VILNIAUS UNIVERSITETAS GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

GODA GRIGORIANAITĖ

Skirtingų dydžių sidabro ir aukso nanodalelių genotoksiškumo tyrimai žmogaus periferinio kraujo limfocituose *in vitro*

Bakalauro baigiamasis darbas

Genetikos studijų programa

Darbo vadovė Dokt. Milda Babonaitė

Vilnius 2023

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS4
SANTRAUKA5
SUMMARY
ĮVADAS7
Uždaviniai:
1. LITERATŪROS APŽVALGA9
1.1. Nanodalelių klasifikacija ir įvairovė9
1.2. Nanodalelių sintezės mechanizmai10
1.3. Nanodalelių patekimo į organizmą mechanizmai11
1.4. Nanodalelių patekimo į ląstelę mechanizmai12
1.5. Genotoksinės nanodalelių savybės14
1.6. Aukso nanodalelės15
1.6.1. Aukso nanodalelių biologinis poveikis ir panaudojimo galimybės15
1.7. Sidabro nanodalelės16
1.7.1. Sidabro nanodalelių biologinis poveikis ir panaudojimo galimybės16
1.8. Nanodalelių genotoksiškumo įvertinimo metodai17
1.8.1. Kometos metodas17
1.8.2. Kometos metodo pagrindiniai principai ir ypatumai
1.8.3. Nanodalelių tyrimų kometos metodų ypatumai17
1.9. Sustabdytos citokinezės mikrobranduolių (CBMN) metodas
1.9.1. Metodo principai ir ypatumai18
1.10. Kometos ir CBMN metodų panaudojimo galimybės nanodalelių genotoksiškumui vertinti
2. MEDŽIAGOS IR METODAI
2.1. Tiriamoji medžiaga
2.2. Reagentai ir tirpalai
2.3. Kraujo mėginių paėmimas ir limfocitų išskyrimas23
2.4. Ląstelių veikimas tiriamąja medžiaga23
2.5. Nanodalelių patekimo į ląstelę analizė tėkmės citometrijos metodu24
2.6. Nanodalelių citotoksiškumo tyrimai24
2.7. Sidabro ir aukso nanodalelių genotoksiškumo įvertinimas kometos metodu26
2.7.1. Preparatų paruošimas ir ląstelių įterpimas į agarozę
2.7.2. Lizė, elektroforezė ir neutralizacija26

2.7.3. Preparatų dažymas ir analizė27
2.8. Sidabro nanodalelių genotoksiškumo įvertinimas sustabdytos citokinezės mikrobranduolių (CBMN) metodu
2.8.1. Kraujo mėginių paėmimas ir limfocitų kultyvavimas
2.8.2. Limfocitų fiksavimas27
2.8.3. Limfocitų preparatų paruošimas ir dažymas28
2.9. Statistinė duomenų analizė
3. REZULTATAI
3.1. Aukso nanodalelių (AuND) tyrimai
3.1.1. AuND dydžio analizė30
3.1.2. AuND patekimo į ląstelę analizė30
3.1.3. AuND citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai31
3.2. Sidabro nanodalelių (AgND) tyrimai
3.2.1. AgND dydžio analizė32
3.2.2. AgND patekimo į ląstelę analizė33
3.2.3. Sidabro nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai
3.2.4. Sidabro nanodalelių genotoksiškumo tyrimai sustabdytos citokinezės mikrobranduolių (CBMN) metodu34
4. REZULTATŲ APTARIMAS
IŠVADOS41
ASMENINIS INDĖLIS42
PADĖKA
LITERATŪROS SĄRAŠAS43

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AO (angl. acridine orange) – akridino oranžinis;

AuND - aukso nanodalelės;

AgND - sidabro nanodalelės;

BDI - branduolio dalijimosi indeksas;

CBMN (angl. cytokinesis block micronucleus assay) – sustabdytos citokinezės mikrobranduolių metodas;

Cyt-B (angl. Cytochalasin B) – citochalazinas B;

DMSO (angl. dimethyl sulfoxide) - dimetilsulfoksidas;

EDTA (angl. ethylenediaminetetraacetic acid) – etilendiamintetraacto rūgštis;

EtBr (angl. ethidium bromide) – etidžio bromidas;

FHA (angl. Phytohaemagglutinin) - fitohemagliutininas;

LDH (angl. lactate dehydrogenase test) – laktato dehidrogenazės išsiskyrimo metodas;

LMP (angl. low melting point) – žemos lydymosi temperatūros;

ND-nanodalelės;

NMP (angl. normal melting point) - normalios lydymosi temperatūros;

PBS (angl. phosphate buffered saline) – fosfatinis buferis;

PVP (angl. polyvinylpyrrolidone) – polivinilpirolidonas;

RNS (angl. reactive nitrogen species) - reaktyvios azoto dalelės;

ROS (angl. reactive oxygen species) - reaktyvios deguonies dalelės;

VILNIAUS UNIVERSITETAS GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

GODA GRIGORIANAITĖ

Skirtingų dydžių sidabro ir aukso nanodalelių genotoksiškumo tyrimai žmogaus periferinio kraujo limfocituose *in vitro*

Bakalauro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Aukso (Au) ir sidabro (Ag) nanodalelės, dėl unikalių elektrinių, mechaninių, terminių ir optinių savybių, sulaukė didelio susidomėjimo biomedicinos srityje. Tačiau, nerimą kelia šių nanodalelių citotoksinis ir genotoksinis potencialas. Šiame darbe buvo tiriamos skirtingų dydžių (5 ir 40 nm) aukso ir 35 nm dydžio sidabro nanodalelių citotoksiškumas ir genotoksiškumas žmogaus periferinio kraujo limfocituose, taikant trumpalaikę (1/3 val.) ir ilgalaikę (24 val.) inkubaciją. Nanodalelių citotoksiškumui įvertinti naudotas akridino oranžo/ etidžio bromido dažų mišinio testas. Aukso nanodalelių genotoksiškumui nustatyti naudotas šarminis kometos metodas, o sidabro nanodalelių genotoksiškumui įvertinti naudoti šarminis kometos ir CBMN metodai.

Atlikti citotoksiškumo tyrimo rezultatai parodė, kad aukso nanodalelės po trumpalaikės ir ilgalaikės inkubacijos nesumažino ląstelių gyvybingumo daugiau nei 20 %. Nustatyta, kad AgND po trumpalaikės inkubacijos ląstelių gyvybingumo nesumažino daugiau nei 20 %, tačiau buvo citotoksiškos ląstelėms po ilgalaikės inkubacijos. Tyrimo rezultatai parodė, kad 5 nm AuND indukavo daugiau pirminių DNR pažaidų ląstelėse nei 40 nm dydžio AuND po 3 ir 24 val. inkubacijos. Taikant kometos metodą nustatyta, kad AgND indukavo daugiau DNR pažaidų po 24 val. inkubacijos nei po 1 valandos. Taip pat pastebėta AuND ir AgND genotoksiškumo priklausomybė nuo laiko ir dozės. AgND tirtos ir CBMN metodu, tačiau jos nesukėlė statistiškai reikšmingo mikrobranduolių dažnio padidėjimo ląstelėse.

VILNIUS UNIVERSITY LIFE SCIENCES CENTER

GODA GRIGORIANAITĖ

Genotoxicity Studies of Silver (Ag) and Gold (Au) Nanoparticles of Different Sizes in Human Peripheral Blood Lymphocytes *In vitro*

Bachelor thesis

SUMMARY

Gold (Au) and silver (Ag) nanoparticles (NPs) received great interest in the field of biomedicine due to their unique electrical, mechanical, thermal, and optical properties. However, one of the main concerns of these nanoparticles is their cytotoxic and genotoxic potential. This study investigated the cytotoxicity and genotoxicity of different sizes of 5 and 40 nm gold and 35 nm silver nanoparticles in human peripheral blood lymphocytes after short–term (1/3 hours) and long–term (24 hours) incubations. The acridine orange/ethidium bromide dye mixture test was used to evaluate the cytotoxicity of nanoparticles. An alkaline comet assay was used to determine gold and silver nanoparticle genotoxicity, CBMN assay was used to assess AgNP's genotoxicity. The cytotoxicity and genotoxicity of the nanoparticles were evaluated using peripheral blood from 6 different donors.

The results of the cytotoxicity study showed that gold nanoparticles (5 and 40 nm) did not reduce cell viability by more than 20 % after short – term and long – term incubation. After short – term incubation AgNPs did not reduce cell viability more than 20 % but they were cytotoxic to the cells after long – term incubation. The results showed that 5 nm AuNPs induced more primary DNA damage in the cells than 40 nm AuNPs after 3 and 24 hours incubation. The comet assay showed that AgNPs induced more DNA damage after 24 hours than it did after 1 hour incubation. A time and dose dependence of the genotoxicity of AuND and AgND was also observed. AgNPs genotoxicity was also tested by CBMN method but nanoparticles did not induce a statistically significant increase in the frequency of micronuclei in the cells.

ĮVADAS

Nanodalelės, tai dalelės, kurių dydis svyruoja nuo 1 iki 100 nm, jos yra klasifikuojamos į skirtingas klases priklausomai nuo jų fizikinių arba optinių savybių, formosarba dydžio (Khan et al. 2019). Nanodalelės gali patekti į žmogaus organizmą per odą, virškinamąjį ar kvėpavimo traktus ir sukelti neigiamą genotoksinį poveikį (Shang et al., 2014). Pastebėta, kad dažniausiai nanodalelių genotoksinis poveikis yra sukeliamas dėl oksidacinio streso ir reaktyviųjų deguonies rūšių gamybos. Taip yra sutrikdoma normali ląstelės veikla ir sukeliamos DNR pažaidos arba programuota ląstelės mirtis (Shukla et al., 2021).

Šiame darbe tirtos 5 ir 40 nm dydžio aukso nanodalelės ir 35 nm dydžio sidabro nanodalelės. Aukso nanodalelės gali būti pritaikomos įvairiose srityse – elektronikoje, pramonėje ir biomedicinoje (Kong et al., 2017). Vis dažniau atkreipiamas dėmesys į aukso nanodalelių pritaikymą biomedicinoje, ypač vėžio diagnostikoje ir terapijoje, antigenų ir vaistų pernašoje (Cabuzu et al., 2015; Hu et al., 2020). Sidabro nanodalelės taip pat pasižymi priešvėžiniu poveikiu ir gali būti pritaikomos vėžio gydymui (Ding et al., 2019). Taip pat sidabro nanodalelės turi antibakterinių savybių ir gali slopinti net antibiotikams atsparių bakterijų augimą (Bruna et al., 2021). Platėjant nanodalelių pritaikymui įvairiose srityse, didėja tiesioginės sąveikos su gyvais organizmais rizika, todėl norint saugiai taikyti nanodaleles klinikoje ir praktikoje, būtina tirti jų citotoksinį ir genotoksinį poveikį įvairiems organizmams.

Šiame tyrime aukso ir sidabro nanodalelių citotoksiškumui vertinti buvo naudojamas akridino oranžo/etidžio bromido dažų testas, kuris yra pagrįstas ląstelių membranos integralumo suardymu (Wu et al., 2015). Aukso nanodalelių genotoksiškumas buvo vertintas šarminiu kometos metodu, o sidabro nanodalelių genotoksiškumas įvertintas dviem metodais – šarminiu kometos ir mikrobranduolių. Kometos metodu gali būti aptinkamos pirminės DNR pažaidos – viengrandininiai ir dvigrandininiai DNR trūkiai ir šarmui jautrios vietos, o taikant mikrobranduolių metodą įvertinamos sukeltos chromosominės pažaidos (Grzesiakowska et al., 2021; Fenech, 2000).

Tyrimo tikslas: Įvertinti skirtingo dydžio sidabro ir aukso nanodalelių galimą citotoksinį ir genotoksinį poveikį žmogaus periferinio kraujo limfocituose (PKL) *in vitro*.

Uždaviniai:

1. Įvertinti sidabro ir aukso nanodalelių gebėjimą patekti į PKL ląsteles tėkmės citometrijos metodu

2. Ištirti sidabro ir aukso nanodalelių citotoksiškumą žmogaus periferinio kraujo limfocituose

3. Įvertinti abiejų nanodalelių galimą genotoksinį poveikį kometos metodu

4. Įvertinti sidabro ir aukso nanodalelių poveikio trukmės įtaką indukuotų pirminių DNR pažaidų kiekiui

5. Įvertinti sidabro nanodalelių galimą genotoksinį poveikį mikrobranduolių metodu

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Nanodalelių klasifikacija ir įvairovė

Nanodalelės, remiantis Europos komisijos pateiktu apibūdinimu, yra struktūros, kurių dydis yra nuo 1 iki 100 nm (European Commission, 2011). Nanodalelės skirstomos į skirtingas grupes atsižvelgiant į jų dydį, morfologiją, sandarą ir chemines savybes.

Pagal formą nanodalelės gali būti sferinės, trikampės arba kvadratinės, ovalios, spiralinės, prizmės arba lazdelės formos (Gatoo et al. 2014). Pagal sudėtį, išskiriamos šešios pagrindinės nanodalelių grupės: anglies pagrindo, keramikinės, puslaidininkės, polimerinės, lipidų pagrindo ir metalų nanodalelės (Khan et al. 2019). Grafenas, anglies nanovamzdeliai (angl. carbon nanotubes – CNT) ir anglies kvantiniai taškai priklauso anglies pagrindo nanodalelių grupei. Šios nanodalelės pasižymi dideliu elektriniu, šiluminiu laidumu, išskirtinėmis mechaninėmis savybėmis, aukštu stabilumu, geru konduktyvumu, žemu toksiškumu ir yra nekenksmingos aplinkai (Khan et al., 2019). Šios grupės nanodalelės gali būti naudojamos kaip biosensoriai, vėžio gydymui ir vaistų pernašai (Maiti et al., 2019). Keramikinės nanodalelės yra dažniausiai sudarytos iš metalo oksidų karbidy, fosfaty, karbonaty metalų ir metaloidų, tokių kaip kalcis, titanas, silicis ir kiti. Dėl unikalių savybių, tokių kaip atsparumas karščiui ir cheminis inertiškumas, šios nanodalelės galėtų būti pritaikomos biomedicinos srityje (Thomas et al., 2015). Puslaidininkės nanodalelės yra tarsi tarpinis variantas tarp metalų ir nemetalų, todėl jos pasižymi abiem grupėm būdingais požymiais optoelektrinėmis ir magnetinėmis savybėmis. Šios nanodalelės yra plačiai naudojamos fotokatalizės, fotooptikos ir elektroniniuose prietaisuose (Tiwari and Rohiwal, 2019). Polimerinės nanodalelės yra sudarytos iš natūralių ar sintetinių polimerų, jos gali būti užpildytos įvairiais junginiais, kurie patalpinami polimerinėje šerdyje arba gali adsorbuotis ant jos paviršiaus. Dažniausiai šios nanodalelės naudojamos vaistų pernašoje. Dėka šių nanodalelių specifinės struktūros, jos išlieka stabilios įvairioje aplinkoje ir gali sėkmingai pernešti veikliąją medžiagą, kuria yra užpildytas nanodalelės vidus į tikslinę vietą (Gagliardi et al., 2019; Khan et al., 2019). Lipidinio pagrindo nanodalelės dažniausiai yra sferinės formos ir susideda iš lipidinių fragmentų. Kaip ir polimerinės nanodalelės, lipidinės nanodalelė turi tvirtą šerdį, sudarytą iš lipidų, kurios matricoje yra tirpių lipofilinių molekulių. Lipidinio pagrindo nanodalelės gali būti plačiai pritaikomos biomedicinos srityje - vėžio gydime, vaistų pernašoje (Sheoran et al., 2022; Kumar et al., 2019). Metalų nanodalelės gaunamos iš metalo pirmtakų tokių kaip auksas, cinkas, sidabras, geležis ir kiti. Šios nanodalelės dažniausiai turi metalinę šerdį, sudarytą iš neorganinio metalo arba metalo oksido, ir apvalkala, sudaryta iš organinės arba neorganinės medžiagos, arba metalo oksido (Yaqoob et al., 2020). Metalų nanodalelės gali pasižymėti unikaliomis optoelektrinėmis ir antibakterinėmis savybėmis, mechaniniu ir terminiu stabilumu. Šios nanodalelės gali būti pritaikomos įvairiose srityse – kosmetikoje, magnetiniuose ar elektroniniuose prietaisuose,

biomedicinoje (Yaqoob et al., 2020).

1.2. Nanodalelių sintezės mechanizmai

Nanodalelių sintezė suskirstomi į dvi pagrindines klases: "iš apačios į viršų" (*angl. Bottom–up approach*) ir "iš viršaus į apačią" (*angl. Top– down approach*). Šios dvi kategorijos vėliau skirstomos į dar smulkesnius poklasius, atsižvelgiant į reakcijoms reikalingas sąlygas ir naudojamus protokolus (Biswas et al., 2012).

Taikant "iš apačios į viršų" sintezės metodą, atomai yra kaupiami iki klasterių, o vėliau iki nanodalelių. Dažniausiai naudojami "iš apačios į viršų" metodai yra zolių–gelių (angl. *sol–gel*), spiningo (angl. *spining*), cheminis nusodinimas garais (CVD), pirolizė ir biosintezė. Zolių–gelių metodas yra dažniausiai naudojamas dėl jo paprastumo. Zoliai – tai koloidiniai tirpalai, kuriuose yra suspenduotos kietosios medžiagos, o geliai – tai tvirta makromolekulė panardinta į tirpiklį. Šioje cheminėje reakcijoje, metalų oksidai ir chloridai yra naudojami kaip pirmtakai šio metodo reakcijose, jie yra išsklaidomi karštame tirpale juos purtant, maišant ar naudojant sonikaciją, gaunant sistemą, kurią sudaro skystoji ir kietoji fazės. Vėliau šios fazės gali būti atskiriamos norint atkurti nanodaleles įvairiais metodais – nusodinimu, centrifugacija, filtravimu, o drėgmė vėliau pašalinama džiovinant (Ramesh et al., 2013). Kitas naudojamas "iš apačios į viršų" metodas yra spiningo metodas.

Naudojant šį būdą nanodalelių sintezė vyksta besisukančiame disko reaktoriuje (SDR). Šiame diskoreaktoriuje gali būti kontroliuojami įvairūs fizikiniai parametrai, tokie kaip temperatūra, taip pat, šisreaktorius yra užpildytas azoto dujomis tam, kad išvengti nepageidaujamų cheminių reakcijų.

Diskas yra sukamas skirtingais greičiais, į jį yra pumpuojamas tirpalas su pirmtaku ir vandeniu, rezultate, sukimasis sukelia atomų ar molekulių susiliejimą. Tokie gauti dariniai vėliau yra surenkami ir išdžiovinami (Mohammadi et al., 2014). Pirolizė, tai dažniausiai naudojamas industrinis metodas, norint gauti didelius kiekius nanodalelių. Pagrindinis šio metodo principas, tai nanodalelių pirmtako deginimas ugnimi. Tai dažniausiai skystos arba dujinės formos pirminė medžiaga, kuri yra leidžiama per mažo skersmens vamzdelį į krosnį, ir taip esant aukštam slėgiui yra deginama (Kammler et al., 2001). Pirolizė, tai paprastas ir ekonomiškas būdas dideliems nanodalelių kiekiams gauti ir tai yra pagrindinis šio metodo privalumas. Biosintezė, tai yra aplinkai saugus metodas, norint gauti nanodaleles, kurios nėra toksiškos ir gali būti lengvai suskaidomos. Šis metodas pasitelkia bakterijas, augalų ekstraktus, grybus kartu su pirminėmis medžiagomis, kurių dėka gaunamos nanodalelės. Šiuo metodu gautos nanodalelės pasižymi unikaliomis savybėmis, kurios yra plačiai naudojamos biomedicinoje (Li et al., 2011).

Taikant "iš viršaus į apačią" metodą stambios medžiagos yra redukuojamos iki mažesnių, nanodydžio darinių. Geriausiai žinomi ir dažniausiai naudojami "iš viršaus į apačią" metodai, tai mechaninis frezavimas, nanolitografija, lazerinė abliacija, terminis skaidymas. Naudojant

nanolitografinius procesus, dažniausiai taikomi – optiniai, elektrono pluošto, nanoimprintų ir skenavimo zondų litografijos metodai. Litografija, tai norimos formos ar struktūros spausdinimo procesas ant šviesai jautrios medžiagos, kuri selektyviai pašalina dalį medžiagos tam, kad sukurti norimą formą ir struktūrą (Pimpin et al., 2012). Pagrindiniai nanolitografijos privalumai, tai kad iš vienos nanodaleles galima gauti norimo dydžio ir formos klasterius, tačiau reikalinga brangi ir sudėtinga įranga. Terminis skaidymas, tai endoterminis cheminis skilimas, naudojant karštį, kurio metu skyla cheminiai ryšiai esantys junginyje. Nanodalelės yra gaminamos skaidant metalus specifinėse temperatūrose (Odularu, 2018).

1.3. Nanodalelių patekimo į organizmą mechanizmai

Nanodalelės į žmogaus organizmą gali patekti per odą, tiesioginės injekcijos metu, per virškinamąjį ir kvėpavimo traktus (Shang et al., 2014). Žinoma, kad kosmetikos produktuose tokiuose kaip kremai nuo saulės yra naudojamos titano ir cinko oksidų nanodalelės, kurios efektyviai veikia sugerdamos ultravioletinius spindulius (Monteiro–Riviere et al., 2011). Tokios dalelės turi tiesioginę sąveiką su oda, nors oda yra fizinis barjeras saugantis organizmą nuo aplinkoje esančių medžiagų patekimo, pastebėta, kad nanodalelės gali kauptis aplink plaukų folikulus, o kai šie tampa atviri plaukų augimo metu, nanodalelės gali patekti į gilesnius odos sluoksnius (Wang et al., 2018). Kiti potencialūs nanodalelių patekimo į organizmą keliai peržengiantys odos barjerą yra per prakaito liaukas ir odos pažeidimus (Simko et al., 2010).

Nanodalelės į žmogaus organizmą taip pat gali patekti per kvėpavimo sistemą. Kvėpavimo sistemą sudaro plaučiai, kurie susideda iš dviejų funkcinių sričių– kvėpavimo takų, kur oras keliauja iš arba į plaučius ir dujų mainų srities (bronchai, broncheolės, alveolės), kur vyksta deguonies ir anglies deoksido mainai. Dujų mainų srityje, barjeras tarp alveolės sienelės ir kapiliarų yra labai plonas, todėl oras, esantis alveolėje, yra tik keliais nanometrais nutolęs nuo tekančio kraujo. Nanodalelėms patekus į organizmą per kvėpavimo takus, dėl jų mažo dydžio jos gali kauptis alveolių srityje, taip pat prasiskverbti pro alveolių epitelio ir kapiliarų endotelio ląsteles ir taip patekti kraujotakos sistemą bei kitus vidaus organus (Sonwani et al., 2021). Norint ištirti nanodalelių poveikį ir pasiskirstymą kvėpavimo takuose, sveiki savanoriai vyrai buvo paveikti skirtingo dydžio aukso nanodalelėmis. Nustatyta, kad po 2 valandų poveikio nanodalelėmis plaučių funkcija nepakito, tačiau po 24 valandų aukso nanodalelės buvo randamos tiriamų vyrų kraujo ir šlapimo mėginiuose. Taip pat pastebėta, kad tiriamuosius paveikus 5 nm aukso nanodalelėmis jų koncentracija kraujo ir šlapimo mėginiuose buvo didesnė nei 30 nm dydžio aukso nanodalelių (Miller et al., 2017).

Nanodalelės yra dažnai naudojamos maisto pramonėje, norint patobulinti maisto savybes – maistingumą, galiojimo terminą, kokybę, arba kuriant biologiškai skaidomas maisto pakavimo medžiagas (Zhou and McClements, 2022). Taip nanodalelės gali patekti į žmogaus virškinamąjį

traktą. Žmogaus virškinamasis traktas turi tiesioginį kontaktą su visomis pratenkančiomis medžiagomis, išskyrus dujas, todėl šioje dalyje vyksta pagrindinis medžiagų pasisavinimas (Bergin and Witzmann, 2013). Tik ypač mažos dalelės geba difuziškai prasiskverbti pro žarnos epitelį ir patekti į kraują, o vėliau ir į kitus vidaus organus (Bergin and Witzmann, 2013). Žinoma, kad nanodalelės, kirtusios žarnos sienelę gali patekti ne tik į kraują bet ir į limfinę sistemą (Vitulo et al., 2022). Nanodalelėms patekus į žarnyną, kaip minėta aukščiau, gali patekti į kraujotakos sistemą, tačiau didžioji jų dalis yra pašalinama iš organizmo išsituštinant (Vitulo et al., 2022).

1.4. Nanodalelių patekimo į ląstelę mechanizmai

Egzistuoja du medžiagų pernešimo per plazminę membraną mechanizmai: pasyvusis ir aktyvusis. Pasyviuoju būdu energija nėra reikalinga ir medžiagos į ląsteles patenka pagal koncentracijos gradientą. Aktyviosios medžiagų pernašos metu yra reikalinga energija – adenozintrifosfatas (ATP) (Foroozandeh et al., 2018). Dažniausiai nanodalelės į ląstelę patenka naudodamos aktyvųjį pernašos mechanizmą, vadinamą endocitoze. Nanodalelėms pasiekus išorinę ląstelės membraną, šios gali sąveikauti su plazminės membranos arba ekstraląstelinės matricos komponentais ir endocitozės būdu patekti į ląstelę. Endocitozė sukelia membranos invaginaciją taip leisdama nanodalelėms patekti į ląstelės vidų. Įvykus membranos invaginacijai susidaro endocitozinės pūslelės, kurios vėliau yra transportuojamos į specializuotą tarpląstelinę vietą skirtą šių dalelių rūšiavimui. Endocitozė skirstoma į penkias klases: fagocitozė, makropinocitozė, nuo klatrino priklausoma endocitozė (1.1 pav.) (Behzadi et al., 2017).



1.1 pav. Schema vaizduojanti nanodalelių patekimo į ląstelę būdus (pagal Donahue et al., 2019).

Dažniausiai nanodalelės į ląstelę patenka nuo klatrino arba kaveolino priklausomos endocitozės būdu. Nuo klatrino priklausoma endocitozė yra nanodalelių pernašos kelias, kurio metu plazminės membranos receptoriai, esantys klatrinu turtingame regione, sąveikauja su nanodalelėmis ir formuoja ligando-receptoriaus kompleksą. Šis kompleksas supakuojamas į pūsleles, padengtas klatrinu ir taip patenka į ląstelės vidų. Ląstelės viduje klatrino dangalas nuo pūslelių yra suardomas ir pūslelės susilieja su ankstyvosiomis endosomomis. Ankstyvosiose endosomose esančios nanodalelės pasiekia lizosomas, įvyksta susiliejimas ir pastarosios yra išlaisvinamos (Foroozandeh et al., 2018). Pastebėta, kad klatrinu padengtos pūslelės dažniausiai būna 100 nm skersmens dydžio, todėl šiuo keliu į ląsteles gali patekti panašaus dydžio nanodalelės (Rennick et al., 2021). Nuo kaveolino priklausoma endocitozė vyksta panašiai kaip nuo klatrino priklausoma endocitozė. Pagrindinis skirtumas yra tas, kad pūslelės su nanodalelėmis yra padengiamos kaveolinu ir formuoja struktūrą, vadinamą kaveolėmis (Kou et al., 2013). Šiuo keliu dažniausiai pernešamos 50 – 100 nm dydžio nanodalelės, tačiau pastebėta ir didesnių darinių, tokių kaip bakterijos ar didesnės nanodalelės pernaša (Wang et al., 2009; Rennick et al., 2021).

1.5. Genotoksinės nanodalelių savybės

Genotoksiškumas, tai tam tikros medžiagos gebėjimas pažeisti genetinę informaciją (Ren et al., 2017). Toks pokytis gali sukelti ilgalaikius ir paveldimus genetinės medžiagos pokyčius, mutageniškumą arba nestabdomą ląstelių dalijimąsi ir augimą (Shukla et al., 2021). Nanodalelių sukeltas genotoksiškumas skirstomas dvi pagrindines grupes – pirminį ir antrinį genotoksiškumą. Atsižvelgiant į nanodalelių veikimo mechanizmą, pirminis genotoksiškumas gali būti tiesioginis ir netiesioginis (1.2 pav.) (Kohl et al., 2020).





Pirminis tiesioginis genotoksiškumo mechanizmas pasireiškia nanodalelėms patekus į branduolį ir mechaniškai arba cheminiu surišimu sąveikaujant su genetine medžiaga. DNR gali būti paveikta interfazės ir mitozės metu. Sąveikai įvykus interfazės metu sutrikdoma DNR replikacija, transkripcija ir pažeidžiama DNR struktūra, sąveikai įvykus mitozės metu indukuojami aneugeniniai arba klastogeniniai efektai (Barabadi et al., 2019; Magdolenova et al., 2013). Pirminio netiesioginio genotoksiškumo mechanizmo metu nanodalelės gali sąveikauti su įvairiomis molekulėmis ir baltymais, svarbiais ląstelės ciklo kontrolei, DNR replikacijai ir reparacijai. Taip pat žinoma, kad nanodalelės gali pažeisti mitochondrijų veiklą ir skatinti reaktyvių deguonies rūšių formavimąsi, kurios pažeidžia DNR (Manke etal., 2013). Antrinis genotoksiškumo mechanizmas pasireiškia dėl susidariusių uždegiminių procesų, kuriuos sukelia fagocitų – makrofagų arba neutrofilų, aktyvacija (Vallabani and Karlsson, 2022). Nanodalelės patekusios į organizmą gali kauptis audiniuose ir organuose ir skatinti uždegiminius procesus, akyvuojant fagocitus. Dėl fagocitų aktyvacijos formuojasi ROS ir RNS dalelės galinčios pažeisti DNR (Evans et al., 2017).

1.6. Aukso nanodalelės

1857 metais M. Faradėjus pirmasis susintetino tikslaus dydžio (10 nm skersmens) ir termiškai stabilias aukso nanodaleles. Manoma, kad būtent šis tyrimas žymi nanotechnologijų srities atsiradimo pradžią (Hassan et al., 2022). Tačiau, įdomu paminėti, kad aukso nanodalelių istorija prasidėjo gerokai anksčiau – senovės Romoje gyvenantys amatininkai užsiėmė spalvoto stiklo gamyba, o produkcijos metu pagamintas rausvos spalvos stiklas tokią spalvą įgijo dėl gamybos metu susiformavusių aukso nanodalelių (Giljohann et al., 2010). Dabar aukso nanodalelės yra vienos iš stabiliausių nanodalelių, pasižymi ypatingomis optinėmis savybėmis ir plačiu pritaikymo spektru (Hu et al., 2020).

1.6.1. Aukso nanodalelių biologinis poveikis ir panaudojimo galimybės

Aukso nanodalelės tapo vienu iš pagrindinių tyrimų objektų dėl jų plataus pritaikymoįvairiose srityse – elektronikoje, nanotechnologijose ir biomedicinoje (Kong et al., 2017). Pagrindinis šių nanodalelių privalumas – lengva sintezė cheminės redukcijos būdu ir aukštas stabilumo lygis (Amina and Guo, 2020). Aukso nanodalelės gali sąveikauti su įvairiais ligandais, DNR, aminorūgštimis, baltymais, peptidais ir oligonukleotidais (Hu et al., 2020). Šios nanodalelės pasižymi aukštu antibakteriniu aktyvumu, kuris priklauso nuo jų dydžio ir dozės. Manoma, kad toks antibakterinis aktyvumas prieš patogenines bakterijas, ypač Gram neigiamas, gali tapti vienu iš pagrindinių būdų ateityje kovoti prieš patogenines bakterijas (Shamaila et al., 2016). Dėl unikalių šių nanodalelių savybių, sintezės metu, jas galima padengti įvairiais ligandais ar vaistinėmis medžiagomis, todėl aukso nanodalelės gali būti naudojamos kaip vaistų pernešėjos į tikslinę vietą.

bet ir į ląstelės organeles, todėl aukso nanodalelės gali būti naudojamos efektyvesnei vaistų pernašai. Aukso nanodalelės taip pat pasižymi unikaliomis optinėmis ir paviršiaus savybėmis dėl kurių jos gali būti naudojamos vėžio gydymui. Dėl šių savybių aukso nanodalelės geba patekti į naviką ir išsilieti į auglio mikroaplinką, kurioje esantis pH skiriasi nuo ląstelei įprasto, leidžiant kontroliuoti antivėžnių vaistų pernašą nanodalelėmis į tikslinę vietą (Gao et al., 2021).

Aukso nanodalelės pasižymi plačiu pritaikymo spektru įvairiose srityse, tačiau pastebėta, kad šios nanodalelės gali turėti neigiamą poveikį sveikoms ląstelėms – gali skatinti reaktyvių deguonies rūšių formavimąsi, mitochondrijų ir lizosomų pažeidimus, DNR pažaidas ir ląstelės apoptozę (Li et al., 2010). Tiriant šių nanodalelių poveikį kepenų ląstelėms pastebėtas mitochondrijų membranos potencialo sumažėjimas, oksidacinio streso indukcija ir ląstelės mirtis. Svarbus aspektas dirbant su nanodalelėmis yra jų dydis. Pastebėta, kad skirtingo dydžio aukso nanodalelės skirtingai veikia ląsteles ir jų organeles, tyrimai rodo, kad nanodalelės, didesnės nei 60 nm pasižymi mažesniu toksiškumo lygiu nei mažesnės nanodalelės (Enea et al., 2020).

1.7. Sidabro nanodalelės

Sidabro nanodalelės (AgND) yra vienos iš labiausiai mokslininkus dominančių nanomedžiagų naudojamų biomedicinoje. Dėl savo unikalių savybių sidabro nanodalelės gali būti pritaikytos pramonės, maisto, vaistų, kosmetikos ir biomedicinos srityse (Zhang et al., 2016).

1.7.1. Sidabro nanodalelių biologinis poveikis ir panaudojimo galimybės

Sidabro nanodalelės pasižymi antibakteriniu, priešgrybeliniu, antivirusiniu ir priešvėžiniu poveikiu. Viena iš pagrindinių šių nanodalelių tiriamų savybių yra jų antibakterinis poveikis Gram neigiamoms ir teigiamoms bakterijoms (Zhang et al., 2016). Pastebėta, kad mažesnės AgND pasižymi stipresniu antibakteriniu poveikiu ir gali slopinti net antibiotikams atsparių bakterijų augimą. AgND antibakterinis poveikis pagrįstas ND sąveika su bakterijų vidine membrana ją destabilizuojant, taip padidinamas membranos pralaidumas ir įvyksta apoptozė (Bruna et al., 2021). Sidabro nanodalelės taip pat pasižymi priešvėžiniu poveikiu ir gali būti naudojamos vėžio gydimui. Atlikti tyrimai su 50 nm dydžio AgND parodė, kad šias nanodaleles nukreipus į susiformavusio naviko audinius, dėka, sustiprėjusio prasiskverbimo ir sulaikymo efekto (angl. *permeation and retention effect*) suaktyvėjo jų kaupimasis naviko audinyje, kas skatino temperatūros kilimą tikslinėje vietoje ir vėžinių ląstelių apoptozę (Ding et al., 2019). Taip pat sidabro nanodalelės gali būti naudojamos antivėžinių vaistų pernašoje. AgND, sintezės metu, padengiamos priešvėžiniais vaistais ir nukreipiamos į naviko audinį. Modifikuotoms nanodalelėms patekus į naviko audinį vaistai atpalaiduojami ir lengviau pasisavinami vėžinių ląstelių, kas lemia efektyvesnį vėžio gydimą (Gomes et al., 2021).

Dėl plataus sidabro nanodalelių pritaikymo biomedicinoje ir kasdieniniuose produktuose, tai padidina tikimybę šioms dalelėms tiesiogiai sąveikauti su aplinka ir žmogaus organizmu. Atlikti tyrimai su AgND parodė, kad šios nanodalelės gali sukelti oksidacinį stresą, todėl gali susidaryti DNR pažaidos ir galiausiai įvykti ląstelės apoptozė (Ferdous and Nemmar, 2020). Tiriant AgND poveikį alveolių epitelio ląstelėms buvo pastebėta, kad praėjus 24 valandų inkubacijai buvo stebima nuo koncentracijos priklausoma ląstelių mirtis. Po 48 valandų poveikio 20 nm dydžio AgND indukavo DNR pažaidų susidarymą ir metalotioninų overkspresiją (Ferdous and Nemmar, 2020). Metalotioninai – maži cisteinu turtingi baltymai, kurie yra svarbūs metalų homeostazėje, saugantys ląstelę nuo sunkiųjų metalų sukeliamo toksinio poveikio, DNR pažaidų susidarymo ir oksidacinio streso (Si and Lang, 2018). Stebima metalotioninų overekspresija, veikiant ląsteles AgND, įrodo šių nanodalelių sukeliamą neigiamą citotoksinį poveikį ląstelėms.

1.8. Nanodalelių genotoksiškumo įvertinimo metodai

Didėjant susidomėjimui nanodalelėmis ir jų pritaikymu pramonėje, kyla susidomėjimas jų toksiškumu, taip pat ir metodais, skirtais pastarąjį ištirti. Norint pilnai įvertinti nanodalelių genotoksinį poveikį būtina atlikti tyrimus, kurie ištirtų šių dalelių genotoksinį potencialą, sukeliamas genų mutacijas ir chromosomines pažaidas. Kol kas nėra nustatyti tikslūs reikalavimai kokie testai turėtų būti atlikti norint nustatyti nanodalelių genotoksiškumą, tačiau rekomenduojama naudoti dviejų testų sistemą – genų mutacijų nustatymui: hipoksantino-guanino fosforiboziltransferazės (HPRT) arba pelės limfomos timidino kinazės (MLA) testus ir chromosomų pažaidoms nustatyti: mikrobranduolių arba chromosomų aberacijų testus *in vitro* (Verdon et al., 2022). Kita dažnai naudojama testų kombinacija yra kometų ir mikrobranduolių metodai *in vitro*, kur kometos metodas leidžia įvertinti pirminių DNR pažaidų formavimąsi, o mikrobranduolių testas – aneugeninį ar klastogeninį tiriamosios medžiagos poveikį (Magdolenova et al., 2014).

1.8.1. Kometos metodas

Kometos metodas arba pavienių ląstelių elektroforezės gelyje metodas, yra paprastas ir sąlyginai pigus metodas, naudojamas tirti DNR grandininius trūkius, susidariusius dėl genotoksinių veiksnių, pavienėse ląstelėse. Šiuo metodu DNR pažaidų ir reparacijos lygis gali būti analizuojamas organizmo arba rūšies ląsteliniame lygmenyje. Dažniausiai naudojamas šarminis kometos metodas, kurio metu gali būti įvertinami viengrandininiai, dvigrandininiai DNR trūkiai ir abazinės vietos (Grzesiakowska et al., 2021).

1.8.2. Kometos metodo pagrindiniai principai ir ypatumai

Pagrindinis kometų metodo veikimo principas, tai elektroforezės metu vykstanti fragmentuotos DNR migracija agarozės gelyje, suformuojant į kometas panašias struktūras. Kometų metodas gali būti skirtingų tipų – neutralus, šarminis ir papildytas fermentine reakcija (Jiang et al., 2023).Neutralus kometos metodas leidžia analizuoti tiriamosios medžiagos sukeltus dvigrandininius DNR trūkius, o šarminis metodo variantas parodo platesnį pažaidų spektrą – be dvigrandinių DNR trūkių galima analizuoti ir šarmui jautrias vietas – viengrandininius DNR trūkius, apurinines ir apirimidinines vietas. Fermentine reakcija papildytas kometos metodas skirtas nustatyti specifines bazių pažaidas, kurių galima nepastebėti naudojant aukščiau nurodytus kometos metodo variantus. Dažniausiai naudojami fermentai yra specifinės endonukleazės – formamidopirimidino DNR glikozilazė (Fpg) arba 8 – oksoguanino DNR glikozilazė (OGG1), kurios atpažįsta oksiduotus purinus ir endonukleazė III (EndoIII), atpažįstanti ir kerpanti DNR grandinę ties oksiduotais pirimidinais (El Yamani et al., 2022). Šis metodo variantas leidžia kiekybiškai įvertinti ląstelėje susidariusių pažaidų kiekį (Collins, 2017).

1.8.3. Nanodalelių tyrimų kometos metodų ypatumai

Analizuojant nanodalelių toksiškumą kometos metodu, būtina atsižvelgti į tam tikrus

parametrus, kad gaunami duomenys būtų teisingi ir patikimi. Vienas iš svarbių nanodalelių tyrimo aspektų, tai jų koncentracija. Nanodalelių koncentracija turėtų būti nuo visiškai netoksiškos iki sukeliančios apie 20% tiriamų ląstelių mirtį (Huk et al., 2015). Patikimos teigiamos, neigiamos ir tirpiklio (kai reikia) kontrolės turi būti įtraukiamos į eksperimentą. Neigiama kontrolė rodo DNR pažaidų kiekį, kai ląstelės nebuvo paveiktos nanodalelėmis, o teigiama kontrolė rodo DNR pažaidų kiekį, kai ląstelės paveikiamos žinoma, DNR gradinių trūkius sukeliančia medžiaga, dažniausiai vandenilio peroksidu (Collins et al., 2014).

1.9. Sustabdytos citokinezės mikrobranduolių (CBMN) metodas 1.9.1. Metodo principai ir ypatumai

Mikrobranduolių (MB) arba sustabdytos citokinezės mikrobranduolių (CBMN) testas yra vienas iš dažniausiai naudojamų metodų, nanodalelių genotoskiškumo tyrimuose. Šis metodas leidžia įvertinti tiriamosios medžiagos aneugeninį ir klastogeninį poveikį analizuojant mikrobranduolių dažnį. Mikrobranduoliai yra struktūros, susiformavusios iš chromosomų lūžių arba atsilikusių chromosomų ląstelių dalijimosi metu (Sioen et al., 2020). Telofazės metu aplink susidariusius chromosomų lūžio fragmentus susiformuoja branduolinis apvalkalas, kuris vėliau įgauna į branduolį panašią struktūrą, skirtumas – susidarę į branduolį panašūs dariniai, yra nuo 1/10 – osios iki 1/100 – osios pradinio branduolio dydžio, todėl jie vadinami mikrobranduoliais. (Beedanagari, 2017).

Taikant sustabdytos citokinezės mikrobranduolių metodą donoro kraujas yra sumaišomas su mitybiniu tirpalu, kuris sudarytas iš mitybinės terpės, embrioninio veršiuko serumo, fitohemagliutinino (FHA) ir gentamicino. Praėjus 24 valandų inkubacijai į mėginius yra įvedama tiriamoji medžiaga, inkubuojama ir galiausiai į mėginius įvedamas citochalazinas B. Citochalazinas B (Cyt B) yra citokinezės inhibitorius, todėl ląstelės negali pilnai pasidalinti ir vienoje ląstelėje galime matyti keletą branduolių, priklausomai nuo to kurioje ląstelės fazėje citokinezė buvo sustabdyta (Fenech, 2000). Cyt B į mėginius gali būti įvedamas skirtingai – kartu su nanodalelėmis, mėginius jau paveikus nanodalelėmis arba po poveikio nanodalelėmis jas pašalinus iš mėginių. Mūsų tyrimo metu Cyt B įvestas po poveikio nanodalelėmis (ang. co-delayed treatment), nes manoma, kad Cyt B gali turėti įtakos nanodalelių patekimui į ląstelę (Fernández-Bertólez et al., 2021).

Nudažytiems stikliukams išdžiūvus atliekama analizė naudojant šviesinį mikroskopą. Analizės metu skaičiuojamos tik dvibranduolės ląstelės ir jose susidarę mikrobranduoliai, taip užtikrinama, kad analizės metu surinkti duomenys yra patikimi tarp skirtingą proliferacijos lygį turinčių ląstelių populiacijų (Fenech, 2000). Analizės metu svarbu surinkti bent 1000 dvibranduolių ląstelių. Vertinamos tik tos dvibranduolės ląstelės, kurios atitinka šiuos reikalavimus:

1. Dvibranduolės ląstelės turi nesuirusią branduolio ir citoplazmos membraną

2. Ląstelės branduoliai yra apgaubti tos pačios citoplazmos membranos

 Branduoliai gali būti sujungti nukleoplazminiu tilteliu, kurio dydis nėra didesnis nei ¼ dalis branduolio skersmens

4. Ląstelės branduoliai yra panašaus dydžio ir formos – apvalūs arba ovalūs, panašios spalvos ir nepersidengiantys

5. Branduoliai gali dalinai persidengti ir būti susilietę

6. Branduoliai nėra apoptuojantys.

Vertinant ląstelėse susidariusius mikrobranduolius, analizuojami tik tie, kurie atitinka šiuos reikalavimus:

1. Mikrobranduoliai neatspindi šviesos ir yra panašios spalvos, kaip branduoliai esantys ląstelėje ir yra lengvai atskiriami nuo kitų darinių, pavyzdžiui nanodalelių

2. Mikrobranduoliai yra pilnai atsiskyrę nuo pagrindinių ląstelės branduolių

3. Mikrobranduolių skersmuo svyruoja nuo 1/16 iki 1/3 dalies, ląstelėje esančių,

pagrindinių branduolių skersmens

4. Mikrobranduoliai yra nesuirę, aiškios ovalios arba apvalios formos

5. Mikrobranduoliai nesiliečia, nepersidengia su ląstelės branduoliais

1.10. Kometos ir CBMN metodų panaudojimo galimybės nanodalelių genotoksiškumui vertinti

Kometos ir mikrobraduolių testai nanodalelių genotoksiškumo tyrimuose dažnai naudojami kartu, kaip vienas kitą papildantys metodai (Magdolenova et al., 2014). Souza ir kiti (2016) įvertino 10 ir 100 nm dydžio sidabro nanodalelių citotoksiškumą ir genotoksiškumą dviejose skirtingose kiniško žiurkėno kiaušidžių fibroblastų ląstelių linijose CHO – K1 ir CHO – XRS5. Ląstelių gyvybingumas buvo įvertintas kolorimetriniu metodu, kuriuo nustatomas ląstelių metabolinis aktyvumo lygis, nanodalelių genotoksiškumas įvertintas mikrobranduolių ir šarminiu kometos metodu. Ląstelių kultūros buvo veiktos skirtingomis sidabro nanodalelių koncentracijomis (0,025 iki 2,5 μg/mL), 24 valandas. Naudojant kometos metodą didžiausias DNR kiekis uodegoje nustatytas CHO – K1 ir CHO – XRS5 ląstelėse, esant 2,5 μg/mL, 10 nm dydžio sidabro nanodalelių koncentracijai. Taikant mikrobranduolių metodą pastebėta, kad didžiausias dažnis mikrobranduolių ir nukleoplazminių tiltų buvo CHO – XRS5 ląstelių linijoje, jas veikiant 100 nm sidabro nanodalelėmis. Nustatyta, kad sidabro nanodalelės yra toksiškos, taip pat, ląsteles veikiant didesnėmis nanodalelėmis yra sukeliamas stipresnis citotoksinis ir genotoksinis poveikis nei veikiant ląsteles mažesnėmis nanodalelėmis (Souza et al., 2016).

Battal ir kiti (2015) įvertino skirtingų dydžių – 6, 20 ir 40 nm silicio dioksido (SiO₂) nanodalelių genotoksinį ir mutageninį poveikį žmogaus periferinio kraujo limfocituose *in vitro*. Genotoksinis SiO₂ nanodalelių poveikis buvo įvertintas naudojant kometų ir mikrobranduolių metodus. Ląstelės buvo paveiktos 150 µg/mL skirtingų dydžių SiO₂ nanodalelių koncentracija. Kometos metodu nustatyta, kad 6 nm SiO₂ nanodalelės sukėlė daugiausiai DNR pažaidų lyginant su didesnėmis nanodalelėmis. Taikant mikrobranduolių metodą, nustatytas nedidelis mikrobranduolių susidarymo dažnis mėginiuose, tačiau gauti rezultatai – 6 nm (4,50 ± 0,50), 20 nm (5,00 ± 1,00), 50 nm (5,00 ± 00) nebuvo statistiškai reikšmingi lyginant su neigiama kontrole. Nustatyta, kad SiO₂ nanodalelės, taikant kometos metodą, sukelia statistiškai reikšmingą, nuo dydžio priklausomą DNR pažaidų padidėjimą mėginiuose, lyginant su kontrole, tačiau taikant mikrobranduolių metodą, nanodalelės statistiškai reikšmingai mikrobranduolių kiekio ląstelėse nepadidino. Pastebėta, kad mažesnės SiO₂ nanodalelės yra labiau genotoksiškos, lyginant su didesnėmis, tirtomis nanodalelėmis, dėl jų sukuriamo didesnio paviršiaus ploto mėginyje (Battal et al., 2015).

Lebedová ir kiti (2018) įvertino 5 ir 50 nm dydžio sidabro, aukso ir platinos nanodalelių genotoksiškumo priklausomybę nuo dydžio žmogaus bronchų epitelio ląstelėms. Taikant kometos metodą, tiriamos ląstelės buvo inkubuotos 48 valandas, jas paveikus, 1, 10 ir 20 µg/mL nanodalelių koncentracija. Nustatyta, kad sidabro nanodalelės indukavo statistiškai nereikšmingą pirminių DNR pažaidų susidarymą nepriklausomai nuo dozės ir dydžio, tačiau 5 nm aukso nanodalelės sukėlė daugiau pirminių DNR pažaidų lyginant su 50 nm AuND. Taikant mikrobranduolių metodą nei vienos tirtos nanodalelės nepadidino mikrobranduolių skaičiaus ląstelėse statistiškai reikšmingai. Nustatyta, kad aukso nanodalelės sukelia nuo dydžio priklausomą genotoksinį poveikį ląstelėms, tačiau sidabro nanodalelių genotoksiškumas nepriklausė nuo dydžio ar koncentracijos (Lebedová et al., 2018).

Bastos ir kiti (2017) įvertino 30 nm dydžio, citratu padengtų, sidabro nanodalelių (AgND) genotoksinį poveikį žmogaus keratinocitų ląstelių linijai (HaCaT) kometos ir mikrobranduolių (CBMN) metodu. Ląstelės buvo veiktos skirtingomis AgND koncentracijomis (10 µg/mL ir 40 µg/mL) 24 ir 48 valandas. Taikant kometos metodą nustatyta, kad stipriausią genotoksinį poveikį ląstelėms sukėlė 40 µg/mL AgND koncentracija po 48 valandų inkubacijos, taip pat pastebėta, kad ilgesnis, 48 valandų, inkubacijos laikas, abiejose nanodalelių koncentracijose, sukėlė daugiau DNR pažaidų lyginant su trumpesne, 24 valandų, inkubacija. Mikrobranduolių rezultatų analizė atskleidė, kad mikrobranduolių dažnis tiriamoje ląstelių linijoje po poveikio 40 µg/mL nanodalelių koncentracija, abejais laiko tarpsniais padidėjo statistiškai reikšmingai, lyginant su kontrole. Abiem metodais gauti rezultatai atskleidė, kad citratu dengtos 30 nm dydžio AgND yra genotoksiškos HaCaT ląstelių linijai (Bastos et al., 2017).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Tiriamoji medžiaga

Šiame darbe tirtos skirtingų dydžių aukso nanodalelės (40 nm - SKU 741981, 5 nm – SKU 74194) įsigytos iš Sigma–Aldrich įmonės (JAV) ir polivinilpirolidonu (PVP) padengtos 35 nm

dydžio sidabro nanodalelės gautos iš "Rho Nano" įmonės. Prieš kiekvieną tyrimą nanodalelių suspensija sonikuota 35 kHz dažnio bangomis, 20 - 30 minučių sonikatoriumi Bandelin (Electronic GmbH & Co, Vokietija), siekiant išvengti nepageidaujamos nanodalelių aglomeracijos.

Aukso nanodalelių papildoma dydžio analizė atlikta naudojant dinaminės šviesossklaidos metodą (angl. *Dynamic Light Scattering – DLS*), Zetasizer Nano sistema (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, UK). Taip pat įvertintas nanodalelių suspensijos stabilumas (zeta potencialas). Matavimai atlikti fizinių ir technologijos mokslų centre (FTMC) su dr. Medeinos Steponavičiūtės pagalba.

Tiriamieji: Aukso ir sidabro nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimams kraujas buvo imamas iš sveikų, nerūkančių savanorių alkūninės venos. Tyrimams naudotas šešių skirtingų donorų kraujas (A, B, C, D, E, F) (2.1 lentelė).

Donoras	Lytis	Amžius, metai	Nanodalelės	Tyrimas	
А	Vyras	36	AgND	Kometos tyrimas	
В	Moteris	29	AgND, AuND	Kometos tyrimas, CBMN	
C	Moteris	22	AgND, AuND	Kometos tyrimas	
D	Moteris	23	AgND, AuND	Kometos tyrimas, CBMN	
E	Vyras	22	AgND, AuND	Kometos tyrimas, CBMN	
F	Vyras	25	AgND, AuND	Kometos tyrimas	

2.1 lentelė. Kraujo donorų duomenys

2.2. Reagentai ir tirpalai

Naudoti reagentai:

- 1. Agarozė (NMP, normal melting point) (Carl Roth GmbH+Co. KG, Vokietija)
- 2. Agarozė (LMP, low melting point) (MBI fermentas, JAV)
- 3. Mitybinė terpė RPMI 1640 (Sigma– Aldrich Co., JAV)
- 4. Lymphoprep TM (Axis– Shield, Norvegija)
- 5. Vandenilio peroksidas (0,03%) (Gemi, Przedsiębiorstwo Produkcji Farmaceutyznej,

Lenkija)

- 6. Na₂EDTA (Carl Roth GmbH+Co. KG, Vokietija)
- 7. NaOH (Carl Roth GmbH+Co. KG, Vokietija)
- 8. Tris HCl (Carl Roth GmbH+Co. KG, Vokietija)
- 9. NaCl (B. Braun Melsungen AG, Vokietija)

- 10. DMSO (Sigma– Aldrich Co., JAV)
- 11. Triton X 100 (Carl Roth GmbH+Co. KG, Vokietija)
- 12. Etidžio bromidas (0,2 % vandeninis tirpalas) (Carl Roth GmbH+Co. KG, Vokietija)
- 13. Distiliuotas vanduo
- 14. Akridino oranžas (Sigma–Aldrich Co., JAV)
- 15. Fosfatinis buferis (PBS), pH 7,4 (Sigma–Aldrich Co., JAV)
- 16. Dimetilsulfoksidas (DMSO) (Sigma Aldrich Co., JAV)
- 17. PVP (Boai NKY Pharmaceuticlas Ltd., Kinija)
- 18. Embrioninis veršiukų serumas (Sigma Aldrich Co., JAV)
- 19. Fitohemagliutininas (FHA) (Biological industries, Izraelis)
- 20. Gentamicinas (Krka, Lietuva)
- 21. Citochalazinas B (AppliChem GmbH, Vokietija)
- 22. Ledinė acto rūgštis (Riedel-de Haen, Vokietija)
- 23. Metanolis (Chempur, Lenkija)
- 24. Giemsa dažai (Sigma Aldrich Co., JAV)
- 25. Kalio chloridas (Sigma Aldrich Co., JAV)
- 26. Doksorubicinas (Teva Pharma B.V., Nyderlandai)

Tyrimuose naudoti tirpalai ir jų sudėtinės dalys pateiktos 2.2 lentelėje. Tirpalams, kurių paruošimui tirpiklis nenurodytas, kaip tirpiklis buvo naudotas dejonizuotas vanduo (dH₂O).

2.2 lentelė. Naudoti tirpalai

Tirpalo pavadinimas	Paruošimas ir laikymo sąlygos		
Agarozės tirpalai (1%):			
NMP (angl. normal melting point) agarozėLMP	1 g agarozės/ 100 mL H ₂ O		
(angl. <i>low melting point</i>) agarozė	0,5 g agarozės/ 50 mL PBS		
Akridino oranžo ir etidžio bromido (AO/EB)	1 μL akridino oranžo (5 mg/mL) ir 1 μL etidžio		
dažų mišinys	bromido (3 mg/mL) ištiripinta 1mL PBS		
Etidžio bromidas (2 %)	1 mL etidžio bromido (1 mg/5 mL) ir 9 mL dH ₂ O		
Lizės huferis (nH-10**)	145 g/L		
NLCI No. EDTA	37,2 g/L		
	1,58 g/L		
Tris HCIDMSO*	111,11 mL/L		
Triton X–100*	11,11 mL/L		

Šarminis buferis (pH>13)	0,367 g/L		
Na ₂ EDTANaOH	12 g/L		
Neutralizacijos buferis (pH=7.5**) Tris HCl	63,03 g Tris HCl/L		
0,06 mg/mL doksorubicino tirpalas	10 mL 0,9 % NaCl ir 0,6 mg doksorubicino vaistinės medžiagos		
0,075 M kalio chlorido tirpalas	2,75 g KCl ir 500 mL H ₂ O		
1,25 mg/mL citochalazino B tirpalas	10 mg citochalazino B ir 4 mL DMSO. 1 mL gauto tirpalo sumaišoma su 1 mL DMSO		
Fiksatorius	Metanolis ir ledinė acto rūgštis, sumaišyti santykiu 5:1		

* Pilami į atšaldytą lizės tirpalą prieš pat naudojimą

** pH matuotas naudojantis Adwa AD 1020 matuokliu; pasiekti nurodytai pH reikšmei naudotas20 % NaOH tirpalas.

2.3. Kraujo mėginių paėmimas ir limfocitų išskyrimas

Kraujas surinktas iš alkūninės venos į specialių mėgintuvėlį su ličio heparinu (Vacunteiner®, Beliver Industrial Estate, JK). Nanodalelių genotoksiškumo įvertinimui, mikrobranduolių metodu, naudotas visas surinktas periferinis kraujas, o ND patekimo į ląstelę analizei, citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimams, kometos metodu, naudoti iš periferinio kraujo išskirti limfocitai.

Surinktas kraujas išpilstytas į centrifuginius mėgintuvėlius po 1 mL ir į kiekvieną iš jų papildomai įpilta po 1 mL mitybinės, RPMI 1640, terpės.Pastero pipete į kiekvieno mėgintuvėlio, su kraujo mišiniu, dugną atsargiai supiltas 1mL Lymphoprep TM. Mėginiai centrifuguoti 20 min. 800 × g greičiu (centrifuga Eppendorf5702). Pastero pipete surinktas atsiskyręs limfocitų tarpsluoksnis ir perpiltas į naują, sterilų mėgintuvėlį. Surinktų ląstelių mėginiai praskiesti 2 mL mitybinės terpės RPMI 1640 ir centrifuguoti 10 min 800 × g greičiu. Nusiurbtas supernatantas, virš ląstelių paliekant apie 0,5 mL terpės. Nuosėdos švelniai suplaktos ir surinktos vieno donoro ląstelės į bendrą mėgintuvėlį.

2.4. Ląstelių veikimas tiriamąja medžiaga

Prieš ląsteles veikiant tiriamąja medžiaga, hemocitometru tikrintas ląstelių optinis tankis. Su 10 μ L ląstelių suspensija užlietos abi hemocitometro kameros ir suskaičiuotas ląstelių skaičius visuose hemocitometro kvadratuose, vaizdą 100 kartų padidinus OLYMPUS CX41šviesiniu mikroskopu. Optimaliausias ląstelių optinis tankis yra 2 × 10⁴ 100 μ L terpės. Esant per dideliam ląstelių tankiui, suspensija papildomai praskiesta mitybine terpe. Ląstelių tankis viename

suspensijos mililitre apskaičiuotas pagal formulę:

Ląstelių koncentracija = Ląstelių skaičius/ $2/0.9 \times 100$

Patikrinus ląstelių tankį, suspensija išpilstyta į mėgintuvėlius po 1 mL. Ląstelės veiktos skirtingomis sidabro ir aukso nanodalelių koncentracijomis priklausomai nuo naudoto metodo (2.4 lentelė). Kaip tirpiklio kontrolė naudotas 0,2% PVP tirpalas (AgND) ir 0,01% citratinis buferis (AuND). Teigiamai kontrolei naudotas mitybine terpe skiestas 3% vandenilio peroksido tirpalas, galutinė koncentracija ląstelių suspensijoje – 0,25 μ g/mL (kometos metodas). Neigiamoje kontrolėje papildomos medžiagos nebuvo įvestos. Inkubacija vykdyta 37 °C temperatūroje.

2.4. lentelė. Skirtingos AuND ir AgND koncentracijos, naudotos nanodalelių citotoksiškumui ir
genotoksiškumui įvertinti šarminiu kometos ir CBMN metodais, taikant trumpalaikę ir ilgalaikę
inkubacijas.

	Tėkmės	Citotoksiškumo analizė (µg/mL)		Kometos metodas (µg/mL)	
	citometrija				
	(µg/mL)	1/3 val.	24 val.	1/3 val.	24 val.
	(24 val.)				
35 nm AgND	10, 20, 50	5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100	5, 10, 15, 20, 30	5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100	5, 10, 15, 20, 30
5 nm AuND	2, 2,5, 4,5	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 4,5, 7,5	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 4,5, 7,5	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 4,5, 7,5	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 4,5, 7,5
40 nm AuND	2, 2,5, 4,5	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 4,5	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 4,5	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 4,5	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2,5, 4,5

Praėjus poveikio su nanodalelėmis laikui ląstelės išimtos iš inkubatoriaus ir centrifuguotos 10 min. 800 × g greičiu. Supernatantas nusiurbtas, o likusios nuosėdos užpiltos 1 mL šviežios mitybinės terpės RPMI1640 ir švelniai supurtytos. Tokia ląstelių suspensija toliau naudota ND patekimo analizei tėkmės citometrijos metodu, gyvybingumo analizei akridino oranžo/etidžio bromido (AO/EB) dažų mišiniu ir pirminių DNR pažaidų analizei kometos metodu.

2.5. Nanodalelių patekimo į ląstelę analizė tėkmės citometrijos metodu

Aukso ir sidabro nanodalelių patekimas į žmogaus periferinio kraujo limfocitus įvertintas tėkmės citometrijos šviesos išsklaidymo metodu. Paruošta ląstelių suspensija perkelta į tėkmės citometro kiuvetę ir išmatuotas šoninės atsipindėtos šviesos (angl. *side scattering light*) intensyvumas, proporcingas ląstelės granuliuotumui, kuris parodo nanodalelių patekimą į ląstelę. Matavimai atlikti su neigiamos kontrolės ir ND paveikta ląstelių suspensijomis. Kiekvieno matavimo metu analizuota po 10000 ląstelių, gauti duomenys apdoroti internetine Floreada.io programa.

2.6. Nanodalelių citotoksiškumo tyrimai

Ląstelių gyvybingumas buvo tirtas kiekvieno kometos tyrimo metu. Skirtingomis nanodalelių koncentracijomis (2.4 lentelė) paveiktų ląstelių gyvybingumas lygintas su tirpiklio kontrole. Ant

objektinio stiklelio užlašinta 10 µL ląstelių suspensijos ir 2 µL su DNR besijungiančio dažų mišinio (AO/EB). Viskas sumaišyta pipetuojant ir uždengta dengiamuoju stikleliu. Mikroskopinė analizė vykdyta naudojant fluorescencinį Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonija) mikroskopą, 4 filtrą, vaizdą padidinus 400 kartų. Suskaičiuotos gyvos (žalios spalvos) ir negyvos (raudonos spalvos) ląstelės (2.2 pav.).



2.2 pav. Mikroskopinės nuotraukos, padarytos žmogaus periferinio kraujolimfocitus paveikus AO/EB dažų mišiniu. Raudonos ląstelės laikomos negyvomis, žalios – gyvomis (aut. fotografija)

Naudojant AO/EB metodą ištirta kiekviena, skirtinga nanodalelių koncentracija paveiktų, ląstelių suspensija, kuriose analizuota ne mažiau nei 100 ląstelių ir apskaičiuotas procentinis gyvybingų ir negyvybingų ląstelių skaičius.

2.7. Sidabro ir aukso nanodalelių genotoksiškumo įvertinimas kometos metodu 2.7.1. Preparatų paruošimas ir lastelių iterpimas į agarozę

Dieną prieš kometos tyrimą, stikliukai su nušlifuotais kraštais padengti 1 % normalios lydymosi temperatūros agaroze ir palikti sustingti horizontalioje pozicijoje. Taip patparuošti reikalingi lizės, neutralizacijos ir šarminis buferiai. Tyrimo dieną lizės buferis papildytas, pridedant 10 % DMSO ir 1 % Triton X–100 (2.2 lentelė).

Tyrimo dieną išlydyta 1 % LMP agarozė, naudojant Eppendorf Thermomixer comfort termomaišytuvą. Agarozei suskystėjus, temperatūra termomaišytuve sumažinta iki 40 – 45 °C. Ant iš vakaro paruoštų objektinių stiklelių užlašinta 40 μ L išlydytos 1 % LMP agarozės ir 40 μ L tiriamos ląstelių suspensijos. Mišinys sumaišytas pipetuojant ir uždengtas dengiamaisiais stikliukais. Procedūra su tuo pačiu mėginiu pakartota. Ant vieno objektinio stiklelio paruošti du atskiri agarozės, su įterptomis ląstelėmis, kvadratėliai. Iš kiekvieno jų vėliau analizuota po 50 ląstelių (viso vienam tiriamajam mėginiui analizuota 100 ląstelių) (2.3 pav.).



2.3 pav. Ląstelių įterpimo į agarozę ir išsidėstymo ant objektinių stiklelių schema Paruošti stikliukai su į agarozę įterptomis ląstelėmis 10 min laikyti šaldytuve, 4 °C temperatūroje. Sustingus agarozei dengiamieji stikleliai nuimti nuo visų mėginių.

2.7.2. Lizė, elektroforezė ir neutralizacija

Preparatai įdėti į vonelę ir užpilti atšaldytu lizės buferiu. Stikliukai laikyti 4 °C temperatūroje 1,5 val. Pasibaigus lizei objektiniai stikleliai perkelti į iki 5 °C atšaldytą elektroforezės vonelę COMET – 20 SYSTEM (Scie Plas, Jungtinė Karalystė) ir užpilti 540 mL atšaldytu 4 °C šarminiu buferiu. Taip mėginiai laikyti 20 minučių, kad atsipalaiduotų šarmui jautrios vietos. Praėjus 20 minučių įjungtas elektros srovės šaltinis ir 30 minučių vykdyta elektroforezė (įtampa – 16 V, srovės stirpis – 300 mA). Po elektroforezės mėginiai nedelsiant perkelti į indą su atšaldytu neutralizacijos tirpalu ir laikyti šaldytuve, 4 °C temperatūroje 30 min.

2.7.3. Preparatų dažymas ir analizė

Po neutralizacijos mėginiai buvo dažyti etidžio bromidu tamsoje. Ant kiekvieno agarozės kvadratėlio pilta po 80 µL etidžio bromido dažo ir palikta tamsoje, kambario temperatūroje 5 min. Vėliau stikliukai 5 minutes pamerkti į distiliuoto vandens vonelę. Po plovimo mėginiai uždengti dengiamaisiais stikleliais ir laikyti tamsoje, šaldytuve 4 °C temperatūroje iki analizės.

Mėginių analizė atlikta naudojant Nikon Eclipse 80i mikroskopą (Nikon, Japonija), vaizdas padidintas 400 kartų ir naudotas 3 filtras. Kometų analizė atlikta naudojant programą LUCIA (Čekija). Kiekviename mėginyje išanalizuota po 100 kometų ir įvertintas kiekvienoje iš jų, esantis procentinis DNR kiekis uodegoje.

2.8. Sidabro nanodalelių genotoksiškumo įvertinimas sustabdytos citokinezės mikrobranduolių (CBMN) metodu

2.8.1. Kraujo mėginių paėmimas ir limfocitų kultyvavimas

Kraujas surinktas iš alkūninės venos į specialių mėgintuvėlį su ličio heparinu (Vacunteiner®, Beliver Industrial Estate, JK). Ląstelių kultyvavimui naudotas mitybinis mišinys, kurį sudaro: 97,5 mL mitybinės terpės RPMI 1640, 15 mL embrioninio veršiuko serumo, 1,2 mL fitohemagliutinino (FHA) ir 1,2 mL gentamicino. Mėgintuvėliuose paruoštas mitybinis mišinys sumaišytas su donoro krauju ir inkubuotas termostate, kuriame palaikyta pastovi 37 °C temperatūra, 72 valandas.

Praėjus 24 valandoms nuo kraujo kultūros inkubacijos pradžios įvestos skirtingos sidabro nanodalelių koncentracijos: 5, 15, 20, 30 µg/mL ir tirpiklio kontrolė – PVP tirpalas. Teigiamai kontrolei naudotas doksorubicinas (DOX). Neigiamoje kontrolėje papildomos medžiagos nebuvo įvestos. Praėjus 20 valandų nuo nanodalelių įvedimo į kultūrą į kiekvieną iš mėgintuvėlių įvesta citochalazino B (galutinė koncentracija 6 µg/mL). Praėjus 72 valandoms nuo kultūros inkubacijos pradžios buvo atliktas jos fiksavimas.

2.8.2. Limfocitų fiksavimas

Pasibaigus kultivavimui kultūra buvo suplakta, perkelta į naujus mėgintuvėlius ir centrifuguota 8 min. 400 x g greičiu. Nuo kiekvieno mėgintuvėlio nusiurbtas supernatantas ir palikta apie 1 mL suspensijos. Likusios nuosėdos suplaktos ir suspenduotos užpylus 10 mL 4 °C 0,075 M KCl hipotoninio tirpalo. Kultūra buvo iškart centrifuguota 8 min. 400 x g greičiu ir centrifugavimui pasibaigus supernatantas nusiurbtas, mėgintuvėlyje paliekant apie 1 mL suspensijos. Kultūra fiksuota 3 kartus, naudojant acto rūgšties ir metanolio mišinio (1:5) fiksatorių. Pirmajai fiksacijai naudotas 0,9 % NaCl tirpalu praskiestas fiksatorius (1:1). Kiekvienas mėgintuvėlis su suspensija suplaktas ir į jį įpilta apie 10 mL skiesto fiksatoriaus. Mėgintuvėliai palikti 20 minučių kambario temperatūroje ir vėliau centrifuguoti 8 min. 400 x g greičiu. Viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbtas, nuosėdos suplaktos ir fiksavimo procedūra kartota du kartus naudojant neskiestą fiksatorių. Fiksacijai pasibaigus mėgintuvėliai uždengti sandarinimo plėvele Parafilm® M (Bemis, JAV) ir laikyti šaldiklyje –20 °C temperatūroje.

2.8.3. Limfocitų preparatų paruošimas ir dažymas

Kultūra centrifuguota 8 min. 300 x g greičiu, viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbtas ir mėgintuvėliuose palikta apie 1 mL suspensijos. Naudojant Pastero pipetę likusi suspensija suplakta ir 5 lašai suspensijos užlašinti ant nuriebalintų ir atšaldytų (10 min. –20 °C temperatūroje) objektinių stiklelių iš 3–5 cm aukščio. Stikleliai palikti džiūti kambario temperatūroje 24 valandas. Išdžiūvę stikliukai, 5 minutes nudažyti naudojant praskiestus "Giemsa" dažus (1 dalis dažų ir 20 dalių distiliuoto vandens). Pasibaigus dažymui stikliukai nuplauti tekančiu vandeniu, praskalauti distiliuotu vandeniu ir palikti išdžiūti.

Nudažytiems stikliukams išdžiūvus atlikta jų analizė. Mikrobranduolių skaičius buvo įvertintas nemažiau kaip 1000-yje dvibranduolių ląstelių, vadovaujantis 1.9.1 skyriuje pateiktais kriterijais. Preparatai analizuoti šviesiniu mikroskopu Nikon Eclipse 90i (Nikon, Japonija), 20x didinančiu objektyvu, mikrobranduolį suradus, jis tirtas 100x didinančiu objektyvu. Taip pat mikroskopu Euromex iScope IS.1152–EPL (Euromex, Nyderlandai), 20x didinančiu objektyvu analizuotas branduolio dalijimosi indeksas (BDI), kuris gautas įvertinus, kiek 500-uose ląstelių yra vienbranduolių (M1), dvibranduolių (M2) ir tris arba daugiau branduolių (M3) turinčių limfocitų. Branduolio dalijimosi indeksas apskaičiuotas pagal formulę: $BDI = \frac{(M1 + 2M2 + 3M3)}{500}$.

2.9. Statistinė duomenų analizė

Kometos tyrimas ir gyvybingumo analizės atliktos 5 kartus, su šešių skirtingų donorų periferinio kraujo limfocitais. Mikrobranduolių analizė buvo atlikta 3 kartus su trijų skirtingų donorų periferiniu krauju. Gautų duomenų apdorojimui naudotas Microsoft Excel (2019) XRealStats paketas. Nustatant ląstelių gyvybingumą ir taikant šarminį kometos, ir CBMN metodą, gauti rezultatai pateikti kaip vidurkiai, todėl rezultatų patikimumui įvertinti buvo naudotas Stjudento t kriterijus. Nanodalelėmis paveiktose ląstelėse gautos reikšmės lygintos su tirpiklio kontrole, skirtumas laikytas reikšmingu, kai p < 0,05. DNR pažaidų kiekio priklausomybė nuo nanodalelių koncentracijos įvertinta naudojant Pirsono determinacijos koeficientą (R²).

3. REZULTATAI

3.1. Aukso nanodalelių (AuND) tyrimai

Šiame darbe įvertintas skirtingo dydžio (5 ir 40 nm) aukso nanodalelių citotoksinis ir genotoksinis poveikis žmogaus periferinio kraujo limfocituose. Limfocitai skirtingomis aukso nanodalelių koncentracijomis (2.4 lentelė) buvo paveikti 3 ir 24 valandas. Citotoksiškumo (AO/EB testo) ir genotoksiškumo (kometos metodo) rezultatai su tirtomis aukso nanodalelėmis pateikti kaip vidurkių reikšmės.

3.1.1. AuND dydžio analizė

Prieš atliekant nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimus, tiriamosios dalelės buvo papildomai charakterizuojamos. Atlikta tiriamųjų AuND (pagal gamintoją, 40 ir 5 nm) dydžio analizė DLS metodu, ZetaSizer analizatoriumi (3.1 pav.). Nustatyta, kad didžioji dalis tiriamųjų nanodalelių buvo, atitinkamai, 60,73nm ir 13,41 nm dydžio, kas iš dalies atitinka gamintojo nurodymus.



3.1 pav. Tiriamųjų aukso nanodalelių (40 nm (A) ir 5 nm (B)) dydžio analizė DLS metodu (Zetasizer).

3.1.2. AuND patekimo į ląstelę analizė

Po 24 valandų poveikio su skirtingomis AuND (40 nm ir 5 nm dydžio) koncentracijomis buvo atlikta šių nanodalelių patekimo į žmogaus periferinio kraujo limfocitus analizė tėkmės citometru, analizuojant šoninės šviesos sklaidos intensyvumą (atitinkamai, 3.2A ir 3.2B). Šis rodiklis atitinka nanodalelių patekimo į ląstelę mastą.



3.2 pav. Tiriamųjų aukso nanodalelių (40 nm (A) ir 5 nm (B)) patekimo į ląstelę analizė tėkmės citometrijos metodu.

Abiem atvejais pastebėta, kad ląstelių granuliuotumas padidėja lyginant su kontrole (juoda kreivė), ląsteles veikiant 2 ir 2,5 µg/mL ND koncentracijomis (atitinkamai, žalia ir raudona kreivės). Priešingai, didžiausia tirta nanodalelių koncentracija (5 µg/mL) nepadidino ląstelių granuliuotumo.

3.1.3. AuND citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai

Prieš tiriant genotoksinį aukso nanodalelių poveikį periferinio kraujo limfocituose, atliktas citotoksiškumo tyrimas. Tyrimai atlikti naudojant akridino oranžo/ etidžio bromido (AO/EB) dažų mišinį. 5 ir 40 nm dydžio AuND citotoksiškumo rezultatai pateikti, atitinkamai, 3.3A ir 3.3B paveiksluose (linijinis grafikas). Nustatyta, kad tirtos aukso nanodalelių koncentracijos statistiškai reikšmingai nesumažino ląstelių gyvybingumo. Labiausiai limfocitų gyvybingumą sumažino 4,5 μg/mL ND koncentracija. Limfocitų, paveiktų 5 nm dydžio dalelėmis (4,5 μg/mL), gyvybingumas sumažėjo iki 85,4 ir 88,8 %, o paveiktų 40 nm nanodalelėmis iki 90,4 ir 92,6 % (atitinkamai, po 3 ir 24 val. poveikio). Atsižvelgiant į rezultatus galima teigti, kad mažesnės dalelės (5 nm) buvo citotoksiškesnės, lyginant su didesnėmis AuND (40 nm), tačiau, nei viena tirta AuND (5 nm ir 40 nm) koncentracija nesumažino ląstelių gyvybingumo daugiau nei 20% todėl manoma, kad šios



AuND nebuvo citotoksiškos ir tyrimai su šiomis dalelių koncentracijomis buvo tęsiami.

3.3 pav. Visų donorų periferinio kraujo limfocitų gyvybingumo (linijinis grafikas) ir DNR kiekio uodegoje vidurkis (%, stulpelinis grafikas) po poveikio skirtingomis aukso nanodalelių (5 nm – grafikas A, 40 nm – grafikas B) koncentracijomis 3 ir 24 valandas, *- statistiškai reikšmingi duomenys (p< 0,005).</p>

Įvertinus nanodalelių citotoksiškumą, tirtas 5 nm (3.3A pav.) ir 40 nm (3.3B pav.) dydžio AuND genotoksiškumas kometos metodu. Kontrolinių mėginių DNR procentinis kiekis kometos uodegoje svyravo nuo 4-6 ±1,2 (% ±*SEM*). Po 3 valandų inkubacijos su 5 nm dydžio nanodalelėmis pastebėta, kad penkios tirtos ND koncentracijos (1, 2, 2,5, 4,5 ir 7,5 µg/mL) indukavo statistiškai reikšmingą DNR pažaidų kiekio padidėjimą (atitinkamai, 10,02 ±1,5; 12,18 ±1,6; 11,95 ± 2; 12,59 ± 1,9 *ir* 13,09 ± 2,8 %) (3.3*A*). Tuo tarpu, tiriant 40 nm dydžio AuND, statistiškai reikšmingi pokyčiai nustatyti ląsteles paveikus 1,5, 2 ir 4,5 µg/mL ND koncentracijomis (atitinkamai, 8,7 ±1, 9,53 ±1,4, 10,38 ±1,3 %) (3.1.3B). Determinacijos koeficientas, nusakantis ryšį tarp ND koncentracijos ir DNR pažaidų kiekio ląstelėse buvo 0,588 (P=0,016, 5 nm) ir 0,702 (P=0,009, 40 nm). Po 24 valandų inkubacijos tik trys tirtos 5 nm dydžio AuND koncentracijos (1,5, 4,5 ir 7,5 µg/mL) reikšmingai padidino DNR kiekį kometų uodegose (atitinkamai, 11,29 % ±1,9, 10,19 % ±1,3, 13,78 % ±1,7), o 40 nm dydžio dalelės statistiškai reikšmingo poveikio DNR pažaidų mastui neturėjo. Statistiškai reikšminga korealiacija tarp ND koncentracijos ir DNR pažaidų skaičiaus nenustatyta (R²=0,429, P=0,06 – 5 nm; R²=0,2804, P=0,177 – 40 nm).

3.2. Sidabro nanodalelių (AgND) tyrimai

Šiame darbe tirtas 35 nm dydžio sidabro nanodalelių citotoksinis ir genotoksinis poveikis žmogaus periferinio kraujo limfocituose. Citotoksiškumo (AO/EB testo) ir genotoksiškumo (kometos ir MB metodo) rezultatai su tirtomis sidabro nanodalelėmis pateikti kaip vidurkių reikšmės.

3.2.1. AgND dydžio analizė

Papildoma sidabro nanodalelių dydžio analizė atlikta DLS metodu (3.4 pav). Nustatyta, kad





3.4 pav. Tiriamųjų sidabro nanodalelių dydžio analizė DLS metodu (Zetasizer)3.2.2. AgND patekimo į ląstelę analizė

Po 24 valandų poveikio su skirtingomis AgND koncentracijomis buvo atlikta šių nanodalelių patekimo į žmogaus periferinio kraujo limfocitus analizė tėkmės citometru, analizuojant šoninės šviesos sklaidos intensyvumą (atitinkamai, 3.5 paveikslėlis). Šis rodiklis atitinka nanodalelių patekimo į ląstelę mastą.



3.5 pav. Tiriamųjų sidabro nanodalelių patekimo į ląstelę analizė tėkmės citometrijos metodu, vertinant atspindėtos šoninės šviesos intensyvumą.

Pastebėta, kad ląstelių granuliuotumas padidėja lyginant su kontrole (juoda kreivė), ląsteles veikiant 20 ir 50 µg/mL ND koncentracijomis (atitinkamai, raudona ir mėlyna kreivės). Nustatyta, kad mažiausia tirta nanodalelių koncentracija (10 µg/mL) nepadidino ląstelių granuliuotumo.

3.2.3. Sidabro nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai

Sidabro nanodalelių citotoksiškumui įvertinti buvo naudotas akridino oranžo/ etidžio bromido (AO/EtBr) dažų mišinys, rezultatai pateikti 3.6 paveiksle (linijinis grafikas). Pastebėta, kad tik kelios ND koncentracijos (20, 80 ir 100 µg/mL) po trumpalaikės inkubacijos statistiškai reikšmingai sumažino ląstelių gyvybingumą (atitinkamai, $p_{20 µg/mL} = 0.043$, $p_{80 µg/mL} = 0.049$, $p_{100 µg/mL} = 0.0006$). Po 24 valandų inkubacijos ląstelių gyvybingumas, lyginant su kontrole sumažėjo nuo 96,4 % iki 73 %, tačiau rezultatai nebuvo statistiškai reikšmingi. Ląsteles inkubavus 1 valandą nei viena tirta nanodalelių koncentracija nesumažino ląstelių gyvybingumo daugiau nei 20 %, tačiau atlikus 24

valandų inkubaciją visos tirtos AgND koncentracijos, aukštesnės nei 30 µg/mL, ląstelių gyvybingumą sumažino daugiau nei 70 % todėl šios koncentracijos tolimesniems tyrimams nebuvo naudojamos.





Atlikus nanodalelių citotoksiškumo tyrimus, buvo ištirtas AgND genotoksinis poveikis ląstelėms, rezultatai pateikti 3.6 paveiksle. Analizuojant ląsteles po 1 ir 24 valandų inkubacijos, jas paveikus 35 nm dydžio AgND, pastebėta, kad visos tirtos nanodalelių koncentracijos indukavo pirmines DNR pažaidas ląstelėse. Nustatyta, kad po 24 valandų kontroliniame mėginyje DNR procentinis kiekis buvo didesnis nei po 1 valandos inkubacijos, atitinkamai 5,95 ±1,1 ir 1,83 ±0,3 (% ±*SEM*). Pastebėta, kad po ilgalaikės inkubacijos aukščiausios nanodalelių koncentracijos (10, 15, 20 ir 30 µg/mL) sukėlė statistiškai reikšmingą ($p_{10 µg/mL} = 0,0033$, $p_{15 µg/mL} = 0.0051$, $p_{20 µg/mL} =$ 0,0094, $p_{30 µg/mL} = 0,0037$) DNR kiekio padidėjimą kometos uodegoje (atitinkamai 14,59 ±1,2, 22,08 ±3,1, 19,38 ±0,0, 30,99 ±0,0 %). Po trumpalaikės inkubacijos su nanodalelėmis DNR kiekio padidėjimas kometos uodegoje nebuvo statistiškai reikšmingas. Nustatyta statistiškai reikšminga korealiacija tarp ND koncentracijos ir sukelto DNR pažaidų skaičiaus po 24 val. inkubacijos (R²=0,976, P=0,0002), po 1 val. inkubacijos statistiškai reikšminga korealiacija nebuvo stebima (R²=0,338, P=0,28).

3.2.4. Sidabro nanodalelių genotoksiškumo tyrimai sustabdytos citokinezės mikrobranduolių (CBMN) metodu

Taikant CBMN metodą, taip pat buvo įvertintas sidabro nanodalelių genotoksinis poveikis

žmogaus periferinio kraujo limfocitams, rezultatai pateikti 3.7 paveiksle. Nustatyta, kad nei viena tirta nanodalelių koncentracija nesukėlė statistiškai reikšmingo mikrobranduolių padidėjimo mėginiuose lyginant su kontrole. Didžiausias kiekis mikrobranduolių ląstelėse buvo nustatytas, esant 5 μ g/mL (2,88 ±0,2 (% ±*SEM*).) koncentracijai, o mažiausias – 15 μ g/mL (0,80 ±0,1).



3.7 pav. Visų donorų mikrobranduolių kiekio,% (stulpelinis grafikas) ir branduolio dalijimosi indekso (BDI) periferinio kraujo limfocituose vidurkis, paveikus skirtingomis AgND koncentracijomis.

Analizuojant gautus mikrobranduolių rezultatus taip pat buvo nustatytas branduolio dalijimosi indeksas (BDI). Nei viena tirta nanodalelių koncentracija nesukėlė statistiškai reikšmingo BDI sumažėjimo mėginiuose. Pastebima, kad visose koncentracijose BDI reikšmės išliko nežymiai pakitusios.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo tirtas sidabro (Ag) ir skirtingo dydžio aukso (Au) nanodalelių genotoksinis ir citotoksinis poveikis žmogaus periferinio kraujo limfocitams. Nanodalelių genotoksiškumui įvertinti buvo pasirinkti du testai – šarminis kometos ir CBMN metodai. Šarminiu kometos metodu galima paprastai ir greitai įvertinti nanodalelių sukeltas pirmines DNR pažaidas (Kohl et al., 2020), o taikant CBMN metodą įvertinamos sukeltos chromosominės pažaidos (Fenech, 2000).

Prieš tiriant citotoksinį ir genotoksinį nanodalelių poveikį periferinio kraujo limfocituose, buvo atlikta nanodalelių patekimo į ląstelę analizė panaudojant tėkmės citometrijos šviesos išsklaidymo metodą. Mūsų tyrimo metu nustatėme, kad sidabro ir aukso nanodalelės geba patekti į ląsteles, nors AgND patekimas yra didesnis lyginant su abiejų dydžių AuND. Mokslininkai Malysheva ir kiti (2021) taikant masių spektometriją nustatė, kad sidabro nanodalelės gali sėkmingai patekti į žmogaus T limfocitų ląsteles.

Nanodalelių citotoksiškumo įvertinimui buvo pasirinktas akridino oranžo/ etidžio bromido dažų mišinio testas, kuris pagrįstas ląstelių membranos integralumo suardymu (Liu et al., 2015). Šio testo metu naudojami dažai geba patekti į ląsteles ir nudažyti jas raudona arba žalia spalva. Akridino oranžas gali sąveikauti tik su nepažeistą membraną turinčiomis ląstelėmis ir jas nudažo žalia spalva, o etidžio bromidas patenka tik i lasteles su suirusia membrana, t.y. negyvas lasteles, ir jas nudažo raudonai (Liu et al., 2015). Mūsų tyrimuose ląstelių gyvybingumas po poveikio tiriamomis nanodalelėmis buvo įvertintas procentaliai. Rekomenduojama, kad atliekant genotoksiškumo analizę kometos metodu būtų pasirenkamos tokios nanodalelių koncentracijos, kurios nesumažintų ląstelių gyvybingumo daugiau nei 20 % (Huk et al., 2015). Analizuojant mūsų tyrimo metu gautus rezultatus pastebėta, kad nei viena tirta AuND (40 nm ir 5 nm) koncentracija po 3 ir 24 val. inkubacijos ląstelių gyvybingumo nesumažino daugiau negu 20 %, nors 5 nm dalelės buvo citotoksiškesnės lyginant su 40 nm dydžio dalelėmis. Panaši tendencija buvo stebima tiriant 35 nm dydžio sidabro nanodalelių citotoksiškumą po trumpalaikės inkubacijos (1 val.), tačiau 24 val. poveikis reikšmingai sumažino ląstelių gyvybingumą jau nuo 30 µg/mL koncentracijos (nuo 92,6 % iki 73 %). Dėl šios priežasties didesnės šių ND koncentracijos genotoksiškumo tyrimuose nebuvo naudotos. Mūsų laboratorijoje atlikti tyrimai su to paties gamintojo PVP dengtomis 13 nm dydžio sidabro nanodalelėmis atskleidė, kad nepriklausomai nuo inkubacijos laiko, visos tirtos šių nanodalelių koncentracijos statistiškai reikšmingai sumažino limfocitų gyvybinguma (Zabulionytė, 2021). Taigi, manoma, kad mažesnis nanodalelių dydis gali turėti įtakos dalelės reaktyvumui ir sukeliamam citotoksiškumui. Nanodalelių citotoksiškumo priklausomybę nuo dydžio tyrė ir kiti mokslininkai. Ibrahim ir kiti (2023) tyrė skirtingų dydžių (5, 10 ir 80 nm) AuND sukeliamą citotoksinį poveikį žmogaus alveolinės epitelio adenokarcinomos (A549) ląstelėms, taikant laktato dehidrogenazės išsiskyrimo (LDH) metodą. Naudojant LDH metodą, nustatytas procentinis

pažeistos ląstelės membranos kiekis, susidariusios dėl nanodalelių poveikio sukelto LDH fermento išsiskyrimo iš citoplazmos. Nustatyta, kad po 24 valandų inkubacijos, visos tirtos AuND sumažino lastelių gyvybinguma, tačiau citotoksiškiausios buvo 5 nm dydžio dalelės (Ibrahim et al., 2023). Soenen ir kiti (2012) tyrė 4 nm skersmens aukso nanodalelių citotoksinį poveikį įvairių tipu ląstelėse – C17.2 nervinėse progenitorinėse, žmogaus virkštelės venų endotelio ir PC12 žiurkės feochromocitomos ląstelėse, naudojant daugiaparametrinį metodą. Naudodami skirtingą nanodalelių koncentracija ir inkubacijos trukme buvo atlikta nuosekli nanodalelių poveikio lastelių gyvybingumui analizė. Nustatyta, kad esant aukštesnei nei 200 nM aukso nanodalelių koncentracijai ląstelės gyvybingumas sumažėja dėl susidariusių reaktyvių deguonies formų. Praėjus 24 valandų inkubacijai, esant aukščiausiai nanodalelių koncentracijai (500 nM), ląstelių gyvybingumas sumažėjo stipriausiai (nuo ~90% – kontrolė, iki ~60% – 500 nM), lyginant su kontrole ir kitomis nanodalelių koncentracijomis ir trumpesne inkubacijos trukme (Soenen et al., 2012). Jiang ir kiti (2013) tyrė sidabro nanodaleliu citotoksiškuma kininio žiurkėno kiaušidžiu lasteliu linijai (CHO -K1). Citotoksiškumas buvo nustatytas taikant MTT (3 - (4,5 - dimetiltiazol - 2 - il) - 2,5 - difenil– 2H-tetrazolio bromido) metodą, kuriuo matuojamas ląstelių metabolinis aktyvumas. Ląstelės su skirtingomis AgND koncentracijomis (1 – 20 µg/mL) inkubuotos 24 valandas, pastebėta, kad nanodalelių citotoksiškumas priklausė nuo dozės, esant 20 µg/mL koncentracijai lastelių gyvybingumas sumažėjo daugiau nei 60 % lyginant su kontrole (Jiang et al., 2013). Lyginant mūsų gautus nanodalelių citotoksiškumo rezultatus su kitų mokslininkų, rezultatai sutampa, mažesnės aukso nanodalelės po ilgalaikės inkubacijos su tiriamomis lastelėmis yra labiau citotoksiškos ląstelėms nei didesnės AuND, taip pat AgND sukelia nuo dozės priklausomą citotoksinį poveikį lastelėms.

Tiriant nanodalelių įtaką pirminių DNR pažaidų formavimuisi kometos metodu, buvo analizuojama keletas aspektų: ND poveikio trukmė (trumpalaikė – 1/3 val. arba ilgalaikė 24 val. inkubacija su ląstelėmis), dozinė priklausomybė, medžiaga iš kurios pagaminta nanodalelė (auksas arba sidabras) ir skirtingas nanodalelių dydis (5 arba 40 nm AuND). Tyrimų metu nustatyta, kad po 24 valandų inkubacijos aukščiausios AgND sukėlė stipresnį, statistiškai reikšmingą DNR kiekio padidėjimą kometos uodegoje, priešingai nei AgND koncentracijos po 1 valandos inkubacijos. Mūsų gauti rezultati sutampa su kitų tyrėjų darbais. Anna Grzesiakowska ir kiti (2021), tyrė sidabro nanodalelių poveikį ilgauodegės šinšilos kaulų čiulpų ląstelėms. Nanodalelių genotoksiškumas buvo įvertintas pasitelkiant šarminį kometos metodą. Kaulų čiulpų ląstelės buvo inkubuotos su nanodalelėmis 3, 6 ir 24 valandas, pastebėta, kad nanodalelių poveikio laikas turi įtakos DNR pažaidų kiekiui – kuo ilgesnė inkubacija, tuo didesnis DNR pažaidų kiekis ląstelėse. Hackenberg ir kiti (2011) įvertino AgND sukeliamą genotoksinį poveikį žmogaus mezenchiminėms kamieninėms ląstelėms, taikant šarminį kometos metodą. Ląstelės su AgND inkubuotos 1, 3 ir 24 valandas, pastebėta, kad naudotos 0,1 ir 10 g/mL nanodalelių koncentracijos po 24 valandų inkubacijos indukavo daugiau DNR pažaidų nei po 1 ar 3 val. inkubacijos. Mūsų tyrimo metu stebėta panaši tendencija, tiriant 5 nm dvdžio AuND genotoksiškuma kometos metodu, kur ilgalaikė inkubacija sukėlė daugiau DNR pažaidu negu trumpalaikė. Priešingai, didesnės, 40 nm dydžio, nanodalelės buvo genotoksiškesnės po 3 val. inkubacijos, lyginant su 24 val. poveikiu. Mūsų tyrimo rezultatai dalinai sutampa su kitų tyrėjų rezultatais. May ir kiti (2018) tyrė 3 – 4 nm dydžio aukso nanodalelių sukeliamą genotoksinį poveikį žmogaus plaučių adenokarcinomos A549 ląstelių linijai kometos metodu. Ląstelės buvo paveiktos skirtingomis nanodalelių koncentracijomis $(1,5 - 100 \mu g/mL)$ 3 ir 24 valandas. Nustatyta, kad po 3 val. inkubacijos nanodalelės neindukavo pirminių DNR pažaidų ląstelėse lyginant su teigiama kontrole. Po 24 val. Inkubacijos kometos uodegos mėginiuose buvo 60 % didesnės lyginant su kontrole, taip pat stipriausia genotoksini poveiki lastelėms sukėlė aukštesnės, 60 ir 80 µg/mL, AuND koncentracijos. Manome, kad 40 nm AuND genotoksiškumas po 24 valandu galėjo būti mažesnis dėl galimai isijungusiu lastelės reparacijos mechanizmu, esant ilgalaikei inkubacijai (Grzesiakowska et al., 2021). Taip pat vykdant ilgalaikę inkubaciją nanodalelės yra linkusios aglomeruotis, todėl sunkiau gali patekti į ląsteles ir sukelti genotoksinius efektus jose (Carlander et al., 2019).

Mūsų tyrimo metu taip pat buvo ištirta genotoksiškumo priklausomybė nuo naudojamos nanodalelių koncentracijos. Analizuojant rezultatus nustatyta dozinė priklausomybė nanodalelių sukeliamam genotoksiniui poveikiui lastelėms. Tiriant aukso nanodaleles statistiškai reikšminga korealiacija tarp ND koncentracijos ir DNR pažaidų skaičiaus nebuvo nustatyta (R²=0.429, P=0.06 -5 nm; R²=0.2804, P=0.177 - 40 nm). Tiriant sidabro nanodaleles nustatyta, kad korealiacija tarp ND koncentracijos ir DNR pažaidų skaičiaus po 1 val. nebuvo statistiškai reikšminga, tačiau statistiškai reikšmingi rezultatai stebimi po 24 val. inkubacijos(R²=0,338, P=0,28 – 1 val.; R^2 =0,976, P=0,0002 – 24 val.). Nanodalelių genotoksiškumo priklausomybę nuo koncentracijos tyrė ir kiti mokslininkai. George ir kiti (2017) tyrė aukso nanodalelių, stabilizuotų citratu, genotoksinį poveikį kininio žiurkėno kiaušidžių ląstelių linijai. Tiriamos ląstelės buvo inkubuojamos 20 valandų 37 °C temperatūroje ir paveiktos skirtingomis 14 nm skersmens, aukso nanodalelių koncentracijomis – 6.2, 12.5, 25 ir 50 µg/mL. Kometos metodu nustatyta, kad susidariusios DNR pažaidos ir didesnės kometų uodegos, priklausė nuo ląsteles veikiančios nanodalelių koncentracijos- esant didžiausiai koncentracijai (50 µg/mL), pažaidų kiekis buvo didesnis (13 % \pm SEM) nei veikiant mažiausia (6,2 µg/mL) koncentracija (5,5 % \pm SEM). Taigi, nanodalelių sukeliamas genotoksinis poveikis ląstelėms priklauso nuo inkubacijos laiko ir koncentracijos.

Šarminio kometos tyrimo metu taip pat įvertinta AuND dydžio įtaka sukeliamam pirminių DNR pažaidų mastui. Pastebėta, kad mažesnės, 5 nm dydžio, aukso nanodalelės indukavo daugiau pirminių DNR pažaidų nei didesnės, 40 nm dydžio AuND nepriklausomai nuo inkubacijos laiko. Xia ir kiti tyrė 5, 20 ir 50 nm dydžio aukso nanodalelių genotoksinį poveikį HepG2 ląstelėse. Nustatyta, kad 5 nm dydžio AuND indukavo daugiau pirminių DNR pažaidų nei didesnės AuND. Tai atitinka mūsų tyrimo metu gautus rezultatus. Ávalos ir kiti (2018) tyrė 30, 50 ir 90 nm skersmens aukso nanodalelių poveikį žmogaus auglio leukemijos (HL-60) ir žmogaus hepatomos lastelėse. Tačiau, pastebėta, kad skirtingų dydžių nanodalelės sukėlė panašų genotoksinį poveikį ląstelėms. Lebedová ir kiti (2018) tyrė 5 ir 50 nm dydžio AuND genotoksiškumo priklausomybę nuo ND dydžio žmogaus bronchų epitelio ląstelėms. Nustatyta, kad AuND sukėlė nuo dydžio priklausomą genotoksinį poveikį ląstelėms, kai 5 nm AuND buvo genotoksiškesnės nei 50 nm dydžio aukso nanodalelės. Mažesnės nanodalelės yra labiau genotoksiškos ląstelėms būtent dėl jų dydžio, dėl kurio pastarosios gali patekti į patį branduolį per branduolio poras ir taip sukelti DNR pažaidas (Xia et al., 2017). Mūsų tyrimo metu gauti rezultatai dalinai sutampa su kitų mokslininkų gautais rezultatais.

Sidabro nanodalelių genotoksinis poveikis ląstelėms buvo papildomai įvertintas mikrobranduolių metodu. Nustatyta, kad tirtos sidabro nanodalelės neindukavo statistiškai reikšmingo mikrobranduolių susidarymo tirtose ląstelėse. Ištyrus branduolio dalijimosi indeksą tirtose lastelėse po poveikio skirtingomis AgND koncentracijomis, pastebėta, kad pastarosios statistiškai reikšmingai nesumažino ląstelių profileracijos greičio. Bastos ir kiti (2017) ištyrė 30 nm dydžio sidabro nanodalelių genotoksinį poveikį žmogaus keratonicitų linijai taikant mikrobranduolių metodą. Nustatyta, kad tirtos AgND buvo citotoksiškos lastelėms ir sumažino jų proliferacijos lygi, taip pat padidindamos mikrobranduolių skaičių ląstelėse. Ruiz – Ruiz ir kiti (2020) ištyrė 35 nm dydžio PVP padengtų ir 50 nm dydžio sidabro nanodalelių genotoksiškumą žmogaus periferinio kraujo limfocituose CBMN metodu. Nustatyta, kad ląsteles veikiant 0,012 – 12 µg/mL koncentracijomis nebuvo stebimas stiprus mikrobranduolių dažnio padidėjimas ar BDI sumažėjimas. Žinoma, kad skirtingos periferinio kraujo ląstelės (limfocitai, monocitai ir polimorfonuklearinės ląstelės) pasižymi skirtingu atsaku nanodalelėms, Ballesteros ir kiti (2020) nustatė, kad limfocitai, lyginant su kitomis ląstelėmis, buvo mažiausiai jautrūs nanodalelių poveikiui. Taikant kometos metoda, iš kraujo išskiriami ne tik limfocitai, bet ir kitos periferinio kraujo ląstelės (pvz. monocitai), o CBMN metodu, tiriami tik limfocitai. Todėl manome, kad būtent dėl šios priežasties mūsų tyrimo metu gauti CBMN rezultatai gali skirtis nuo kometos metodu gautų rezultatu, kur AgND sukėlė stiprų genotoksinį poveikį ląstelėms, priešingai nei CBMN metodu. Todėl mūsų tyrimo metu gauti rezultatai tik iš dalies atitinka kitų tyrėjų rezultatus.

Apibendrinant mūsų tyrimo rezultatus galima teigti, kad tirtos 40 nm ir 5 nm dydžio AuND koncentracijos nėra citotoksiškos, tačiau turi genotoksinį potencialą žmogaus periferinio kraujo limfocituose. Taip pat, mažesnės aukso nanodalelės indukavo daugiau pirminių DNR pažaidų lyginant su didesnėmis dalelėmis. Priešingai, nustatyta, kad tirtos sidabro nanodalelių koncentracijos, didesnės nei 20 µg/mL, buvo citotoksiškos žmogaus periferinio kraujo limfocituose, po 24 valandų inkubacijos. Analizuojant AgND gautus rezultatus kometos metodu, matomas ryškus DNR pažaidų padidėjimas ląstelėse po 24 valandų inkubacijos lyginant su trumpalaike, 1 valandų inkubacija. Nustatyta, kad visos tirtos AgND ir AuND sukėlė nuo laiko ir koncentracijos priklausomą pirminių DNR pažaidų padidėjimą tiriamose ląstelėse. Taikant CBMN metodą AgND genotoksiškumui įvertinti pastebėta, kad pastarosios statistiškai reikšmingai nepadidino mikrobranduolių skaičiau ląstelėse ir nebuvo citotoksiškos.

IŠVADOS

1. Tirtos skirtingos AuND koncentracijos, po trumpalaikės (3 val.) ir ilgalaikės (24 val.) inkubacijos, neturėjo statistiškai reikšmingos įtakos limfocitų gyvybingumui

2. AgND po 1 valandos poveikio limfocitų gyvybingumui įtakos neturėjo, tačiau po 24 valandų inkubacijos buvo stebimas statistiškai reikšmingas ląstelių gyvybingumo sumažėjimas

3. 5 nm AuND sukėlė daugiau pirminių DNR pažaidų lyginant su didesnėmis 40 nm dydžio AuND, kurių tik pavienės koncentracijos indukavo statistiškai reikšmingą DNR pažaidų kiekio padidėjimą limfocituose (1,5, 2 ir 4,5 μg/mL)

4. AgND po 1 valandos poveikio DNR pažaidų skaičiui įtakos neturėjo, tačiau po 24 valandų veikimo dauguma tirtų nanodalelių koncentracijų indukavo statistiškai reikšmingą DNR pažaidų kiekio padidėjimą

5. AgND nesukėlė statistiškai reikšmingo mikrobranduolių kiekio padidėjimo

ASMENINIS INDĖLIS

Šio tyrimo metu atlikau citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimus šarminiu kometos ir mikrobranduolių metodais, taip pat atlikau duomenų analizę ir apibendrinau rezultatus. Tyrimo idėja, planavimas, vykdymas bei rezultatų analizė atlikta kartu su dokt. Mildos Babonaitės pagalba.

PADĖKA

Dėkoju savo bakalauro darbo vadovei dok. Mildai Babonaitei už kuravimą ir visokeriopą pagalbą atliekant eksperimentus, bakalauro darbo rašymą ir skatinimą siekti naujų tikslų. Taip pat dėkoju doc. dr. Veronikai Dedonytei už suteiktą pagalbą ir naudingą informaciją atliekant tyrimus.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

- Abramenko, N., Demidova, T. B., Krutyakov, Yu. A., Zherebin, P. M., Krysanov, E. Y., Kustov, L. M., & Peijnenburg, W. (2019). The effect of capping agents on the toxicity of silver nanoparticles to *Danio rerio* embryos. *Nanotoxicology*, *13*(1), 1–13. https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1498931
- Amina, S. J., & Guo, B. (2020). A review on the synthesis and functionalization of gold nanoparticles as drug delivery vehicle. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 9823– 9857. https://doi.org/10.2147/IJN.S279094
- Ávalos, A., Haza, A. I., Mateo, D., & Morales, P. (2018). In vitro and in vivo genotoxicity assessment of gold nanoparticles of different sizes by comet and SMART assays. *Food and Chemical Toxicology*, *120*, 81–88. <u>https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.061</u>
- Azqueta, A., & Dusinska, M. (2015). The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity ofnanomaterials. *Frontiers in Genetics*, 6. https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00239
- Ballesteros, S., Domenech, J., Barguilla, I., Cortés, C., Marcos, R., & Hernández, A. (2020).
 Genotoxic and immunomodulatory effects in human white blood cells after *ex vivo* exposure to polystyrene nanoplastics. *Environmental Science: Nano*, 7(11), 3431–3446.
 https://doi.org/10.1039/D0EN00748J
- Barabadi, H., Najafi, M., Samadian, H., Azarnezhad, A., Vahidi, H., Mahjoub, M., Koohiyan,M., & Ahmadi, A. (2019). A Systematic Review of the Genotoxicity and Antigenotoxicityof Biologically Synthesized Metallic Nanomaterials: Are Green Nanoparticles Safe Enough

for Clinical Marketing? Medicina, 55(8), 439. https://doi.org/10.3390/medicina55080439

- Bastos, V., Duarte, I. F., Santos, C., & Oliveira, H. (2017). Genotoxicity of citrate-coated silver nanoparticles to human keratinocytes assessed by the comet assay and cytokinesis blocked micronucleus assay. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(5), 5039–5048. https://doi.org/10.1007/s11356-016-8240-6
- Battal, D., Çelik, A., Güler, G., Aktaş, A., Yildirimcan, S., Ocakoglu, K., & Çömelekoğlu, Ü.
 (2015). SiO 2 Nanoparticule-induced size-dependent genotoxicity an *in vitro* study using sister chromatid exchange, micronucleus and comet assay. *Drug and Chemical Toxicology*, 38(2), 196–204. https://doi.org/10.3109/01480545.2014.928721
- Beedanagari, S. (2017). Genetic Toxicology. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III* (pp. 195–203). Elsevier. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12381-9</u>
- Behzadi, S., Serpooshan, V., Tao, W., Hamaly, M. A., Alkawareek, M. Y., Dreaden, E. C., Brown, D., Alkilany, A. M., Farokhzad, O. C., & Mahmoudi, M. (2017). Cellular uptake of nanoparticles: Journey inside the cell. *Chemical Society Reviews*, 46(14), 4218–4244. <u>https://doi.org/10.1039/C6CS00636A</u>
- Bergin, I. L., & Witzmann, F. A. (2013). Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: Evidence and knowledge gaps. *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology*, 3(1/2), 163. https://doi.org/10.1504/IJBNN.2013.054515
- Bhaviripudi, S., Mile, E., Steiner, S. A., Zare, A. T., Dresselhaus, M. S., Belcher, A. M., & Kong, J. (2007). Cvd synthesis of single–walled carbon nanotubes from gold nanoparticle catalysts. *Journalof the American Chemical Society*, *129*(6), 1516–1517. https://doi.org/10.1021/ja0673332
- Biswas, A., Bayer, I. S., Biris, A. S., Wang, T., Dervishi, E., & Faupel, F. (2012). Advances in top–downand bottom–up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science*, *170*(1–2), 2–27. https://doi.org/10.1016/j.cis.2011.11.001

- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., & Caro, N. (2021). Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7202. https://doi.org/10.3390/ijms22137202
- Burgum, M. J., Clift, M. J. D., Evans, S. J., Hondow, N., Tarat, A., Jenkins, G. J., & Doak, S.
 H. (2021). Few–layer graphene induces both primary and secondary genotoxicity in epithelial barrier models invitro. *Journal of Nanobiotechnology*, *19*(1), 24. https://doi.org/10.1186/s12951–021–00769–9
- Carlander, U., Midander, K., Hedberg, Y. S., Johanson, G., Bottai, M., & Karlsson, H. L.
 (2019). Macrophage-Assisted Dissolution of Gold Nanoparticles. ACS Applied Bio Materials, 2(3), 1006–1016. <u>https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00537</u>
- Collins, A. R., El Yamani, N., Lorenzo, Y., Shaposhnikov, S., Brunborg, G., & Azqueta, A.
 (2014). Controlling variation in the comet assay. *Frontiers in Genetics*, 5.
 https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00359
- Collins, A. R. (2017). The Use of Bacterial Repair Endonucleases in the Comet Assay. In J.-C. Gautier (Ed.), *Drug Safety Evaluation* (Vol. 1641, pp. 173–184). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_9
- Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definiton of a nanomaterial, (2011/696/EU). Off. J. Eur. Union 2011.
- Ding, J., Chen, G., Chen, G., & Guo, M. (2019). One-Pot Synthesis of Epirubicin-Capped Silver Nanoparticles and Their Anticancer Activity against Hep G2 Cells. *Pharmaceutics*, 11(3), 123. <u>https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030123</u>
- Doak, S. H., Manshian, B., Jenkins, G. J. S., & Singh, N. (2012). In vitro genotoxicity testing strategyfor nanomaterials and the adaptation of current OECD guidelines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1–2), 104–111. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.09.013

Doherty, A., Bryce, S. M., & Bemis, J. C. (2016). Chapter 6-The in vitro micronucleus assay.

In R.Proudlock (Ed.), *Genetic Toxicology Testing* (pp. 161–205). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978–0–12–800764–8.00006–9

- Donahue, N. D., Acar, H., & Wilhelm, S. (2019). Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *143*, 68–96. <u>https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.04.008</u>
- El Yamani, N., Rundén-Pran, E., Collins, A. R., Longhin, E. M., Elje, E., Hoet, P., Vinković
 Vrček, I., Doak, S. H., Fessard, V., & Dusinska, M. (2022). The miniaturized enzymemodified comet assay for genotoxicity testing of nanomaterials. *Frontiers in Toxicology*, 4, 986318. https://doi.org/10.3389/ftox.2022.986318
- Elespuru, R., Pfuhler, S., Aardema, M. J., Chen, T., Doak, S. H., Doherty, A., Farabaugh, C. S., Kenny, J., Manjanatha, M., Mahadevan, B., Moore, M. M., Ouédraogo, G., Stankowski, L. F., & Tanir, J.Y. (2018). Genotoxicity assessment of nanomaterials: Recommendations on best practices, assays, and methods. *Toxicological Sciences*, *164*(2), 391–416. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy100
- Elespuru, R. K., Doak, S. H., Collins, A. R., Dusinska, M., Pfuhler, S., Manjanatha, M.,
 Cardoso, R., & Chen, C. L. (2022). Common Considerations for Genotoxicity Assessment of Nanomaterials. *Frontiers in Toxicology*, *4*, 859122.
 https://doi.org/10.3389/ftox.2022.859122
- Elliott, R. L., & Jiang, X.-P. (2019). The adverse effect of gentamicin on cell metabolism in three cultured mammary cell lines: "Are cell culture data skewed?" *PLOS ONE*, *14*(4), e0214586. <u>https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214586</u>
- Enea, M., Pereira, E., Peixoto de Almeida, M., Araújo, A. M., Bastos, M. de L., & Carmo, H. (2020).Gold nanoparticles induce oxidative stress and apoptosis in human kidney cells. *Nanomaterials*,10(5), 995. https://doi.org/10.3390/nano10050995
- Evans, S. J., Clift, M. J. D., Singh, N., De Oliveira Mallia, J., Burgum, M., Wills, J. W., Wilkinson, T. S., Jenkins, G. J. S., & Doak, S. H. (2017). Critical review of the current and

future challenges associated with advanced *in vitro* systems towards the study of nanoparticle (secondary) genotoxicity. *Mutagenesis*, *32*(1), 233–241.

https://doi.org/10.1093/mutage/gew054

- Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 455(1–2), 81–95. <u>https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8</u>
- Fenech, M. (2007). Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*, 2(5), 1084–1104. <u>https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77</u>
- Ferdous, Z., & Nemmar, A. (2020). Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *International Journal* of Molecular Sciences, 21(7), 2375. <u>https://doi.org/10.3390/ijms21072375</u>
- Ferraris, S., Cazzola, M., Peretti, V., Stella, B., & Spriano, S. (2018). Zeta potential measurements onsolid surfaces for in vitro biomaterials testing: Surface charge, reactivity upon contact with fluidsand protein absorption. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 60. https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00060
- Foroozandeh, P., & Aziz, A. A. (2018). Insight into cellular uptake and intracellular trafficking of nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 13(1), 339. https://doi.org/10.1186/s11671– 018–2728–6
- Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., & Cosco,
 D. (2021). Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology*, *12*, 601626. https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626
- George, J. M., Magogotya, M., Vetten, M. A., Buys, A. V., & Gulumian, M. (2017). An investigation of the genotoxicity and interference of gold nanoparticles in commonly used *in vitro* mutagenicity and genotoxicity assays. *Toxicological Sciences*, kfw247. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw247

Giljohann, D. A., Seferos, D. S., Daniel, W. L., Massich, M. D., Patel, P. C., & Mirkin, C. A.

(2010). Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. Angewandte Chemie International

Edition, 49(19), 3280-3294. https://doi.org/10.1002/anie.200904359

- Gomes, H. I. O., Martins, C. S. M., & Prior, J. A. V. (2021). Silver Nanoparticles as Carriers of Anticancer Drugs for Efficient Target Treatment of Cancer Cells. *Nanomaterials*, 11(4), 964. https://doi.org/10.3390/nano11040964
- Grzesiakowska, A., Kasprowicz, M. J., Kuchta-Gładysz, M., Rymuza, K., & Szeleszczuk, O. (2021). Genotoxicity of physical silver nanoparticles, produced by the HVAD method, for Chinchilla lanigera genome. *Scientific Reports*, 11(1), 18473.

https://doi.org/10.1038/s41598-021-97926-9

- Hackenberg, S., Scherzed, A., Kessler, M., Hummel, S., Technau, A., Froelich, K., Ginzkey, C., Koehler, C., Hagen, R., & Kleinsasser, N. (2011). Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters*, 201(1), 27–33. <u>https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.12.001</u>
- Hassan, H., Sharma, P., Hasan, Mohd. R., Singh, S., Thakur, D., & Narang, J. (2022). Gold nanomaterials – The golden approach from synthesis to applications. *Materials Science for Energy Technologies*, 5, 375–390. <u>https://doi.org/10.1016/j.mset.2022.09.004</u>
- Hu, X., Zhang, Y., Ding, T., Liu, J., & Zhao, H. (2020). Multifunctional gold nanoparticles: A novel nanomaterial for various medical applications and biological activities. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 990. https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00990
- Huk, A., Collins, A. R., El Yamani, N., Porredon, C., Azqueta, A., De Lapuente, J., & Dusinska, M. (2015). Critical factors to be considered when testing nanomaterials for genotoxicity with the comet assay. *Mutagenesis*, *30*(1), 85–88.

https://doi.org/10.1093/mutage/geu077

Yaqoob, A. A., Ahmad, H., Parveen, T., Ahmad, A., Oves, M., Ismail, I. M. I., Qari, H. A., Umar, K., & Mohamad Ibrahim, M. N. (2020). Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications: A Review. *Frontiers in Chemistry*, 8, 341. <u>https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00341</u>

- Ibrahim, B., Akere, T. H., Chakraborty, S., Valsami-Jones, E., & Ali-Boucetta, H. (2023). Gold Nanoparticles Induced Size Dependent Cytotoxicity on Human Alveolar Adenocarcinoma Cells by Inhibiting the Ubiquitin Proteasome System. *Pharmaceutics*, 15(2), 432. <u>https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020432</u>
- Jiang, X., Foldbjerg, R., Miclaus, T., Wang, L., Singh, R., Hayashi, Y., Sutherland, D., Chen, C., Autrup, H., & Beer, C. (2013). Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the model cell line CHO-K1. *Toxicology Letters*, 222(1), 55–63. <u>https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.07.011</u>
- Kammler, H. K., M\u00e4dler, L., & Pratsinis, S. E. (2001). Flame synthesis of nanoparticles. *ChemicalEngineering & Technology*, 24(6), 583–596. https://doi.org/10.1002/1521–4125(200106)24:6<583::AID–CEAT583>3.0.CO;2–H
- Kazimirova, A., Baranokova, M., Staruchova, M., Drlickova, M., Volkovova, K., & Dusinska, M. (2019). Titanium dioxide nanoparticles tested for genotoxicity with the comet and micronucleus assays in vitro, ex vivo and in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 843, 57–65.

https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.05.001

- Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *ArabianJournal of Chemistry*, *12*(7), 908–931. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- Khan, S. A. (2020). Metal nanoparticles toxicity: Role of physicochemical aspects. In *Metal Nanoparticles for Drug Delivery and Diagnostic Applications* (pp. 1–11). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816960-5.00001-X
- Kimura, A., Miyata, A., & Honma, M. (2013). A combination of in vitro comet assay and micronucleus test using human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutagenesis*, 28(5), 583–590.
 https://doi.org/10.1093/mutage/get036

- Kohl, Y., Rundén–Pran, E., Mariussen, E., Hesler, M., El Yamani, N., Longhin, E. M., & Dusinska, M. (2020). Genotoxicity of nanomaterials: Advanced in vitro models and high throughput methods forhuman hazard assessment—a review. *Nanomaterials*, *10*(10), 1911. https://doi.org/10.3390/nano10101911
- Kong, F.-Y., Zhang, J.-W., Li, R.-F., Wang, Z.-X., Wang, W.-J., & Wang, W. (2017). Unique roles ofgold nanoparticles in drug delivery, targeting and imaging applications. *Molecules*, 22(9), 1445. https://doi.org/10.3390/molecules22091445
- Kou, L., Sun, J., Zhai, Y., & He, Z. (2013). The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8(1), 1–10. <u>https://doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.001</u>
- Kumar, R. (2019). Lipid-Based Nanoparticles for Drug-Delivery Systems. In Nanocarriers for Drug Delivery (pp. 249–284). Elsevier. <u>https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814033-</u> <u>8.00008-4</u>
- Li, Y., Chen, D. H., Yan, J., Chen, Y., Mittelstaedt, R. A., Zhang, Y., Biris, A. S., Heflich, R. H., & Chen, T. (2012). Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and in vitro micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 745(1–2), 4–10.

https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.11.010

- Li, J. J., Hartono, D., Ong, C.–N., Bay, B.–H., & Yung, L.–Y. L. (2010). Autophagy and oxidative stressassociated with gold nanoparticles. *Biomaterials*, *31*(23), 5996–6003. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.014
- Li, X., Xu, H., Chen, Z.–S., & Chen, G. (2011). Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms andtheir applications. *Journal of Nanomaterials*, 2011, 1–16. https://doi.org/10.1155/2011/270974
- Wu, X. (2015). Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry. *Medical Science Monitor Basic Research*, 21, 15–20.

https://doi.org/10.12659/MSMBR.893327

- May, S., Hirsch, C., Rippl, A., Bohmer, N., Kaiser, J.-P., Diener, L., Wichser, A., Bürkle, A., & Wick, P. (2018). Transient DNA damage following exposure to gold nanoparticles. *Nanoscale*, *10*(33), 15723–15735. https://doi.org/10.1039/C8NR03612H
- Maiti, D., Tong, X., Mou, X., & Yang, K. (2019). Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1401. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01401
- Malysheva, A., Ivask, A., Doolette, C. L., Voelcker, N. H., & Lombi, E. (2021). Cellular binding, uptake and biotransformation of silver nanoparticles in human T lymphocytes. *Nature Nanotechnology*, *16*(8), 926–932. <u>https://doi.org/10.1038/s41565-021-00914-3</u>
- Manickam, V., Velusamy, R. K., Lochana, R., Amiti, Rajendran, B., & Ramasamy, T. (2017).
 Genotoxicity of Nanomaterials in Food. In S. Ranjan, N. Dasgupta, & E. Lichtfouse (Eds.), *Nanoscience in Food and Agriculture 4* (Vol. 24, pp. 141–180). Springer International
 Publishing. <u>https://doi.org/10.1007/978-3-319-53112-0_4</u>
- Manke, A., Wang, L., & Rojanasakul, Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle–induced oxidative stressand toxicity. *BioMed Research International*, 2013, 1–15. https://doi.org/10.1155/2013/942916
- Miller, M. R., Raftis, J. B., Langrish, J. P., McLean, S. G., Samutrtai, P., Connell, S. P., Wilson, S., Vesey, A. T., Fokkens, P. H. B., Boere, A. J. F., Krystek, P., Campbell, C. J., Hadoke, P. W. F., Donaldson, K., Cassee, F. R., Newby, D. E., Duffin, R., & Mills, N. L. (2017). Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS Nano*, *11*(5), 4542–4552. https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08551
- Mohammadi, S., Harvey, A., & Boodhoo, K. V. K. (2014). Synthesis of TiO2 nanoparticles in a spinningdisc reactor. *Chemical Engineering Journal*, 258, 171–184. <u>https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.07.042</u>

- Monteiro-Riviere, N. A., Wiench, K., Landsiedel, R., Schulte, S., Inman, A. O., & Riviere, J. E. (2011). Safety Evaluation of Sunscreen Formulations Containing Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in UVB Sunburned Skin: An In Vitro and In Vivo Study. *Toxicological Sciences*, *123*(1), 264–280. <u>https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr148</u>
- Ng, C.–T., Li, J. J., Gurung, R. L., Hande, M. P., Ong, C.–N., Bay, B.–H., & Yung, L.–Y. L. (2013). Toxicological profile of small airway epithelial cells exposed to gold nanoparticles. *ExperimentalBiology and Medicine*, 238(12), 1355–1361. https://doi.org/10.1177/1535370213505964
- Odularu, A. T. (2018). Metal nanoparticles: Thermal decomposition, biomedicinal applications to cancertreatment, and future perspectives. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2018, 1–6. https://doi.org/10.1155/2018/9354708
- Paino, I. M. M., Marangoni, V. S., de Oliveira, R. de C. S., Antunes, L. M. G., & Zucolotto, V. (2012). Cyto and genotoxicity of gold nanoparticles in human hepatocellular carcinoma and peripheralblood mononuclear cells. *Toxicology Letters*, 215(2), 119–125. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2012.09.025
- Petryayeva, E., & Krull, U. J. (2011). Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassaysand biosensing—A review. *Analytica Chimica Acta*, 706(1), 8–24. https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.020
- Pimpin, A., & Srituravanich, W. (2012). Review on micro– and nanolithography techniques and theirapplications. *Engineering Journal*, 16(1), 37–56. https://doi.org/10.4186/ej.2012.16.1.37
- Ramesh, S. (2013). Sol–gel synthesis and characterization of nanoparticles. *Journal of Nanoscience*,2013, 1–8. https://doi.org/10.1155/2013/929321
- Rees, P. (2013). Uptake and Toxicology of Nanoparticles. In *Frontiers of Nanoscience* (Vol. 5, pp. 123–138). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-098338-7.00005-4

Ren, N., Atyah, M., Chen, W.-Y., & Zhou, C.-H. (2017). The various aspects of genetic and

epigenetic toxicology: Testing methods and clinical applications. *Journal of Translational Medicine*, *15*(1), 110. <u>https://doi.org/10.1186/s12967-017-1218-4</u>

- Rennick, J. J., Johnston, A. P. R., & Parton, R. G. (2021). Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nature Nanotechnology*, *16*(3), 266–276. <u>https://doi.org/10.1038/s41565-021-00858-8</u>
- Rönkkö, T., & Timonen, H. (2019). Overview of Sources and Characteristics of Nanoparticles in Urban Traffic-Influenced Areas. *Journal of Alzheimer's Disease*, 72(1), 15–28. <u>https://doi.org/10.3233/JAD-190170</u>
- Ruiz-Ruiz, B., Arellano-García, M. E., Radilla-Chávez, P., Salas-Vargas, D. S., Toledano-Magaña, Y., Casillas-Figueroa, F., Luna Vazquez-Gomez, R., Pestryakov, A., García-Ramos, J. C., & Bogdanchikova, N. (2020). Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. ACS Omega, 5(21), 12005–12015. <u>https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00149</u>
- Savage, D. T., Hilt, J. Z., & Dziubla, T. D. (2019). In vitro methods for assessing nanoparticle toxicity. In Q. Zhang (Ed.), *Nanotoxicity* (Vol. 1894, pp. 1–29). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978–1–4939–8916–4_1
- Shamaila, S., Zafar, N., Riaz, S., Sharif, R., Nazir, J., & Naseem, S. (2016). Gold nanoparticles: An efficient antimicrobial agent against enteric bacterial human pathogen. *Nanomaterials*, 6(4), 71.https://doi.org/10.3390/nano6040071
- Shang, L., Nienhaus, K., & Nienhaus, G. U. (2014). Engineered nanoparticles interacting with cells: Sizematters. *Journal of Nanobiotechnology*, *12*(1), 5. https://doi.org/10.1186/1477– 3155–12–5
- Sheoran, S., Arora, S., Samsonraj, R., Govindaiah, P., & Vuree, S. (2022). Lipid-based nanoparticles for treatment of cancer. *Heliyon*, 8(5), e09403. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09403

Shukla, R. K., Badiye, A., Vajpayee, K., & Kapoor, N. (2021). Genotoxic Potential of

Nanoparticles: Structural and Functional Modifications in DNA. *Frontiers in Genetics*, *12*, 728250. <u>https://doi.org/10.3389/fgene.2021.728250</u>

- Si, M., & Lang, J. (2018). The roles of metallothioneins in carcinogenesis. *Journal of Hematology & Oncology*, *11*(1), 107. https://doi.org/10.1186/s13045-018-0645-x
- Simko, M., Nentwich, M., Gazsó, A., & Fiedeler, U. (2010). *How nanoparticles enter the human bodyand their effects there*.
- Sioen, S., Cloet, K., Vral, A., & Baeyens, A. (2020). The Cytokinesis-Block Micronucleus Assay on Human Isolated Fresh and Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Journal of Personalized Medicine*, 10(3), 125. <u>https://doi.org/10.3390/jpm10030125</u>
- Soenen, S. J., Manshian, B., Montenegro, J. M., Amin, F., Meermann, B., Thiron, T.,
 Cornelissen, M., Vanhaecke, F., Doak, S., Parak, W. J., De Smedt, S., & Braeckmans, K.
 (2012). Cytotoxic Effects of Gold Nanoparticles: A Multiparametric Study. *ACS Nano*,
 6(7), 5767–5783. <u>https://doi.org/10.1021/nn301714n</u>
- Sonwani, S., Madaan, S., Arora, J., Suryanarayan, S., Rangra, D., Mongia, N., Vats, T., & Saxena, P. (2021). Inhalation Exposure to Atmospheric Nanoparticles and Its Associated Impacts on Human Health: A Review. *Frontiers in Sustainable Cities*, *3*, 690444. <u>https://doi.org/10.3389/frsc.2021.690444</u>
- Souza, T. A. J., Franchi, L. P., Rosa, L. R., Da Veiga, M. A. M. S., & Takahashi, C. S. (2016).
 Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and
 CHO-XRS5 cell lines. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 795, 70–83. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2015.11.002
- Thomas, S., Harshita, B. S. P., Mishra, P., & Talegaonkar, S. (2015). Ceramic Nanoparticles:
 Fabrication Methods and Applications in Drug Delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 21(42), 6165–6188. <u>https://doi.org/10.2174/1381612821666151027153246</u>
- Tiwari, A. P., & Rohiwal, S. S. (2019). Synthesis and Bioconjugation of Hybrid Nanostructures for Biomedical Applications. In *Hybrid Nanostructures for Cancer Theranostics* (pp. 17–

41). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813906-6.00002-0

- Vallabani, N. V. S., & Karlsson, H. L. (2022). Primary and Secondary Genotoxicity of Nanoparticles: Establishing a Co-Culture Protocol for Assessing Micronucleus Using Flow Cytometry. *Frontiers in Toxicology*, *4*, 845987. <u>https://doi.org/10.3389/ftox.2022.845987</u>
- Verdon, R., Stone, V., Murphy, F., Christopher, E., Johnston, H., Doak, S., Vogel, U., Haase, A., & Kermanizadeh, A. (2022). The application of existing genotoxicity methodologies for grouping of nanomaterials: Towards an integrated approach to testing and assessment. *Particle and Fibre Toxicology*, *19*(1), 32. <u>https://doi.org/10.1186/s12989-022-00476-9</u>
- Vitulo, M., Gnodi, E., Meneveri, R., & Barisani, D. (2022). Interactions between Nanoparticles and Intestine. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4339. https://doi.org/10.3390/ijms23084339
- Wang, M., Lai, X., Shao, L., & Li, L. (2018). Evaluation of immunoresponses and cytotoxicity from skin exposure to metallic nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, *Volume 13*, 4445–4459. <u>https://doi.org/10.2147/IJN.S170745</u>
- Wang, Z., Tiruppathi, C., Minshall, R. D., & Malik, A. B. (2009). Size and Dynamics of Caveolae Studied Using Nanoparticles in Living Endothelial Cells. *ACS Nano*, 3(12), 4110–4116. <u>https://doi.org/10.1021/nn9012274</u>
- Xia, Q., Li, H., Liu, Y., Zhang, S., Feng, Q., & Xiao, K. (2017). The effect of particle size on the genotoxicity of gold nanoparticles: THE EFFECT OF PARTICLE SIZE ON THE GENOTOXICITY OF GOLD NANOPARTICLES. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(3), 710–719. https://doi.org/10.1002/jbm.a.35944
- Zabulionytė Ieva (2021). Sidabro (Ag) ir aliuminio oksido (Al₂O₃) nanodalelių genotoksiškumo tyrimas žmogaus periferinio kraujo limfocituose *in vitro*
- Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: Synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534. https://doi.org/10.3390/ijms17091534

Zhou, H., & McClements, D. J. (2022). Recent Advances in the Gastrointestinal Fate of Organic and Inorganic Nanoparticles in Foods. *Nanomaterials*, 12(7), 1099. <u>https://doi.org/10.3390/nano12071099</u>