wykonawcą lub członkiem zespołu badawczego.

Tabela 5. Wskaźniki dokonań naukowych wg najważniejszych baz danych (stan na dzień 12.03.2018)

	Baza danych		
	Web of Science	Scopus	Google Scholar
Liczba publikacji	17	16	20
Liczba cytowań	147	155	200
h-index	8	8	8
Sumaryczny IF <i>Impact Factor (IF) - zgodnie z rokiem opublikowania (w przypadku publikacji z 2017 i 2018 podano IF₂₀₁₆)</i>	35,356		
Sumaryczna ilość punktów za publikacje wg MNiSzW Punkty MNiSW przypisano na podstawie ujednolicony wykaz czasopism naukowych za lata 2013-2016 z dnia 26.01.2017.	407		

b) przebieg pracy naukowo - badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

Działalność naukową rozpocząłam w roku 2005 wraz z podjęciem studiów doktoranckich na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Dołączyłam wówczas do zespołu Zakładu Biochemii Analitycznej kierowanego przez prof. dr hab. Andrzeja Kozika, zajmującego się między innymi badaniami nad

wiązaniem się i aktywacją układu generacji kinin na powierzchni komórek. Moje badania stanowiły kontynuację problematyki badawczej podjętej przez mnie w pracy magisterskiej pt.: „Badanie wiązanie wielkocząsteczkowego kininogenu do powierzchni komórek mysich makrofagów RAW 264,7”, napisanej pod opieką prof. dr hab. Andrzeja Kozika.

Badania, które wykonałam w ramach pracy doktorskiej (2005-2009) dotyczyły scharakteryzowania wiązania poszczególnych białek układu kontaktu przez monocyty i makrofagi, a następnie opisanie mechanizmu przebiegu procesu generacji kinin na powierzchni komórek, od adsorpcji białek do generacji kinin. Badania te w szczególności polegały na:

- scharakteryzowanie adsorpcji wszystkich białek układu generacji kinin na powierzchni modelowych komórek monocytów i makrofagów,
- wyznaczenie parametrów wiązania poszczególnych białek przez monocyty i makrofagi,
- określenie poprzez jakie białka receptorowe HK oraz FXII wiązane są przez monocyty i makrofagi,
- analizę wpływu enzymów proteolitycznych makrofagów na stabilność i funkcję kininogenu
- scharakteryzowanie procesu produkcji kinin z białek układu kontaktu zaadsorbowanych na powierzchni monocytów i makrofagów, lub pozostałych w roztworze.

Uzyskane wyniki złożyły się na moją rozprawę doktorską zatytułowaną „Adsorpcja i aktywacja układu generacji kinin na powierzchni monocytów i makrofagów”, napisaną pod opieką prof. dr hab. Andrzeja Kozika, którą obroniłam w dniu 9 października 2009 roku.

Mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora obejmował: 4 publikacje oryginalne (o łącznym IF =**8,05** i punktach MNiSW =**81**) oraz **7** komunikatów konferencyjnych.

c) przebieg pracy naukowo - badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu tytułu doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii, rozpoczęłam pracę w Instytucie Biologii, Uniwersytetu Pedagogicznego im. KEN w Krakowie.

Mój dorobek naukowy po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje: **16** publikacji oryginalnych z tego **13** opublikowanych w czasopismach z bazy JCR (łączny IF, zgodny z rokiem opublikowania – **27,306**; sumaryczna liczba punktów MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania – **326**). Ponadto, wyniki badań zostały zaprezentowane w formie **22** komunikatów konferencyjnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Spośród

prac naukowych, opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora, 7 oryginalnych prac eksperymentalnych weszło w skład osiągnięcia naukowego, będącego przedmiotem postępowania habilitacyjnego.

d) Kierunki prowadzonych badań nie uwzględnione w osiągnięciu naukowym

Moje zainteresowania badawcze skupiły się wokół cytotoksyczności nanocząstek metali względem komórek, ale także zaangażowałam się w inne badania związane zarówno z procesami zachodzącymi w roślinach w warunkach suszy, oraz odpowiedzią komórek roślinnych na działanie mykotoksyny. Mniejsze tematy badawcze stanowiły zagadnienia rozwijane w licznych pracach magisterskich, których byłam opiekunem naukowym.

Profil moich zainteresowań badawczych jest ukierunkowany głównie na zagadnienia związane z toksycznością wybranych substancji na poziomie komórkowym zarówno względem komórek zwierzęcych jak i roślinnych.

➤ Cytotoksyczność wybranych pestycydów względem ludzkich komórek

Pestycydy zwane też środkami ochrony roślin są to zarówno substancje naturalne jak i syntetycznie otrzymane substancje chemiczne, których głównym zadaniem jest zwalczanie szkodliwych bądź niepożądanych organizmów. Do wspomnianych szkodliwych organizmów zalicza się grzyby, owady jak i chwasty występujące zazwyczaj na obszarach uprawnych bądź na terenach hodowli. Współcześnie występujące środki ochrony roślin stanowią zazwyczaj mieszaninę złożoną z kilku związków. Najistotniejszą rolę odgrywa tak zwana substancja aktywna. Oprócz wspomnianej substancji, w skład pestycydu wchodzi inne substancje wspomagające jej działanie. Pestycydy są bardzo powszechnym przedmiotem badań w dzisiejszych czasach. Ich nazwa wywodzi się z języka greckiego *pestis* – zaraza, i z języka łacińskiego *caedo* – zabijać, są to substancje które mogą bardzo negatywnie wpływać na stan naszego zdrowia, a nawet życia. Przy obecnym stanie gospodarki i konkurencji na rynku, hodowcy i sprzedawcy usiłują osiągnąć jak najlepsze rezultaty w hodowli i uprawie roślin i dążą do uzyskania produktów o ładnym, przyciągającym konsumenta wyglądzie. W wielu przypadkach uzyskują zamierzony efekt przy użyciu substancji biobójczych. W moich badaniach ocenie poddano działanie trzech popularnych substancji z grupy insektycydów, fungicydów i herbicydów na komórki ludzkiego układu immunologicznego. Są to deltametryna, chlorotalonil i glifosat. Na poziomie komórkowym stwierdziłam różnice w cytotoksyczności badanych pestycydów zależną od stężenia, ale także od długości czasu narażenia komórek, oraz różną odporność dla badanych linii komórkowych. Celem, badań

jest określenie możliwego mechanizmu działania wybranych pestycydów na komórki poprzez badanie aktywności biochemicznej komórek. Publikacja w przygotowaniu.

➤ *Wpływ kwasu hialuronowego na ludzkie komórki*

Hialuronian (hialuronian sodu, kwas hialuronowy, HA), jest składnik macierzy pozakomórkowej (ECM), jest naturalnym polisacharydem o dużej masie molowej. HA należy do grupy substancji znanych jako glikozoaminoglikany (GAG) o masie molowej do 10^7 Da. Ten wielkocząsteczkowy GAG ulega rozkładowi *in vivo* na mniejsze fragmenty, a nawet na oligosacharydy. Czynnikiem sprawczym depolimeryzacji HA są zarówno reaktywne formy tlenu, jak i białka enzymatyczne, takie jak hialuronidaza, beta-glukuronidaza lub heksozaminidaza. W swojej makrocząsteczkowej postaci hialuronian odgrywa rolę homeostatyczną organizmu, nie będąc w stanie aktywować procesów immunologicznych.

Pomimo szerokiego zastosowania kwasu hialuronowego zarówno w medycynie jak i kosmetologii brakuje danych o bezpośrednim wpływie jego cząsteczek na komórki. Oddziaływanie tego związku ściśle zależy zarówno od formy podania, jak również od rozmiaru cząsteczek HA. Dlatego celem badań było zbadanie wpływu HA o różnej masie cząsteczkowej, na funkcjonowanie komórek ludzkiego układu immunologicznego. Zbadano żywotność komórek względem długości HA oraz czasu inkubacji, a także oznaczono zawartość uniwersalnego mediatora stanu zapalnego (NO) w medium hodowlanym komórek traktowanych HA. Następnie sprawdzano, czy HA wiąże się na powierzchni wybranych komórek. Wykonano również doświadczenia określające bezpośredni wpływ tego związku na modelowe membrany komórkowe. Badania prowadzone były w ramach projektu „Strukturalna i funkcjonalna charakterystyka oddziaływania kwasu hialuronowego oraz produktów jego degradacji z komórkami” Nr 28 Badania Młodych Naukowców przyznany przez Dziekana Wydziału Geograficzno-Biologicznego UP (2015). Wyniki badań zostały opublikowane (Załącznik nr 5, C13).

➤ *Wpływ zearalenonu na komórki*

W ramach współpracy z prof. dr hab. Marią Filek z Instytutu Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk uczestniczyłam w badaniach nad cytotoksycznością zearalenonu (mykotoksyny) względem zarówno komórek roślinnych i ludzkich, oraz poszukiwaniu ewentualnych substancji o działaniu ochronnym dla komórek. Zearalenon (ZEA), produkowany przez niektóre gatunki *Fusarium*, jest jedną z najsilniejszych, niesteroidowych substancji z grupy ksenoestrogenów. W dotychczasowych badaniach wykazano wysoką

cytotoksyczność badanej mykotoksyny, a także wstępnie określono mechanizm działania na komórki ludzkie. Selenian (VI) sodu (Na_2SeO_4) badano jako substancję ochronną, która wykazuje działanie, począwszy od wpływu na ekspresję genów, przez reakcje z reaktywnymi formami tlenu do regulacji układu odpornościowego. W ramach własnego zadania badawczego przeprowadziłam testy żywotności i integralności błony komórkowej, które wykazały cytotoksyczność ZEA zależną od dawki i linii komórkowej. Utrata integralności błony komórkowej wywołana przez ZEA jest redukowana przez dodatek selenianu. Stwierdzono, że dodatek selenianu zmniejsza efekt cytotoksyczny wywołany przez ZEA. Efektem traktowania ZEA komórek było obniżenie produkcji cytokin prozapalnych, które były redukowane przez dodatek selenianu. Stwierdzono, także wpływ ZEA na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w komórkach ludzkich. Badania prowadzone są w ramach projektu: „Strukturalno-funkcjonalne modyfikacje w układach naturalnych i modelowych membran komórek pszenicy eksponowanych na toksynę grzybową (zearalenon) - badania ochronnych właściwości selenu i brasinosteroidów” Nr 2014/15/B/NZ9/02192. Publikacja w przygotowaniu. Wyniki badań prezentowane były w formie dwóch doniesień konferencyjnych (Zał. nr 5, D18 i D29).

➤ *Adaptacja roślin w warunkach stresu suszy i zasolenia*

W ramach współpracy z Instytutu Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk prowadziłam również badania nad reakcją wrażliwych i odpornych genotypów pszenicy (*Triticum aestivum* L.) na stres suszy i stres solny. Stres suszy stanowi główny czynnik wpływający na metabolizm roślin i obniżenie jakości i ilości plonów roślin uprawnych. Informacja o tolerancji roślin na czynniki stresogenne pozwala wprowadzić do uprawy genotypy o zwiększonej odporności na stresy środowiskowe. Oceniano takie parametry jak zmiany przyrostu świeżej masy, zawartości wody, wypływu elektrolitów z tkanek oraz stopnia peroksydacji lipidów, w stosunku do roślin kontroli. Badano także aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz osmoportektantów (prolina, poliaminy). Stwierdzono, przydatność parametrów biochemicznych takich, jak oznaczanie zawartości proliny czy poliamin jako wskaźnika zdolności danych genotypów roślin do adaptacji w warunkach zarówno stresu suszy jak i zasolenia. Stwierdzono, że stresowi suszy towarzyszy zmniejszenie przyrostu świeżej masy roślin i zawartości wody w tkankach oraz wzrost wypływ elektrolitów z komórek i peroksydacji lipidów błonowych. Badania te pozwoliły na opisanie mechanizmu działania stresu suszy u odmian pszenicy odpornych i wrażliwych. Badania te prowadzone były w ramach projektu „Fizykochemiczne wskaźniki oddziaływań poliamin z innymi

antyoksydantami w warunkach stresu suszy i zasolenia” Numer projektu: 556/N-/COST/2009/0 - projekt międzynarodowy niewspółfinansowany Akcja COST FA0605 INPAS oraz w ramach projektu „Badanie stanu osmotycznego w adaptacji do warunków suszy” Nr UDA-POIG.01.03.01-00-101/08-00. Wyniki badań ukazały się w formie publikacji (Załącz. nr 5, C12). oraz były prezentowane w formie 7 doniesień konferencyjnych (Załącz. nr 5, D10, D11, D13, D14, D15, D16, D20).

Anna Barabasz