



Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Mgr Bartłomiej Dominiak

Embriotoksyczność nanocząstek opartych na tlenkach metali

Embryotoxicity of nanoparticles based
on metal oxides

Rozprawa doktorska

Doctoral thesis

Rozprawa doktorska wykonana pod kierunkiem:

Dr hab. Michała M. Godlewskiego, prof. SGGW

Katedra Nauk Fizjologicznych

Instytut Medycyny Weterynaryjnej

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Warszawa, 2025

**Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej
przygotowanej przez doktoranta Szkoły Doktorskiej SGGW**

Oświadczam, że rozprawa doktorska autorstwa mgr Bartłomieja Dominiaka została przygotowana pod moim kierunkiem na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW i stwierdzam, że spełnia warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora.

Data 28.09.2025

Czytelny podpis promotora Michał Gallek

**Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej
będącego doktorantem Szkoły Doktorskiej SGGW**

Świadom/a odpowiedzialności prawnej, w tym odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia, oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przeze mnie samodzielnie na podstawie badań realizowanych w ramach kształcenia w Szkole Doktorskiej SGGW i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami prawa, w szczególności z ustawą z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tj. z dnia 28 października 2022 r., Dz.U. z 2022 r. poz. 2509 ze zm.)

Oświadczam, że przedstawiona rozprawa nie była wcześniej podstawą żadnej procedury związanej z uzyskaniem stopnia naukowego doktora.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja rozprawy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Przyjmuję do wiadomości, że rozprawa doktorska poddana zostanie procedurze antyplagiatowej.

Data 28.09.2025

Czytelny podpis autora rozprawy Bartłomiej Dominiak

Badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej finansowane były z grantu NCN:
Nr. 2021/41/B/NZ4/04424

Serdecznie dziękuję

dr hab. Michałowi M. Godlewskiemu, prof. SGGW
za opiekę i wsparcie naukowe, wiele inspirujących dyskusji oraz czas i zaangażowanie
podczas przygotowania tej rozprawy

prof. dr hab. Mikołajowi Gralakowi
za dzielenie się doświadczeniem, udzielane rady i pomocne wskazówki oraz
wszelkie dyskusje naukowe

dr Julicie Rosowskiej
za pomoc, życzliwe rady, wsparcie naukowe

Agnieszce
za nieocenione wsparcie, wyrozumiałość i cierpliwość oraz pomysły

Mamie i Babci
za możliwości rozwoju naukowego oraz wsparcie

Spis treści

1. Przegląd piśmiennictwa	31
1.1. Nanomateriały.....	31
1.2. Modele embriotoksyczności	32
1.3. Nanocząstki tlenku cynku (ZnO)	35
1.4. Nanocząstki tlenku cyrkonu (ZrO ₂)	45
1.5. Nanocząstki tlenku itru (Y ₂ O ₃)	46
2. Cel badań, hipotezy badawcze, zadania badawcze	47
3. Materiały i metody	49
3.1. Synteza i charakterystyka nanocząstek	49
3.2. Izolacja fibroblastów zarodków kurzych (CEFs)	49
3.3. Test żywotności komórek	50
3.4. Model badawczy zarodków kurzych <i>in-ovo</i>	50
3.5. Oznaczanie stężenia Zn metodą płomieniowej spektrometrii absorpcji atomowej (AAS).....	52
3.6. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)	52
3.7. Oznaczanie zawartości grup karbonylowych białek (CP)	52
3.8. Oznaczanie zawartości dialdehydu malonowego (MDA)	53
3.9. Mikromacierze	54
3.10. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR).....	55
3.11. Oznaczenia zawartości cytokin.....	56
3.12. Przygotowanie preparatów histologicznych	57
3.13. Barwienie hematoksyliną i eozyną	57
3.14. Mikroskopia konfokalna	58
3.15. Analiza statystyczna.....	59
4. Omówienie i dyskusja wyników	59
4.1. Nanocząstki ZnO	59

4.1.1. Charakterystyka morfologiczna nanocząstek ZnO metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)	59
4.1.2. Wyniki pomiarów potencjału zeta	61
4.1.3. Charakterystyka właściwości optycznych ZnO OVAL	62
4.1.4. Oznaczanie żywotności komórek	63
4.1.5. Stężenie Zn w zarodku i białku jaja dla po podaniu nanocząstek ZnO	63
4.1.6. Aktywność SOD po podaniu nanocząstek ZnO.....	65
4.1.7. Zawartość białek karbonylowanych po podaniu nanocząstek ZnO.....	66
4.1.8. Zawartość MDA po podaniu nanocząstek ZnO	66
4.1.9. Poziom cytokin po podaniu nanocząstek ZnO.....	67
4.1.10. Mikromacierze i ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)	68
4.1.11. Mikroskopia konfokalna	71
4.2. Dyskusja wyników dla biodegradowalnych nanocząstek ZnO	76
4.3. Wyniki dla nanocząstek ZrO ₂	82
4.3.1. Charakterystyka morfologiczna nanocząstek ZrO ₂ metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)	82
4.3.2. Wyniki pomiaru potencjału zeta	84
4.3.3. Oznaczanie żywotności komórek	85
4.3.4. Aktywność SOD po podaniu nanocząstek ZrO ₂	86
4.3.5. Zawartość białek karbonylowanych po podaniu nanocząstek ZrO ₂	87
4.3.6. Zawartość MDA po podaniu nanocząstek ZrO ₂	88
4.3.7. Mikroskopia konfokalna	89
4.4. Wyniki dla nanocząstek Y ₂ O ₃	93
4.4.1. Charakterystyka morfologiczna nanocząstek Y ₂ O ₃ metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)	93
4.4.2. Wyniki pomiarów potencjału zeta	94
4.4.3. Oznaczanie żywotności komórek	96
4.4.4. Aktywność SOD po podaniu nanocząstek Y ₂ O ₃	97

4.4.5. Zawartość białek karbonylowanych po podaniu nanocząstek Y_2O_3	99
4.4.6. Zawartość MDA po podaniu nanocząstek Y_2O_3	99
4.4.7. Poziom cytokin po podaniu nanocząstek ZrO_2 oraz Y_2O_3	100
4.4.8. Mikroskopia konfokalna	100
4.5. Dyskusja wyników dla niebiodegradowalnych nanocząstek ZrO_2 oraz Y_2O_3	104
5. Podsumowanie	108
6. Wnioski	118
7. Bibliografia	120

Spis rycin:

Ryc. 1. Uproszczony schemat różnicowania się wybranych narządów w modelu zarodka kurzego od zapłodnienia do wyklucia. Czarną linią zaznaczono moment początku funkcjonowania wewnątrz wydzielniczego trzustki oraz momentu najintensywniejszej erytropoezy w śledzionie. OUN – ośrodkowy układ nerwowy (na podstawie Freeman, Vince, 1974).....	35
Ryc. 2. Schemat przedstawiający lokalizację komory powietrznej, podanie 100 µl zawiesiny NP lub PBS (dla grupy kontrolnej, CTRL) do komory powietrznej przed rozpoczęciem inkubacji jaj. Jaja przeznaczone do analizy metodą AAS inkubowano od 3 do 7 dnia, natomiast jaja, z których zarodki były izolowane do oznaczeń aktywności SOD, zawartości MDA oraz karbonylacji białek inkubowano od 4. do 10. dnia. Rycina została przygotowana przy użyciu aplikacji Biorender.	51
Ryc. 3. Zestawienie zdjęć poglądowych rozwoju zarodka z 5, 7 oraz 10 dnia inkubacji.	51
Ryc. 4. Krzywa wzorcowa dla oznaczenia zawartości MDA.....	54
Ryc. 5. Schemat przedstawiający analizę mikromacierzy. Wyniki mikromacierzy analizowano w ujęciu horyzontalnym (wpływ nanocząstek OVAL i LONG w porównaniu z grupą kontrolną w dniach 4 i 5) oraz w ujęciu wertykalnym, ukazując zmiany specyficzne dla poszczególnych typów nanocząstek (ZnO OVAL i ZnO LONG) w ekspresji genów pomiędzy dniem 4 i 5, z wyłączeniem zmian związanych z naturalnym rozwojem zarodka kurzego (w grupie kontrolnej CTRL).	55
Ryc. 6. Mikrofotografie SEM nanocząstek ZnO: ZnO OVAL (A) i ZnO LONG (B).	60
Ryc. 7. Histogramy rozkładu rozmiaru z dopasowanymi krzywymi rozkładu log-normalnego dla nanocząstek ZnO na podstawie analizy obrazów SEM. A1, A2 – rozkład długości i średnicy nanocząstek ZnO OVAL; B1, B2 – rozkład długości i średnicy nanocząstek ZnO LONG. Średnią długość nanocząstek ZnO OVAL określono z pominięciem struktur bliźniaczych. Podano średnie arytmetyczne długości nanocząstek wraz z odchyleniem standardowym.	60
Ryc. 8. Rozkład potencjału zeta nanocząstek ZnO OVAL (A) i ZnO LONG (B).	61
Ryc. 9. Obrazy mikroskopii konfokalnej nanocząstek ZnO OVAL (A) i ZnO LONG (B) zdyspergowanych w wodzie, przedstawiające emisję fluorescencji przy 430–450 nm (wzbudzenie 405 nm), 505–525 nm (wzbudzenie 488 nm) oraz 560 IF (wzbudzenie 543 nm). Kształt agregatów nanocząstek widoczny przy użyciu detektora światła przechodzącego (Td). Widoczna niebieska fluorescencja w przypadku ZnO OVAL jest	

najprawdopodobniej związana z defektami powierzchni kryształów Zn, powstałymi w wyniku wbudowania Eu w matrycę krystaliczną. Powiększenie obiektywu 40×, zoom cyfrowy 5×. Skala 5 μm.....	62
Ryc. 10. Żywotność pierwotnych fibroblastów zarodków kurzych (CEFs) wyrażona jako % żywych komórek 24 h po podaniu ZnO OVAL (A) i ZnO LONG (B) w różnych stężeniach. W przypadku grupy kontrolnej (CTRL) do pożywki hodowlanej dodano odpowiednie objętości PBS.	63
Ryc. 11. Średnie stężenie cynku w białku jaja od 3 do 7 dnia inkubacji po podaniu jednokrotnej dawki 10 μg/ml (ZnO 10) lub 100 μg/ml (ZnO 100) nanocząstek ZnO OVAL bądź ZnO LONG.....	64
Ryc. 12. Średnie stężenie cynku w zarodkach kurzych od 3 do 7 dnia inkubacji po podaniu jednokrotnej dawki 10 μg/ml (ZnO 10) lub 100 μg/ml (ZnO 100) nanocząstek ZnO OVAL bądź ZnO LONG.....	64
Ryc. 13. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu jednokrotnej dawki 10 μg/ml (ZnO 10) lub 100 μg/ml (ZnO 100) nanocząstek ZnO OVAL lub ZnO LONG. 1U – ilość ekstraktu enzymatycznego powodująca 50% inhibicję tworzenia formazanu. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; ** p<0,01; *** p<0,001. Litery oznaczają istotność statystyczną: a – dawki istotnie różniące się względem innych dni eksperymentu; b, c – istotność statystyczna pomiędzy wskazanymi dniami.	65
Ryc. 14. Zawartość białek karbonylowanych (CP) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu jednokrotnej dawki 10 μg/ml (ZnO 10) lub 100 μg/ml (ZnO 100) nanocząstek ZnO OVAL lub ZnO LONG. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.	66
Ryc. 15. Zawartość dialdehydu malonowego (MDA) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu jednokrotnej dawki 10 μg/ml (ZnO 10) lub 100 μg/ml (ZnO 100) nanocząstek ZnO OVAL lub ZnO LONG. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; ** p<0,01; *** p<0,001.....	67
Ryc. 16. Porównanie ilości (pg/ml) IL-2 oraz VEGF w zarodkach z dnia 5 i 7 inkubacji po jednokrotnym podaniu nanocząstek ZnO OVAL oraz ZnO LONG w dawce 10 μg/ml. ..	68
Ryc. 17. Liczba wszystkich transkryptów, których ekspresja uległa istotnym statystycznie zmianom (test t moderowany, $p \leq 0,05$, FDR < 0,05), przedstawiona na diagramie Venna (A) oraz po uwzględnieniu zmian tylko w transkryptach o zmianę krotności (FC) ≥ 2 (B),	

ilość transkryptów odrzuconych po uwzględnieniu zmiany krotności (FC) ≥ 2 została przedstawiona na wykresach Vulcano (C).....	69
Ryc. 18. Względna ilościowa analiza ekspresji genów COL6A2, SDHA, PSMB7 i STEAP3. Gwiazdki oznaczają wysoki poziom istotności statystycznej w porównaniu z CTRL z dnia 4; *** $p < 0,001$	70
Ryc. 19. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL w stężeniach 10 $\mu\text{g/mL}$ (ZnO OVAL 10) i 100 $\mu\text{g/mL}$ (ZnO OVAL 100) w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Czerwona fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym 7-AAD, natomiast niebieska fluorescencja wskazuje nanocząstki ZnO OVAL. L – wątroba, K – nerka, G – jelito, V – naczynie. Skala 100 μm	72
Ryc. 20. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL w stężeniach 10 $\mu\text{g/mL}$ i 100 $\mu\text{g/mL}$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Czerwona fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym 7-AAD, natomiast niebieska fluorescencja wskazuje nanocząstki ZnO OVAL.	73
Ryc. 21. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL oraz ZnO LONG w stężeniu 10 $\mu\text{g/mL}$ w 5, 7 oraz 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Zielona fluorescencja wskazuje na obecność białka Bax (Prot.). Czerwona fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym 7-AAD (NUC.), natomiast niebieska fluorescencja wskazuje obecność nanocząstki ZnO OVAL (NPs). Skala 100 μm	74
Ryc. 22. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL oraz ZnO LONG w stężeniu 10 $\mu\text{g/mL}$ w 5, 7 oraz 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Zielona fluorescencja wskazuje na obecność białka Bcl2 (Prot.). Czerwona fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym 7-AAD (NUC.), natomiast niebieska fluorescencja wskazuje obecność nanocząstki ZnO OVAL (NPs). Skala 100 μm	75
Ryc. 23. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL oraz ZnO LONG w stężeniu 10 $\mu\text{g/mL}$ w 5, 7 oraz 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Zielona fluorescencja wskazuje na obecność aktywnej kaspazy-3 (CPP32) (Prot.). Czerwona fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym 7-AAD (NUC.), natomiast niebieska fluorescencja wskazuje obecność nanocząstki ZnO OVAL (NPs). Skala 100 μm	76

Ryc. 24. Mikrofotografie SEM przedstawiająca nanocząstki ZrO ₂ .	83
Ryc. 25. Histogram rozkładu wielkości z dopasowanymi krzywymi rozkładu log-normalnego dla wymiarów nanocząstek ZrO ₂ na podstawie analizy obrazów SEM.	83
Ryc. 26. Rozkład potencjału zeta nanocząstek ZrO ₂ .	84
Ryc. 27. Obrazy mikroskopii konfokalnej nanocząstek ZrO ₂ zdyspergowanych w wodzie, przedstawiające emisję fluorescencji przy 430–450 nm (wzbudzenie 405 nm), 505–525 nm (wzbudzenie 488 nm) oraz 560 IF (wzbudzenie 543 nm). Powiększenie obiektywu 40×, zoom cyfrowy 5×. Skala 5 μm.	85
Ryc. 28. Żywotność pierwotnych fibroblastów zarodków kurzych (CEFs) wyrażona jako % żywych komórek 24 h po podaniu nanocząstek ZrO ₂ w różnych stężeniach. W przypadku grupy kontrolnej (CTRL) do pożywki hodowlanej dodano odpowiednią objętość PBS...	86
Ryc. 29. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki 10 μg/ml (ZrO ₂ 10) lub 100 μg/ml (ZrO ₂ 100) nanocząstek ZrO ₂ . 1U – ilość ekstraktu enzymatycznego powodująca 50% inhibicję tworzenia formazanu. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; * p<0,05; *** p<0,001.	87
Ryc. 30. Zawartość białek karbonylowanych (CP) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki 10 μg/ml (ZrO ₂ 10) lub 100 μg/ml (ZrO ₂ 100) nanocząstek ZrO ₂ . Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; *** p<0,001.	88
Ryc. 31. Zawartość dialdehydu malonowego (MDA) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki 10 μg/ml (ZrO ₂ 10) lub 100 μg/ml (ZrO ₂ 100) nanocząstek ZrO ₂ . Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; *** p<0,001.	89
Ryc. 32. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZrO ₂ w stężeniach 10 μg/ml i 100 μg/ml w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20×. Niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, natomiast zielona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek ZrO ₂ . Skala 100 μm.	90
Ryc. 33. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZrO ₂ w stężeniach 10 μg/ml i 100 μg/ml w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20×. Dla zdjęć, gdzie z CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko Bax zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu ZrO ₂ - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst	

33342, czerwona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bax, natomiast zielona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek ZrO_2 . NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala 100 μm	91
Ryc. 34. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZrO_2 w stężeniach 10 $\mu g/ml$ i 100 $\mu g/ml$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Dla zdjęć, gdzie z CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko Bcl2 zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu ZrO_2 - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, czerwona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bax, natomiast zielona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek ZrO_2 . NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala 100 μm	92
Ryc. 35. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZrO_2 w stężeniach 10 $\mu g/ml$ i 100 $\mu g/ml$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Dla zdjęć, gdzie z CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko CPP32 zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu ZrO_2 - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, czerwona fluorescencja związana jest z obecnością białka CPP32, natomiast zielona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek ZrO_2 . NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala 100 μm	93
Ryc. 36. Mikrofotografie SEM nanocząstek Y_2O_3 niekalcynowane (A), po kalcynacji (B).	94
Ryc. 37. Histogram rozkładu wielkości z dopasowanymi krzywymi rozkładu log-normalnego dla wymiarów nanocząstek Y_2O_3 na podstawie analizy obrazów SEM.	94
Ryc. 38. Rozkład potencjału zeta nanocząstek Y_2O_3	95
Ryc. 39. Obrazy mikroskopii konfokalnej nanocząstek Y_2O_3 zdyspergowanych w wodzie, przedstawiające emisję fluorescencji przy 430–450 nm (wzbudzenia 405 nm), 505–525 nm (wzbudzenia 488 nm) oraz 560 IF (wzbudzenia 543 nm). Powiększenie obiektywu 40 $\times$, zoom cyfrowy 5 $\times$. Skala 10 μm	96
Ryc. 40. Żywotność pierwotnych fibroblastów zarodków kurzych (CEFs) wyrażona jako % żywych komórek 24 h po podaniu Y_2O_3 w różnych stężeniach. W przypadku grupy kontrolnej (CTRL) do pożywki hodowlanej dodano odpowiednią objętość PBS.	97
Ryc. 41. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki 10 $\mu g/ml$ (Y_2O_3 10) lub 100 $\mu g/ml$ (Y_2O_3 100) nanocząstek Y_2O_3 . 1U – ilość ekstraktu enzymatycznego powodująca 50% inhibicję	

tworzenia formazanu. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; *** $p < 0,001$	98
Ryc. 42. Zawartość białek karbonylowanych (CP) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ (Y_2O_3 10) lub 100 $\mu\text{g/ml}$ (Y_2O_3 100) nanocząstek Y_2O_3 . Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; *** $p < 0,001$	98
Ryc. 43. Zawartość dialdehydu malonowego (MDA) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ (Y_2O_3 10) lub 100 $\mu\text{g/ml}$ (Y_2O_3 100) nanocząstek Y_2O_3 . Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	99
Ryc. 44. Porównanie ilości (pg/ml) IL-2 oraz VEGF w zarodkach z dnia 5 i 7 inkubacji po podaniu nanocząstek ZrO_2 oraz Y_2O_3 w dawce 10 $\mu\text{g/ml}$	100
Ryc. 45. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek Y_2O_3 w stężeniach 10 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Niebieska fluorescencja odpowiada jądrówkom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y_2O_3 . Skala 100 μm . Skala 100 μm	101
Ryc. 46. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek Y_2O_3 w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Dla zdjęć CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko Bax zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu Y_2O_3 - niebieska fluorescencja odpowiada jądrówkom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bax, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y_2O_3 . NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala 100 μm	102
Ryc. 47. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek Y_2O_3 w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Dla zdjęć CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko Bcl2 zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu Y_2O_3 - niebieska fluorescencja odpowiada jądrówkom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bcl2, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y_2O_3 . NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala 100 μm	103

Ryc. 48. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek Y_2O_3 w stężeniu 10 $\mu g/ml$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Dla zdjęć CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko aktywnej kaspazy-3 (CPP32) zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu Y_2O_3 - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja związana jest z obecnością białka aktywnej kaspazy-3 (CPP32), natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y_2O_3 . NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala 100 μm 104

Ryc. 49. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL, ZrO_2 i Y_2O_3 w stężeniach 10 $\mu g/ml$ i 100 $\mu g/ml$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Dla ZnO czerwona fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym 7-AAD, natomiast niebieska fluorescencja wskazuje nanocząstki ZnO OVAL. Dla ZrO_2 niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, natomiast zielona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek ZrO_2 . Y_2O_3 niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y_2O_3 . Skala 100 μm 109

Ryc. 50. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek: ZnO OVAL, ZnO LONG, ZrO_2 i Y_2O_3 w stężeniu 10 $\mu g/ml$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek: ZnO OVAL, ZnO LONG, ZrO_2 i Y_2O_3 w stężeniu 10 $\mu g/ml$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Dla zdjęć CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko Bax zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu Y_2O_3 - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bax, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y_2O_3 . NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Natomiast białko aktywnej kaspazy-3 (CPP32) zieloną. Natomiast białko Bcl2 zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu Y_2O_3 - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bcl2, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y_2O_3 . W przypadku zdjęć po podaniu Y_2O_3 - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja

związana jest z obecnością białka aktywnej kaspazy-3 (CPP32), natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y_2O_3 . Skala 100 μm 112

Ryc. 51. Przekroje zarodków kurzych w **5. dniu inkubacji** (A – e, Bar=500 μm), **7. dniu inkubacji** (F – j, Bar=1 mm, Bar=500 μm) oraz w **10. dniu inkubacji** (K – r', Bar=1 mm, Bar= 2 mm) po podaniu nanocząstek w stężeniu 10 $\mu g/ml$ i 100 $\mu g/ml$. Barwienie H-E. 114

Ryc. 52. Obraz mikroskopowy narządów i struktur we wczesnej fazie rozwoju zarodków kurzych w **5. dniu inkubacji** (A – D), **7. dniu inkubacji** (E – h) oraz w **10. dniu inkubacji** (K –l) po podaniu nanocząstek w stężeniu 10 $\mu g/ml$ i 100 $\mu g/ml$. Barwienie H-E.... 116

Spis tabel:

Tabela 1. Średni rozmiar hydrodynamiczny wraz z odchyleniem standardowym oraz indeks polidispersyjności (PDI) nanocząstek ZnO mierzony w 25 °C.....	61
Tabela 2. Zmiany ekspresji genów (ich transkryptów) określone z zastosowaniem mikromacierzy zostały zwalidowane RT-qPCR. Zmiany ekspresji genów wyrażono jako zmiana krotności (ang. Fold change, FC) pomiędzy dniem 4 a 5 oraz wartość p (skorygowaną FDR) < 0,01.....	70
Tabela 3. Średni rozmiar hydrodynamiczny wraz z odchyleniem standardowym oraz indeks polidispersyjności (PDI) nanocząstek ZrO ₂ zmierzony w 25 °C.	84
Tabela 4. Średni rozmiar hydrodynamiczny wraz z odchyleniem standardowym oraz indeks polidispersyjności (PDI) nanocząstek Y ₂ O ₃ mierzony w 25 °C.	95

Streszczenie:

Nanotechnologia jest jedną z najszybciej rozwijających się dziedzin nauki. Produkty nanotechnologii charakteryzują się tym, że co najmniej jeden z ich wymiarów fizycznych mieści się w nanoskali. W miarę miniaturyzacji materiałów do nanoskali – tj. do rozmiarów zbliżonych do wymiarów atomowych – ich dotychczas dobrze znane właściwości zaczynają nabierać zupełnie nowych charakterystyk. We wczesnej fazie rozwoju nanotechnologii odkrycie tych właściwości wywołało entuzjazm dotyczący ich praktycznych zastosowań, co doprowadziło do szybkiego wprowadzenia nanomateriałów do przemysłu i produktów codziennego użytku. W konsekwencji, wzrosło nagromadzenie nanocząstek w środowisku, a także narażenie ludzi i zwierząt na ich działanie. Niestety, dopiero na późniejszym etapie zwrócono uwagę na konieczność odpowiedniej oceny nanomateriałów przed wprowadzeniem ich na rynek, czego przykładem jest decyzja Unii Europejskiej o zakazie stosowania TiO_2 jako dodatku do żywności. Obecnie potwierdzono, że nanocząsteczki mogą łatwo przedostawać się do organizmu i przekraczać bariery fizjologiczne. Ani bariera krew-mózg, ani bariera łożyskowa nie stanowią dla nich przeszkody. Szczególnie bariera łożyskowa budzi wiele kontrowersji w kontekście bezpieczeństwa stosowania nanocząsteczek, ze względu na zwiększone ryzyko narażenia na nanocząstki w stadium embrionalnym. Pomimo licznych badań nad embriotoksycznością nanocząstek, kwestia bezpieczeństwa nanocząstek w rozwoju zarodkowym pozostaje nadal otwarta. Duża liczba wykorzystanych modeli badawczych, dawki często przekraczające normy ustalone dla środowiska lub produkcji zwierzęcej oraz różnice między właściwościami fizycznymi badanych nanocząstek sprawiają, że nie można z całkowitą pewnością stwierdzić, czy nanocząstki są bezpieczne w użyciu. Jednymi z powszechnie uznawanych za bezpieczne i zatwierdzonych nanocząstek są nanocząstki ZnO . Są one uważane za bezpieczne ze względu na swoją biodegradowalność i naturalne występowanie cynku (w tym nanocząstek) w organizmie. Ponadto dotychczasowe badania na organizmach dorosłych wykazały, że nanocząstki ZnO nie wykazują negatywnego wpływu biologicznego, gdy są stosowane w dopuszczalnych stężeniach. Inne nanocząstki, które wykazują potencjał zastosowania i zostały uwzględnione w niniejszym badaniu, to niebiodegradowalne nanocząsteczki ZrO_2 i Y_2O_3 , które ze względu na swój potencjał domieszkowy są uważane za doskonałe markery biologiczne lub patologiczne.

Celem niniejszej pracy było porównanie potencjalnej embriotoksyczności nanocząstek na modelu zarodka kurzego, różniących się między sobą dwoma modalnościami: biodegradowalności oraz kształtu.

Przeprowadzone badania dają pełny obraz tego, jak czynniki fizyczne (kształt i biodegradowalność) oraz zastosowana dawka wpływają na rozwój embrionalny. Model *in-ovo* został zaproponowany, ponieważ wyklucza wpływ organizmu matki i potwierdzonego transferu nanocząstek przez barierę łożyskową, co stanowi ograniczenie modelu ssaków. Na podstawie analizy literatury i wcześniejszych eksperymentów na modelu mysim (ssaczym) sformułowano następujące hipotezy:

1. Nanocząstki tlenków metali (ZnO , ZrO_2 i Y_2O_3) przenikają do tkanek zarodka kurzego, a ich dystrybucja zależy od kształtu i dawki.
2. Nanocząstki tlenków metali o różnym kształcie (owalne vs. podłużne) nie wpływają na rozwój zarodka i nie indukują niekorzystnych zmian w jego tkankach.

Materiałem badawczym były zarodki kurze w modelu *in-ovo*, co umożliwiło ich rozwój w izolowanej przestrzeni, oddzielonej od wpływu matki. W eksperymentach wykorzystano dwa rodzaje biodegradowalnych nanocząstek ZnO o różnych kształtach oraz odpowiadające im niebiodegradowalne nanocząstki ZrO_2 i Y_2O_3 w dwóch dawkach (10 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$). W badaniu wykorzystano nanocząsteczki o kształcie owalnym ZnO (ZnO OVAL) i ZrO_2 oraz nanocząstki o kształcie igieł ZnO (ZnO LONG) oraz Y_2O_3 .

ZnO OVAL i obie nanocząstki niebiodegradowalne zostały domieszkowane pierwiastkami ziem rzadkich, co pozwoliło potwierdzić ich obecność w tkankach rozwijającego się organizmu pod mikroskopem konfokalnym. Do potwierdzenia poziomu cynku w tkankach embrionalnych wykorzystano również płomieniową spektrometrię absorpcji atomowej. W celu określenia potencjalnej embriotoksyczności nanocząstek zbadano wpływ ekspozycji na nie na markery stresu oksydacyjnego, takie jak aktywność SOD, poziom MDA i zawartość białek karbonylowanych (CP). Ponadto zbadano wpływ ekspozycji na nanocząstki na poziom markerów apoptozy, profil cytokin, a także przeprowadzono analizę histopatologiczną.

Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że wszystkie badane nanocząsteczki przenikały do tkanek zarodka, jednakże występowały widoczne różnice w ich rozmieszczeniu w zależności od kształtu i zastosowanej matrycy. Jedynie biodegradowalne

nanocząsteczki ZnO o owalnym kształcie (ZnO OVAL) przenikały równomiernie do tkanek zarodka, a ponadto były jedynymi, które powodowały ograniczone zmiany w markerach stresu oksydacyjnego i wykazywały znaczący potencjał antyapoptotyczny. Z drugiej strony, nanocząsteczki te spowodowały znaczące wyższe zmiany w ekspresji genów, głównie w szlakach homeostazy energetycznej i systemach sygnalizacji wewnątrzkomórkowej. Zastosowanie podłużnych nanocząstek ZnO (ZnO LONG) oraz niebiodegradowalnych nanocząstek ZrO_2 i Y_2O_3 spowodowało znacznie silniejsze zmiany w markerach stresu oksydacyjnego i markerach apoptozy. Podsumowując, hipoteza pierwsza została potwierdzona, natomiast pełne potwierdzenie bądź odrzucenie hipotezy drugiej wymaga dalszych badań.

Głównymi aspektami wpływającymi na rozwój nauki, które wynikają z przeprowadzonych badań, oprócz wyżej wymienionego wpływu nanocząstek na stres oksydacyjny, markery apoptozy i poziom ekspresji genów w tkankach embrionalnych, jest wskazanie nerek za główny organ wydalający nanocząstki u ptaków lub embrionów (w przeciwieństwie do dorosłych ssaków, u których za eliminację nanocząstek odpowiada wątroba) oraz obserwacja, że pomimo znaczących zmian w stanie redoks i zmian w poziomie ekspresji genów, nie zaobserwowano ogólnego negatywnego wpływu nanocząstek na zarodki, zarówno w ocenie histopatologicznej jak i w śmiertelności embrionów. Spośród wszystkich nanocząstek wykorzystanych w niniejszym badaniu, najbardziej bezpieczne wydają się nanocząstki ZnO OVAL, ponieważ wykazują one najmniejszy wpływ na markery stresu oksydacyjnego i korzystny potencjał antyapoptotyczny, niezależnie od ich przytłaczającego wpływu na ekspresję genów. Z punktu widzenia genomiki najbardziej interesujący jest wpływ na szlaki kinazy tyrozynowej (z perspektywy onkologicznej) oraz szlaki transkomórkowego transferu żelaza (z perspektywy wykorzystania nanocząstek jako nośników suplementów żelaza).

Słowa kluczowe: embriotoksyczność, model zarodka kurzego, nanocząstki tlenków metali, stres oksydacyjny, analiza genomiczna

Summary:

Nanotechnology is one of the most rapidly developing fields of science. Products of nanotechnology are characterized by having at least one physical dimension within the nanoscale. As materials are miniaturized to the nanoscale – i.e., to sizes approaching atomic dimensions – their, hitherto well-established properties, begin to acquire entirely new characteristics. In the early phase of nanotechnology, the discovery of these properties stimulated enthusiasm for practical applications, leading to the rapid introduction of nanomaterials into industry and everyday consumer products. Consequently, environmental accumulation has increased, as has environmental exposure to nanoparticles in both humans and animals. Unfortunately, at a later stage, attention turned to appropriate pre-market evaluation of nanomaterials, as shown by the European Union's decision to prohibit the use of TiO_2 as a food additive. Today, it has been confirmed that nanoparticles are able to easily enter the body and cross physiological barriers. Neither the blood-brain barrier nor the placental barrier pose obstacle to them. Especially the placental barrier raises a lot of controversy in terms of nanoparticle use safety, due to enhanced chance of exposure to nanoparticles at the embryonic stage. Despite numerous studies on the embryotoxicity of nanoparticles, the question of the safety of nanoparticles on embryonic development remains unanswered. The large number of research models used, doses, often exceeding the standards set for the environment or animal production, and differences between the physical characteristics of tested nanoparticles, all make it impossible to say with complete certainty whether nanoparticles are safe to use. One of the generally considered safe and approved nanoparticles are ZnO nanoparticles. They are considered safe due to their biodegradability and the natural occurrence of zinc (including nanoparticles) in the body. Furthermore, hitherto studies on adult organisms proved that ZnO nanoparticles show no negative biological effects in studied organisms, when used in approvable concentrations. Other nanoparticles that show application potential and have been included in this study are non-biodegradable ZrO_2 and Y_2O_3 nanoparticles, which due to their doping potential are considered as a great markers of biological or pathological markers.

The aim of this work was to compare the potential embryotoxicity of nanoparticles on a chicken embryo model, differing in two modalities: biodegradability and shape.

Current studies offer a more comprehensive picture of how physical factors (shape and biodegradability), together with dosage, affect embryonic development. *In-ovo* model

was proposed since it excludes the influence of the mother's body and confirmed transfer of nanoparticles via placental barrier, which is a limitation of the mammalian model. From literature evaluation and previous experiments on mouse (mammalian) model, the following hypotheses have been formulated:

1. Metal oxide nanoparticles (ZnO, ZrO₂ and Y₂O₃) penetrate chicken embryo tissues, and their distribution depends on their shape and dose.
2. Metal oxide nanoparticles of different shapes (oval vs. elongated) do not affect embryo development and do not induce adverse changes in its tissues.

The research material were chicken embryos in an *in-ovo* model, which enabled their development in an isolated compartment, separate from mother influence. Two types of ZnO, biodegradable, nanoparticles with different shapes and corresponding, nonbiodegradable, ZrO₂ and Y₂O₃ nanoparticles were used in the experiments in two doses 10 µg/ml and 100 µg/ml). Oval-shaped ZnO (ZnO OVAL) nanoparticles and ZrO₂ and needle-shaped ZnO (ZnO LONG) and Y₂O₃ were used in the study. ZnO OVAL and both nonbiodegradable nanoparticles were doped with rare earth elements, which allowed confirmation of their presence in the in tissues of the developing organism under confocal microscopy. Atomic absorption spectroscopy was also used to confirm the levels of Zn in the embryo tissues. In order to determine the potential embryotoxicity of nanoparticles, effect of their exposure to oxidative stress markers such as SOD activity, MDA and carbonylated protein levels were examined. Furthermore, the effects of nanoparticle exposure on the levels of apoptosis markers and cytokine profile were examined, as well as histopathological analysis were conducted.

Performed experiments showed that all the tested nanoparticles penetrated the embryo tissues; however, there were visible differences in their distribution depending on their shape and the matrix used. Only the biodegradable oval-shaped ZnO nanoparticles (ZnO OVAL) uniformly penetrated the embryo tissues, furthermore, they were the only that caused the limited changes in oxidative stress markers and showed significant anti-apoptotic potential. On the other hand, those nanoparticles caused extremely significant changes in the gene expression, mainly in the energy homeostasis pathways and intracellular signalling systems. At the same time, long ZnO (ZnO LONG) and non-biodegradable ZrO₂, and Y₂O₃ nanoparticles caused significantly stronger changes in oxidative stress markers and apoptosis markers. Reassuring, the hypothesis one was confirmed, whereas hypothesis two requires further scrutiny. From one hand, none of the

used nanoparticles (in used doses) showed any changes in embryo mortality nor any histopathological changes, however their impact on oxidative stress and, especially in the case of ZnO OVAL nanoparticles, on gene expression requires further scrutiny and following studies.

The main influence on the scientific field, apart from the above-shown impact of nanoparticles on the oxidative stress, apoptotic markers and the gene expression levels in the embryonic tissues are recognition of kidneys as the main nanoparticle ejection tissue in birds or embryos (as opposed to adult mammals, where liver is considered the main exit point for nanoparticles) and the observation, that regardless of significant changes in red-ox status and changes at the gene expression levels, no negative impact was observed in histopathology and mortality of embryos. From all nanoparticles used in the current study, the most biosafe seem ZnO OVAL nanoparticles, as they show the lowest impact on the oxidative stress markers and beneficial antiapoptotic potential, regardless of their overwhelming impact on the gene expression. From the genomic level, the most interesting are impact on the tyrosine kinase pathways (oncology perspective) and the pathways of transcellular iron transfer (perspective of the use of nanoparticles as iron supplements carriers).

Key words: embryotoxicity, chicken embryo model, metal oxide nanoparticles, oxidative stress, microarray study

Spis skrótów:

7-AAD – 7-aminoaktynomycyna D

AAS – ang. Atomic Absorption Spectroscopy, płomieniowa spektrometria absorpcji atomowej

BHT – butylowany hydroksytoluen

CAT – katalaza

CEFs – pierwotne fibroblasty zarodków kurzych

c-jun – protoonkogen jun

CNCCs – ang. cranial neural crest cells, komórki grzebienia nerwowego czaszkowego

COL6A2 – łańcuch alfa-2 kolagenu VI

CPP32 – aktywna kaspaza-3

CP – białka karobnylowane

CTRL – grupa kontrolna

CVD – ang. chemical vapour deposition, chemiczne osadzanie z fazy gazowej

DLS – dynamiczne rozpraszania światła

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNPH – 2,4-dinitrofenylohydrazyny

DTT – ditiotretitol

EDX – Energy Dispersive X-ray

ELS – elektroforetyczne rozpraszania światła

FBS – płodowa surowica bydlęca

FDA – ang. Food and Drug Administration, Amerykański Urząd ds. Żywności i Leków

GPx – peroksydaza glutationowa

H₂O₂ – nadtlenek wodoru

H₃PO₄ – kwasie fosforowym

HTS – badania przesiewowe o wysokiej przepustowości

IFN- α – interferon alfa

IFN- γ – interferon gamma

IL-10 – interleukina 10

IL-16 – interleukina 16

IL-1 β – interleukina-1 β

IL-2 – interleukina 2

IL-21 – interleukina 21

IL-6 – interleukina 6

M-CSF – czynnik stymulujący tworzenie kolonii makrofagów

MDA – dialdehyd malonowy

MIP-1 α /CCL3 – białko zapalne makrofagów 1 alfa

MxA – Myxovirus resistance A

NBT – ang. nitro blue tetrazolium chloride, błękit nitrotetrazolowy

NPs – nanocząstki

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PBS – sól fizjologiczna buforowana fosforanem

PDI – indeks polidispersyjności

PMSF – fenylo-metylo-sulfonylu-fluorek

PSMB7 – podjednostka beta 7 proteasomu 20S

ROS – reaktywne formy tlenu

RPL13 – białko rybosomalne 60S L13

RT – temperatura pokojowa

SAPE – streptawidyną sprzężoną z fykoerytryną

SCENHIR - ang. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health,
Komitetu Naukowego ds. Pojawiających się i Nowo Rozpoznanych Zagrożeń dla Zdrowia

SD – odchylenie standardowe

SDHA – podjednostka flawoproteinowa dehydrogenazy bursztynianowej [ubichinonowej],
mitochondrialna

SEM – ang. scanning electron microscopy, skaningowa mikroskopia elektronowej

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

STEAP3 – metalloreduktaza STEAP3

TBA – kwas tiobarbiturowy

TCA – kwas trójchlorooctowy

TNF α – czynnik martwicy nowotworowej- α

UE – Unia Europejska

VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego

Y₂O₃ – tlenek itru

ZnO – tlenek cynku

ZnO LONG – podłużne nanocząstki ZnO

ZnO OVAL – obłe nanocząstki ZnO

ZrO₂ – tlenek cyrkonu

1. Przegląd piśmiennictwa

1.1. Nanomateriały

Jedną z najbardziej rozwijających się dziedzin nauki w XXI wieku można określić nanotechnologię. Zgodnie z definicją przyjętą w Unii Europejskiej (UE) jest to dziedzina zajmująca się projektowaniem, charakteryzowaniem, wytwarzaniem i zastosowaniem struktur, urządzeń oraz systemów poprzez kontrolę kształtu i rozmiaru w nanoskali (SCENHIR, 2006). Nanomateriały natomiast, są to materiały, które w przynajmniej jednym z wymiarów fizycznych mają rozmiar mniejszy niż 100 nm (European Commission, 2022). Definicja oparta o wymiary fizyczne jest najprostszą formą definiowania nanomateriałów, na której często oparte jest umiejscowienie nanomateriałów w kontekście prawnym zarówno w przepisach pochodzących z Unii Europejskiej, jak również w innych krajach na świecie. Podejście to, pozwala na utworzenie ram umownych, koniecznych w przypadku harmonizacji prawa. W zależności od tego, ile z trzech wymiarów fizycznych znajduje się w zakresie 1 – 100 nm, rozróżniamy nanowarstwy mające jeden wymiar w wymaganym zakresie, nanowłókna (posiadające dwa wymiary w zakresie do 100 nm) oraz nanocząstki (NPs) mające wszystkie wymiary w tym zakresie. Podejście takie jest stosowane powszechnie na świecie, jednakże trzeba mieć świadomość, że nie jest ono jedyne. Amerykański Urząd ds. Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration, FDA) w „Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials - Guidance for Industry” (Food and Drug Administration, 2022) mimo, że mówi wprost o tym, że nie jest on wiążący prawnie to zakłada, że nanomateriałami mogą być materiały, które mają umyślnie wymiar w zakresie 1 – 100 nm lub nawet do 1000 nm jeśli wykazują właściwości lub zjawiska zależne od rozmiaru (D'Mello i in., 2017). Również w opinii Komitetu Naukowego ds. Pojawiających się i Nowo Rozpoznanych Zagrożeń dla Zdrowia (ang. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health, SCENHIR) pt. „Scientific basis for the definition of "nanomaterial"” z 2010 roku (SCENHIR, 2010) sugerowano, że górny limit 100 nm nie ma podstaw naukowych, natomiast może ograniczać klasyfikację nanomateriałów. W opinii tej autorzy skłaniali się do uwzględniania wszystkich materiałów dla skali nanometrycznej 1 – 999 nm. Dlatego należy mieć na uwadze, że pomimo istnienia prostej definicji nanomateriałów, nie jest ona arbitralna oraz w dalszym ciągu zachodzą w niej zmiany (Alshammari i in., 2023; Chandra i C, 2021).

Wraz ze zmianą rozmiaru materiału do skali nanometrycznej dochodzi do zmian w jego właściwościach fizyko-chemicznych (He i in., 2018). Powoduje to, że w porównaniu do materiałów w skali makro mamy do czynienia z materiałami o zupełnie nowych właściwościach i tym samym o nowych potencjalnych zastosowaniach. Rozpowszechnienie badań z zakresu nanotechnologii prowadzi jednocześnie do intensyfikacji wprowadzenia jej produktów na rynek. W efekcie tego, nanocząstki są obecnie wykorzystywane w takich gałęziach przemysłu jak przemysł spożywczy, kosmetyczny, elektroniczny, rolnictwo (Vance i in., 2015). Oczywiście największe nadzieje budzi wykorzystanie nanocząstek w medycynie jako np. nośników leków, markerów nowotworów do wczesnego ich wykrywania oraz wykorzystanie nanocząstek w ich leczeniu (Celá i in., 2014; De Jong i Borm, 2008; Kaszewski i in., 2017). Z uwagi na szerokie potencjalne zastosowanie nanomateriałów początkowo dochodziło do nadmiernego wprowadzania ich na rynek z założeniem, że ich toksykologia jest porównywalna do materiałów w skali np. mikro, co okazało się błędne (Gleiter, 1995; Rodriguez i in., 2002). Na podstawie dotychczasowych badań wiadomo już, że nanocząstki mogą przedostawać się do organizmu zarówno przez drogę pokarmową wraz z jedzeniem oraz płynami, jak również przez układ oddechowy, lub są zdolne do przenikania bariery jaką stanowi skóra. Po dostaniu się nanocząstek do wnętrza organizmu trafiają one do krwioobiegu, z którym następnie trafiają do wszystkich narządów organizmu (Kaszewski i in., 2016; Kielbik i in., 2017; Kielbik i in., 2019a; Kielbik i in., 2019b). Co wyjątkowo niepokojące, wykazano już, że nanocząstki są zdolne do przenikania m.in. bariery krew-mózg oraz bariery łożyskowej (Müller i in., 2018). To właśnie, narażenie w trakcie rozwoju embrionalnego i potencjalnego wpływu nanocząstek na ten proces budzi szczególne emocje wokół stosowania nanomateriałów. Ze względu na wspomniane punkty wraz ze wzrostem wykorzystywania nanocząstek oraz zwiększenia narażenia na nie zarówno ludzi jak i zwierząt, konieczna jest odpowiednia ocena bezpieczeństwa stosowania nanocząstek oraz ich potencjalnej embriotoksyczności.

1.2. Modele embriotoksyczności

W celu sprawdzenia potencjalnej embriotoksyczności nanocząstek dotychczasowe badania najczęściej starały się wykorzystywać modele kręgowców, które możemy podzielić na ryby, spośród których najczęściej stosowany był danio pręgowany (*Danio rerio*). Modele ssące, do których zaliczamy badania z wykorzystaniem myszy lub

szczurów. Ostatni model, który zyskuje na popularności to model ptasi, w którym najczęściej wykorzystywane są jaja kury domowej (*Gallus gallus*).

Model *Danio rerio* jest powszechnie stosowany w badaniach embriotoksycznych i rozwojowych, ze względu na cechy, które ułatwiają ten rodzaj badań. Po pierwsze, zarodki rozwijają się na zewnątrz, w środowisku wodnym, co pozwala na łatwą i ciągłą obserwację morfologii oraz etapów organogenezy bez konieczności stosowania metod ingerujących w organizm matki. Dodatkowo, przezroczystość zarodków i cienka osłona wczesnych stadiów umożliwiają bezpośrednie śledzenie rozwoju narządów oraz łatwe podawanie związków chemicznych poprzez środowisko wodne (Bugel i in., 2014; d'Amora i Giordani, 2018). W ciągu pierwszych 48–72 h rozwoju kształtują się i zaczynają funkcjonować główne układy m. in. nerwowy (mózg, oczy) i układ krążenia (serce i naczynia krwionośne) (Kimmel i in., 1995). Jednak, do pełnego wykorzystania modelu *Danio rerio* niezbędne jest zastosowanie platform do badań przesiewowych o wysokiej przepustowości (HTS), umożliwiających ocenę większej liczby osobników w każdej analizie porównawczej. Dzięki wykorzystaniu HTS możliwe jest badanie setek zarodków jednocześnie oraz porównywanie wielu czynników środowiskowych w jednym eksperymencie, co umożliwia wykrywanie nawet subtelnych różnic i trendów między grupami badawczym (Reif i in., 2016).

Model *Danio rerio*, pomimo szerokiego zastosowania w badaniach toksykologicznych, wykazuje istotne ograniczenia w kontekście oceny embriotoksyczności u ssaków. Po pierwsze, brak jest jednoznacznej korelacji pomiędzy poziomami toksycznej ekspozycji u ryb a wartościami progowymi, które wywołują toksyczność u ssaków, co utrudnia ekstrapolację wyników (European Medicines Agency, 2020). Dodatkowo, pomiar stężeń związków w obrębie zarodków danio jest technicznie trudny, a nominalne stężenie w wodzie nie odzwierciedla rzeczywistego narażenia tkanek (Ali i in, 2011; Nawaji i in, 2024).

Problemem są także ograniczenia fizykochemiczne tego modelu: zarodki są bardzo małe (ok. 0,44 mg/larwę), zawierają wysoki poziom lipidów (~15%) i zazwyczaj poddawane są stężeniom znacznie poniżej wartości progowych (<1% LC50). Wymaga to stosowania wysoce czułych i specjalistycznych technik analitycznych, co utrudnia ilościową ocenę zależności dawka–efekt (Oro-Carretero i Sanz-Landaluze, 2023).

Ponadto, bioakumulacja substancji chemicznych u ryb może znacząco różnić się od tej u ssaków, zwłaszcza w przypadku związków o zróżnicowanej hydro- i lipofilności czy

różnic w polarności cząsteczek, co może prowadzić do niedoszacowania lub przeszacowania potencjalnie szkodliwych stężeń (Oro-Carretero i Sanz-Landaluze, 2023). Kolejnym ograniczeniem jest brak łożyska oraz fundamentalne różnice w embriogenezie, które sprawiają, że modele rybnie nie odzwierciedlają w pełni procesów rozwojowych zachodzących u ssaków (Ali i in., 2011).

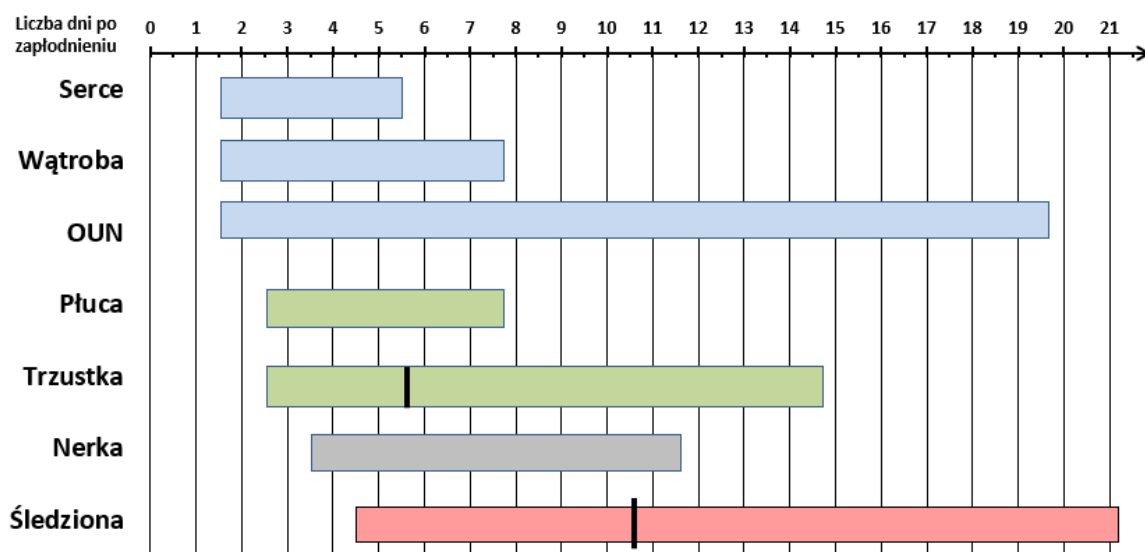
Z kolei modele ssące, takie jak zarodki myszy czy szczurów, wykazują największe podobieństwo do procesów zachodzących u ludzi, w tym do kluczowych etapów embriogenezy oraz funkcjonowania łożyska. Pozwalają one na wiarygodne odtworzenie interakcji matczyno-płodowych, jednak ich stosowanie wiąże się z wysokimi kosztami, długim czasem trwania eksperymentów oraz znacznymi obciążeniami etycznymi i regulacyjnymi (Sarnella i in., 2024). Model myszy jest podstawowym, najlepiej poznanym modelem ssaczym w badaniach rozwojowych i embriotoksycznych, cenionym za wysokie podobieństwo genetyczne do człowieka (Taft, 2008) i szerokie możliwości modyfikacji genetycznych oraz dobrze zdefiniowany genom, co umożliwia analizę mechanizmów molekularnych rozwoju i chorób.

Istotnym ograniczeniem modelu myszy, w kontekście oceny wpływu substancji na zarodek jest obecność łożyska i metabolizm matki oraz systemy transportu przez barierę łożyskową. Mogą one zmieniać ilość i biodostępność substancji docierających do zarodka, utrudniając bezpośrednie rozdzielenie efektów pośrednich (matczyńnych) od efektów bezpośrednich na rozwijający się organizm (Bloise i in., 2013).

Na tym tle szczególnie atrakcyjny jest model kurzych zarodków *in ovo*, w którym substancje testowe podaje się bezpośrednio do komory powietrznej. Zarodki rozwijają się w naturalnym środowisku jaja, co pozwala na wierne odwzorowanie procesów rozwojowych. Taka droga podania umożliwia precyzyjne dawkowanie i badanie oddziaływania nanocząstek, przy zachowaniu ciągłości naturalnego przebiegu embriogenezy (Ghimire i in., 2022).

Model *in ovo* dzięki prostej metodyce, krótkiemu czasowi trwania eksperymentów oraz możliwość analizy całego organizmu, pozwala na szczegółowe monitorowanie procesów rozwojowych oraz odpowiedzi biologicznych po zastosowaniu badanych nanocząstek (Fidan i in., 2023). Dzięki temu, że rozwój zachodzi wewnątrz jaja, jest to zamknięte środowisko i nanocząstki nie mogą przemieścić się poza przestrzeń, gdzie

rozwija się zarodek. Umożliwia to precyzyjną kontrolę dawki nanocząstek na którą jest narażony zarodek (Yan i in., 2020).



Ryc. 1. Uproszczony schemat różnicowania się wybranych narządów w modelu zarodka kurzego od zapłodnienia do wyklucia. Czarną linią zaznaczono moment początku funkcjonowania wewnątrz wydzielniczego trzustki oraz momentu najintensywniejszej erytropoezy w śledzionie. OUN – ośrodkowy układ nerwowy (na podstawie Freeman, Vince, 1974).

Dzięki intensywnemu rozwojowi w modelu *in ovo* możliwe jest zaobserwowanie potencjalnych zmian w rozwoju prawie wszystkich poszczególnych narządów do 21 dnia inkubacji (Ryc. 1). Trzustka zyskuje swoją zdolność wewnątrz wydzielniczą już 5 dnia inkubacji. Jedynie rozwój śledziony kończy się do 10 tygodnia po wykluciu, jednakże w dniu 10 inkubacji dochodzi w niej do najintensywniejszej erytropoezy (Çolakoğlu i Selçuk, 2020; Freeman i Vince, 1974).

1.3. Nanocząstki tlenku cynku (ZnO)

ZnO to konwencjonalny półprzewodnik o szerokiej przerwie energetycznej, będący jednym z najczęściej stosowanych tlenków metali w przemyśle. Ze względu na zdolność blokowania promieniowania ultrafioletowego oraz przezroczystość w zakresie światła widzialnego, nanocząstki tlenku cynku (ZnO) są powszechnie używane w produktach do pielęgnacji ciała, takich jak filtry przeciwsłoneczne oraz różnego rodzaju maści (Araki i

Baby, 2025; Osmond i McCall, 2010). Dzięki aktywności przeciwgrzybiczej i przeciwbakteryjnej wykorzystuje się je także w pigmentach i powłokach, a ponadto należą do nielicznych nanomateriałów dopuszczonych do stosowania w przemyśle spożywczym (Puspasari i in., 2022). Nanocząstki ZnO są obecnie jednymi z najbardziej rozpowszechnionych nanocząstek na rynku. Według danych z 2010 roku ich szacunkowa roczna produkcja wynosiła 550 ton, co spowodowało, że nanocząstki te były na trzecim miejscu pod względem rocznej produkcji, tuż za nanocząstkami SiO₂ oraz TiO₂ (Piccinno i in., 2012). Na dzień dzisiejszy ciężko oszacować, ile wynosi dokładna ilość produkcji tych nanocząstek choć zakłada się, że rynek wykorzystujący je rozwinął się jeszcze bardziej przez ostatnie lata, szczególnie w świetle wycofywania TiO₂ z przemysłu spożywczego. Nanocząstki ZnO powszechność zawdzięczają swoim właściwościom fizyko-chemicznym, oraz łatwości domieszkowania, które umożliwiają ich szerokie zastosowanie m.in. w optoelektronice, kosmetyce, ceramice, pigmentach, w opakowaniach i dodatkach do żywności.

Początkowo stosowanym i jednocześnie najczęściej wykorzystywanym organizmem modelowym do oceny embriotoksyczności nanocząstek ZnO był danio pręgowany (*Danio rerio*). Wczesne badania na tym modelu wykazały, że wraz ze wzrostem stężenia nanocząstki te wywołują u narażonych zarodków szereg niekorzystnych efektów. Wśród zaobserwowanych efektów odnotowano spadek przeżywalności i wylęgalskości, a także występowanie licznych malformacji oraz stresu oksydacyjnego (Bai i in., 2010; Zhu i in., 2008; Zhu i in., 2009). Obserwacje te powtarzają się także w późniejszych badaniach (Brun i in., 2014; Chen i in., 2014; Choi i in., 2016; Du i in., 2018; Du i in., 2017; George i in., 2011; Giordo i in., 2020; Girigoswami, 2015; Hua i in., 2014; Kteeba i in., 2017; Kteeba i in., 2018; Lacave i in., 2016; Verma i in., 2017; Wang i in., 2012; Wehmas i in., 2015; Zhao i in., 2016; Zhao i in., 2013; Zhou i in., 2015).

Jednym z najistotniejszych czynników wpływających na embriotoksyczność nanocząstek ZnO w modelu danio pręgowanego jest rozpuszczalność tych nanocząstek w wodzie i mediach biologicznych. Powoduje to, że trzeba rozróżniać źródło toksyczności na pochodzące bezpośrednio z samych nanocząstek oraz na te pochodzące z uwalnianych jonów Zn²⁺. W jednym ze wczesnych badań badacze (Zhu i in., 2008) stwierdzili po podaniu nanocząstek ZnO, o definiowanym przez producenta rozmiarze 20 nm, istotny

spadek przeżywalności zarodków po 96 godzinach po zapłodnieniu. Dodatkowo zostały zaobserwowane również malformacje w postaci owrzodzenia tkanek przy najwyższej stosowanej dawce 5 mg/l już po 72 godzinach po zapłodnieniu. Jednakże dla ZnO przekraczającego rozmiary nano (1000 nm) owrzodzenia tkanek w tym samym stężeniu było obserwowane po 96 godzinach od zapłodnienia. Badacze zasugerowali w tym badaniu, że efekt toksyczny nanocząstek wynikał zarówno z jonów Zn^{2+} jak i samych nanocząstek, poprzez generowanie reaktywnych form tlenu (ROS). Warto w tym miejscu nadmienić, że według normy stosowanej w Polsce do oceny jakości wód dopuszczalna ilość cynku w wodach klasy I oraz II wynosi poniżej 0,10 mg Zn/l, natomiast najwyższy dopuszczalny poziom cynku w ściekach wynosi 2 mg Zn/l (Rozporządzenie Ministra, Dz.U. 2019 poz. 1311), w związku z tym dawka, przy której stwierdzono działanie szkodliwe w powyższych badaniach znacznie przekraczała dopuszczalne limity.

W badaniu Zhao i wsp. wykazano, że pod wpływem nanocząstek tlenku cynku (ZnO) układ antyoksydacyjny zarodków ulegał silniejszym zaburzeniom niż w przypadku ekspozycji na jony Zn^{2+} . Badacze zaobserwowali wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) wraz ze wzrostem dawki nanocząstek, co istotne po podaniu najwyższej dawki (100 mg/l) aktywność SOD była niższa niż przy dawce 50 mg/l. Ponadto nanocząstki istotnie zwiększały zawartość dialdehydu malonowego (MDA), czego nie stwierdzono w przypadku samych jonów Zn^{2+} . W odniesieniu do katalazy (CAT) ekspozycja na nanocząstki powodowała spadek jej aktywności, podczas gdy jony cynku prowadziły do jej wzrostu. Istotny wzrost aktywności peroksydazy glutationowej (GPx) stwierdzono po narażeniu na nanocząstki przy stosunkowo wysokich stężeniach (powyżej 20 mg/l), bez znamiennych różnic między nanocząstkami a odpowiadającymi im dawkami Zn^{2+} . Co istotne, poziom ROS był wyższy po ekspozycji na nanocząstki niż na jony. Na poziomie transkrypcyjnym ekspresja genów związanych z wytwarzaniem i odpowiedzią na ROS oraz odpowiedzią antyoksydacyjną – *Bcl-2*, *Nqo1* i *Gstp2* – ulegała obniżeniu, natomiast poziom *Ucp-2* istotnie wzrastał. Warto podkreślić, że zastosowane w pracy dawki przewyższały stężenia obserwowane i dopuszczalne w wodach powierzchniowych (Zhao i in., 2013).

Zmiany w ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym obserwowano również w innych badaniach. Na przykład odnotowano podwyższony poziom ekspresji *mt2*, kodującego metalotioneinę-2, która pełni m.in. funkcję antyoksydacyjną (Brun i in., 2014; Ruttkay-Nedecky i in., 2013). Zmiany stwierdzono także w poziomach genów

związanych z odpowiedzią immunologiczną oraz genów prozapalnych. Między innymi zaobserwowano obniżenie ekspresji czynnika martwicy nowotworowej- α (*TNF α*) i interleukiny-1 β (*IL-1 β*) po ekspozycji na nanocząstki u zarodków chronionych przez osłonkę jajową. Dodatkowo wykazano wzrost ekspresji protoonkogenu *jun* (*c-jun*) oraz spadek ekspresji genu przeciwwirusowego i związanego z odpowiedzią immunologiczną (Myxovirus resistance A) (*MxA*) (Brun i in., 2014). We wspomnianym badaniu, badacze wykorzystali nanocząstki komercyjnie dostępne (producent: Genes'Ink), które wg. przeprowadzonych badań posiadały rozmiar 9,4 nm, przy założeniu kształtu sferycznego. Jednocześnie, w porównaniu do wcześniejszych badań zastosowane dawki były bardziej zbliżone do dopuszczalnych dla stężenia cynku w środowisku wodnym (0,2 mg/l, 1 mg/l oraz 5 mg/l).

W badaniu przeprowadzonym przez Zhao i wsp. zespół wykazał również w modelu zarodka *Danio rerio* zmiany w ekspresji genów związanych z apoptozą oraz białek związanych z tym procesem. Odnotowali oni wzrost ekspresji dla białka p53, obniżenie potencjału błony mitochondrialnej, uwolnienie cytochromu c do frakcji cytozolowej oraz aktywację kaspazy 3 i kaspazy 9. Dodatkowo zaobserwowali również spadek ekspresji genu *bcl2* oraz wzrost ekspresji dla genu *bax*. Stosowane dawki w tym doświadczeniu to: 10, 30, 60, 90, and 120 mg/l (Zhao i in., 2016).

Inne badanie z tego samego roku, przeprowadzone przez Choi i wsp. (dawki: 0,01; 0,1; 1 i 10 mg/l, kształt owalny, rozmiar: ~20 nm, producent: Sigma-Aldrich), wykazało, że dla zastosowanych nanocząstek śmiertelne stężenie 25% (LC25) wynosiło dla nanocząstek ZnO 2,64 mg/l natomiast dla jonów Zn²⁺ było ono na poziomie 7,25 mg/l. Po przetestowaniu tych dawek i ich wpływu na zmiany na poziomie genomowym, badacze zaobserwowali mniej zmian w transkrypcji genów po podaniu nanocząstek ZnO, niż po podaniu porównywalnie toksycznej dawki jonów Zn²⁺ w postaci Zn₂SO₄. W przypadku tego badania obecność malformacji była odnotowana w przypadku dawki 1 mg/l zarówno dla nanocząstek, jak i Zn₂SO₄. Autorzy przy analizie wybranych genów wykazali również istotną statystycznie nadekspresję takich genów jak *ogfrl2* (hamuje syntezę DNA) oraz *cyb5d1* (udział w detoksyfikacji) dopiero przy dawce 10 mg/l (Choi i in., 2016).

Kolejny przykład badania w którym badano wpływ nanocząstek ZnO na stres oksydacyjny oraz apoptozę jest doświadczenie Du i wsp. (dawki: 12,5; 25; 50 mg/l; kształt: nieznany, rozmiar: < 100 nm, producent: na podstawie CAS, Sigma-Aldrich), w którym wykazano zwiększenie aktywności SOD i GPx oraz wzrost poziomu MDA, a także spadek aktywności CAT i obniżenie ekspresji genów kodujących *CAT* w grupie traktowanej

nanocząstkami ZnO w stężeniu 25 mg/l. W grupie traktowanej nanocząstkami ZnO w stężeniu 50 mg/l stwierdzono obniżenie ekspresji *GPx1a* i *SOD1*, zwiększenie ekspresji genów *p53*, *bax* i kaspazy-3 oraz obniżenie ekspresji *bcl2* (Du i in., 2017).

Innym aspektem embriotoksyczności nanocząstek ZnO, który był dotychczas rozpatrywany na modelu *Danio rerio* jest wpływ ich kształtu. W badaniu Hua i wsp. zastosowano nanocząstki ZnO (producent: IoLiTec) w formie nanosfer (~43 nm), nanoprętów (150 nm) oraz nanocząstki submikronowe (~900 nm), w dawkach 2, 4, 8, 16 oraz 32 mg ZnO NPs/l. Co ciekawe, wykazano, że efekt letalny szybciej obserwowano w przypadku nanoprętów ZnO (8,4 mg/l) oraz jonów Zn^{2+} (7,9 mg/l) niż w odniesieniu do sferycznych i submikronowych nanocząstek, jednak badanie to jednocześnie wskazuje, że to narażenie na nanocząstki było głównym czynnikiem śmiertelności. Uwalnianie jonów z nanocząstek było bowiem dość niewielkie, a zatem nie stanowiło istotnego źródła embriotoksyczności. W tym badaniu, przy najwyższej dawce 32 mg/l, nie odnotowano ciężkich malformacji w żadnej grupie. Najczulszym elementem modelu była natomiast wylęgalskość, na którą najsilniej wpływały nanopręty i nanosfery ZnO (Hua i in., 2014). W przeciwieństwie do tych badań, inny zespół potwierdził, że zarówno nanocząstki (producent: Sigma-Aldrich, rozmiar: 50 – 70 nm, dawki: 0,1; 0,5; 1, 5 oraz 10 mg/l), jak i uwalniane z nich jony wywierają niekorzystny wpływ na wylęgowskość w modelu danio pręgowanego. Co istotne, w grupach narażonych na stężenia 5–10 mg/l odnotowano zwiększoną aktywność larw oraz wyższą średnią prędkość pływania, co może wskazywać na potencjalną neurotoksyczność ZnO objawiająca się m.in. zmianami behawioralnymi w przypadku oddziaływania kumulatywnego (Chen i in., 2014).

Badanie porównujące ostrą toksyczność kilku metalicznych nanocząstek (TiO_2 , CeO_2 , ZnO, SnO_2) wykazało, że nanocząstki ZnO (produkcja własna metodą wymuszonej hydrolizy, rozmiar: 8,35 nm, dawki: 0,08; 0,4; 2; 10 oraz 50 mg/l) były jedynymi nanocząstkami wykazującymi ostrą toksyczność wobec zarodków danio pręgowanego. Autorzy tego badania podkreślili również znaczenie stosowania odpowiednich warunków, uwzględniających m.in. skład jonowy medium. Zwrócili uwagę, że gdyby nie użyli ultra czystej wody jako medium, mogłoby to prowadzić do błędnego wniosku, że stosowane przez nich nanocząstki (o rozmiarze 2,8–11,6) nie są toksyczne dla zarodków (Wehmas i in., 2015). Informacja ta jest szczególnie istotna w kontekście możliwości porównywania wniosków z różnych badań, z różnych modeli. W przypadku modeli rybich wpływ wody

może mieć znacznie większe znaczenie niż w przypadku modeli ptasich czy ssaczych, gdzie medium jest zazwyczaj wystandaryzowane pod względem składu, np. PBS. W tym badaniu zaobserwowano, że nanocząstki ZnO wywoływały u zarodków takie malformacje jak obrzęk woreczka żółtkowego, obrzęk osierdza, nieprawidłowe wygięcie osi ciała oraz wady oka, pyska, żuchwy, pęcherzyka usznego, mózgu. Jednocześnie zjawiska te nie występowały w przypadku cząstek ZnO o rozmiarach powyżej mikrometra. Podobne obserwacje dotyczące różnic w embriotoksyczności nanocząstek ZnO (producent: Sigma-Aldrich, rozmiar: < 50 nm, kształt: obły, dawki: 0,1; 0,25; 0,5; 1; 5 oraz 10 mg/l) w zależności od użytego rozpuszczalnika odnotowano w badaniu z wykorzystaniem zarodków *Oryzias javanicus* w wodzie ultraczystej, dejonizowanej i kranowej (skład niepotwierdzony). Stwierdzono, że wartość LC50 była różna w zależności od rodzaju wody: ultraczysta — 0,6438 mg/l, dejonizowana — 1,333 mg/l, woda kranowa — 2,251 mg/l (Amin i in., 2021).

W innym badaniu zarodki danio przegowanego wystawiono na działanie nanocząstek ZnO (producent: US Research Nanomaterials, rozmiar: 10–30 nm, brak informacji o kształcie) w stężeniach 1, 5, 10, 20, 50 i 100 mg/l przez 96 h po zapłodnieniu. W przeciwieństwie do wcześniej wspomnianych prac, badanie to wykazało, że nanocząstki ZnO są toksyczne dla rozwijającego się układu nerwowego i naczyniowego już w dawce 1 mg/l w tym modelu. Jednakże, po porównaniu zmian w obu wspomnianych układach, na skutek narażenia na działanie jonów Zn^{2+} oraz nanocząstek ZnO, okazało się, że poziom zmian dla stężenia 0,5 mg/l jonów Zn^{2+} był porównywalny z narażeniem na dawkę 10 mg/l nanocząstek użytych w tym doświadczeniu (Kteeba i in., 2018). Co interesujące, nieprawidłowe fenotypy aksonów motoneuronów drugorzędowych obserwowano także u pokoleń F1 i F2, co wskazuje na długoterminową toksyczność nanocząstek ZnO. Wyniki pod względem toksycznej dawki nanocząstek ZnO odstają od zaobserwowane we wcześniejszych badaniach zespołu Bai i wsp. (2010) (producent: Hangzhou Wanjing New Material Co., rozmiar: $36,7 \pm 11,6$ nm, kształt: sferyczny, dawki: 1, 5, 10, 25, 50 i 100 mg/l). W badaniu tym istotny wzrost śmiertelności był obserwowany już od dawki 5 mg/l a od dawki 10 mg/l przeżywalność zarodków spadała poniżej 50 %, w następnych dawkach natomiast spadała do 0%.

Kolejnym czynnikiem wpływającym na toksyczność są właściwości chemiczne powierzchni nanocząstek. W badaniu Zhou i wsp. (2015) przeprowadzonym na *Danio rerio*

autorzy wykazali, że toksyczność nanocząstek o niemodyfikowanej powierzchni występowała częściej. Jednocześnie w ich pracy, niemodyfikowane nanocząstki NanoGard ZnO (producent: Alfa Aesar, rozmiar: 70 nm, dawki: 0,016; 0,08; 0,4; 2, 10, 50, 250 mg/l) wykazały najwyższą śmiertelność spośród wszystkich testowanych nanocząstek po 120 h od zapłodnienia przy dawce 50 mg/l, co skutkowało 100% śmiertelnością. W tym badaniu zaobserwowano istotny wpływ modyfikacji chemicznych powierzchni; jednocześnie badacze wskazali, że właściwości chemiczne zewnętrznej powierzchni nanocząstek są ważniejsze niż skład macierzy nanocząstki.

W innym badaniu, w którym jako model badawczy wykorzystano zarodki ryby *Mugilogobius chulae*, w pracy Li i wsp. (2018) wykorzystali komercyjne nanocząstki ZnO (producent: Shanghai Macklin Biochemical Technology Co., kształtu i rozmiar nieznany). Badacze zaobserwowali od 5 dnia wysoką śmiertelność przy dawkach 25 i 50 mg/l (LC50 = 45,4 mg/l). W każdej grupie badanej stwierdzono liczne wady rozwojowe: skrzywienie kręgosłupa, brak ogona, wygięcie ciała ku górze, ciało w kształcie litery S, obrzęk osierdza, obrzęk jamy brzusznej, obrzęk ogona, brak melaniny w oku, brak somitów; ponadto zmiany histopatologiczne powiększenie komórek wątroby i jelita, liczne enterocyty i hepatocyty wykazujące zwyrodnienie wakuolarne, zatarcie granic komórkowych, a także nieprawidłowy rozwój kostny: ogon i kręgi w odcinku tułowiowym były powiększone, zanikowe, nieregularne lub w inny sposób nieprawidłowe (Li i in., 2018).

Warto zwrócić uwagę na wpływ modelu badawczego na różnice w wartościach LC50 nanocząstek ZnO, a tym samym na trudność porównywania wyników między badaniami. Dla *M. chulae* LC50 wynosi 45,4 mg/l (Zhou i in., 2015). Natomiast dla *Oryzias javanicus* mieści się w zakresie 0,6438–2,251 mg/l w zależności od użytej wody (Amin i in., 2021). Dla *D. rerio* jest to 1,793 mg/l (Zhu i in., 2008), 3,5–9,1 mg/l (Wehmas i in., 2015) lub inne wartości, zależnie od badania (wpływ wody) i zastosowanych nanocząstek (rozmiar, kształt).

Nieliczne badania nad embriotoksycznością nanocząstek ZnO prowadzono także na płazach. W jednym z badań, w którym zastosowano dawki 10, 100 i 500 mg/l nanocząstek ZnO (o rozmiarach <50 nm i <100 nm), stwierdzono takie wady rozwojowe jak

nieprawidłowe zwijanie jelit, obrzęk jamy brzusznej, malformacje twarzoczaszki oraz zmiany w obrębie jelita cienkiego i grubego u *Xenopus laevis* (Bacchetta i in., 2012). Inne badanie na tym samym modelu, z użyciem dwóch nanocząstek o dawkach 100 mg NPs/l i rozmiarach <50 nm oraz <100 nm, wykazało zwiększoną aktywność markerów stresu oksydacyjnego oraz zaburzenie strukturalnej i funkcjonalnej integralności połączeń międzykomórkowych (Bacchetta i in., 2014). Podobne obserwacje odnotowano w innych pracach (Bonfanti i in., 2015; Mantecca i in., 2015). Dodatkowo, w badaniu Mantecci i współpracowników, w którym użyto nanocząstek ZnO o rozmiarze 2 nm, stwierdzono bioakumulację w tkankach zarodkowych (Mantecca i in., 2015). Natomiast w badaniu przeprowadzonym na *Taricha granulosa* zespół Spence i wsp. zaobserwował po podaniu nanocząstek ZnO wzrost śmiertelności jaj, skrócenie czasu do wylęgu, obniżony rozwój w momencie wylęgu w porównaniu do kontroli (Spence i in., 2016).

Dotychczas w literaturze naukowej nie ma wielu badań dotyczących embriotoksyczności nanocząstek ZnO w modelu ptasim. Yan i in. (2020) badali wpływ nanocząstek ZnO na komórki grzebienia nerwowego czaszkowego (cranial neural crest cells, CNCCs) podczas embriogenezy zarodka kurzego. W ich badaniu 100 µl nanocząstek ZnO (rozmiar: < 50 nm, producent: Sigma-Aldrich) o stężeniu 50 µg/ml podawano do komory powietrznej zarodków kurzych od 0 do 9 lub 12 dnia inkubacji. Zarodki narażone na nanocząstki przez 9 i 12 dni wykazywały różny stopień deformacji twarzoczaszki. Potwierdzili, że zarówno nanocząstki ZnO, jak i uwalniane jony Zn^{2+} generują ROS, które przyczyniają się do cytotoksyczności, stanów zapalnych oraz apoptozy. Procesy te prowadzą do zahamowania produkcji i migracji CNCCs, co skutkuje malformacjami twarzoczaszki. U zarodków do stadium 10 w skali Hamburgera-Hamiltona (10 HH, 33–38 h po zapłodnieniu) badacze zaobserwowali wzrost śmiertelności oraz skrócenie długości ciała u zarodków narażonych na działanie nanocząstek ZnO (Yan i in., 2020).

W innym badaniu Hao i wsp. (Hao i in., 2017) zastosowali nanocząstki ZnO (rozmiar: 30 nm, producent: Beijing DK Nano Technology Co.) jako dodatek paszowy dla kur, w dawce 200 mg/kg paszy, która była podawana przez 24 tygodnie. Warto nadmienić, że poziom cynku w paszy użyty w tym doświadczeniu znacznie przekracza limity dopuszczalne w UE (120 mg/kg) (European Commission, 2016). Następnie kury zostały sztucznie zapłodnione, a wątroby kurcząt pokolenia F1 pobierano w 18 dniu rozwoju zarodkowego oraz w 3, 5, 10 i 20 dniu po wykluciu. Oceniano poziomy ekspresji genów

związanych z syntezą lipidów, wzrostem, apoptozą i uszkodzeniami komórek. Wykazano, że u kurcząt z pokolenia F1 z grupy kontrolnej (pasza bez dodatku nanocząstek) odnotowano obniżoną ekspresję genów związanych z syntezą lipidów i wzrostem wątroby. Mimo to był obserwowany wzrost poziomu markerów apoptozy i uszkodzenia komórek oraz wyższa ekspresja genów związanych ze stresem mitochondrialnym i stresem oksydacyjnym. Uzyskane wyniki sugerują, że nanocząstki ZnO mogą wykazywać efekt embriotoksyczny, jednak badacze nie określili faktycznej ilości nanocząstek, które bezpośrednio oddziaływały na zarodki (Hao i in., 2017). Podobne wyniki uzyskali Liu i wsp. (2017), stwierdzili ponadto zmianę w poziomie białek γ -H2AX i NF- κ B, wskazującą na obniżoną proliferację, zwiększoną apoptozę oraz zahamowanie rozwoju zarodka w wyniku ekspozycji matek na nanocząstki ZnO (rozmiar: 30 nm, producent: Beijing DK Nano Technology Co.). Jednocześnie nie jest możliwe określenie, na jaką ilość nanocząstek były faktycznie narażone zarodki (Liu i in., 2017).

W badaniu przeprowadzonym przez Jo i wsp. (2013) zastosowano nanocząstki ZnO o rozmiarze poniżej 100 nm (producent: Sigma-Aldrich) w dawce 500 mg/kg masy ciała na dzień. Nanocząstki były podawane szczurom przez 2 tygodnie przed kojarzeniem aż do 4 dnia po urodzeniu potomstwa. Nie zaobserwowano wpływu nanocząstek ZnO na płodność samców ani samic. Nie odnotowano również nieprawidłowości rozwojowych u potomstwa. Liczba nowo narodzonych osobników w grupie badanej była jednak istotnie niższa w porównaniu do kontroli. Jednocześnie u potomstwa stwierdzono podwyższony poziom cynku w narządach, zwłaszcza wątrobie, żołądku i w istotnym stopniu w nerkach. Nie stwierdzono jednak zmian histopatologicznych. W tym badaniu trudno jest jednoznacznie określić rolę i bezpośredni wpływ na rozwój zarodkowy, gdyż mamy do czynienia zarówno z wpływem na reprodukcję, embriotoksycznością i ekspozycją na nanocząstki między matką a zarodkiem a potem potomstwem (Jo i in., 2013).

W badaniu przeprowadzonym przez Hong i wsp. zastosowano nanocząstki ZnO o rozmiarze 20 nm (producent: Sumitomo-Osaka Cement Co.), które podawano ciężarnym samicom szczurzym w dawkach 100, 200 oraz 400 mg/kg masy ciała/dzień od 5 do 19 dnia ciąży. Wyniki wskazały, że podawane nanocząstki nie wywoływały szkodliwego działania na płody. Jednakże przy dawkach 300 i 400 mg/kg/dzień obserwowano niekorzystne efekty u samic (Hong i in., 2014).

W innym badaniu, również przeprowadzonym na ciężarnych szczurach, oceniano wpływ nanocząstek ZnO (o rozmiarze < 35 nm, producent: Sigma-Aldrich) na płody po dożylnym podaniu. Zastosowano dawki: 5, 10 oraz 20 mg/kg. Przy zastosowaniu nawet niższych dawek odnotowano obniżenie masy ciała płodów, zniekształcenie grasicy i poszerzenie moczowodów. A po zastosowaniu wyższej dawki nanocząstek także obumieranie płodów. Co istotne, autorzy wskazali, że nie mają pewności czy obumieranie płodów i było wynikiem zmian fizjologicznych u samic, czy też bezpośrednim skutkiem działania nanocząstek na płody (Lee i in., 2016).

W jednym z badań przeprowadzonych na myszach nanocząstki ZnO (o rozmiarze < 100 nm, producent: Sigma-Aldrich) podawano samicom w dawkach 50, 100 oraz 300 mg/kg masy ciała przez 2 dni w okresie 15–19 dni ciąży, stosując zgłębnik dożołądkowy. Przy dawce 300 mg/kg zaobserwowano przedwczesne zakończenie ciąży. W przypadku dawki 100 mg/kg obserwowano wpływ nanocząstek na marker wątrobowy ALT u męskiego potomstwa, którego poziom był podwyższony. Ponadto, po ekspozycji w trakcie ciąży na dawki 50 lub 100 mg/kg było widoczne liczne zmiany histopatologiczne u potomstwa, takie jak nasilona wakuolizacja nabłonka, zmniejszenie średnicy kanalików nasiennych oraz obniżona adhezja komórkowa nabłonka. Zaobserwowano także zmiany w poziomach genów związanych ze steroidogenezą. Przy dawce 100 mg/kg stwierdzono istotnie wyższy poziom ekspresji StAR. W przypadku genu P450scc podwyższony poziom odnotowano przy dawce 50 mg/kg, podczas gdy przy dawce 100 mg/kg wartości były niższe (Bara i in., 2018).

W innym badaniu nanocząstki ZnO (o rozmiarach 13 i 57 nm) podawano ciężarnym myszom między 7-16 dniem (w okresie organogenezy) lub między 1–10 dniem ciąży (w okresie około implantacyjnym) w dawce 7,2 mg/mysz/dzień. Po podawaniu nanocząstek o rozmiarze 13 nm w okresie organogenezy, zaobserwowano spadek masy, żywotności, długości ogona płodów. Jednocześnie odnotowano wyższe stężenia Zn w surowicy ciężarnych samic i płodów oraz zmiany w ekspresji markerów związanych z funkcjonowaniem łożyska (VEGF, PlGF, sFlt-1). Wyniki te sugerują, że istnieje zależność embriotoksyczności od wielkości nanocząstek ZnO i okresu narażenia (Teng i in., 2019).

W kolejnym badaniu, w którym nanocząstki ZnO (30 ± 10 nm, producent: brak informacji) podawano ciężarnym myszom w okresie od 10,5 do 17,5 dnia ciąży, badano

dawki 20, 60, 180 oraz 540 mg ZnO/kg masy ciała. Wykazano, że dawki powyżej 180 mg/kg prowadziły do zanik gruczołów macicznych oraz zaburzenia struktury gruczołowej u matek, zahamowania wzrostu płodów oraz zmniejszenia ich liczby (Chen i in., 2021).

W niektórych z cytowanych badań, w których zastosowano komercyjnie produkowane nanocząstki, informacje dotyczące ich rozmiaru pochodziły z danych podanych przez producenta. Jednakże nie we wszystkich przypadkach dokonano ich rzeczywistego pomiaru. Należy zatem zaznaczyć, że – jak wykazano już we wczesnych badaniach – rzeczywisty rozmiar nanocząstek może różnić się od deklarowanego (Zhu i in., 2008). Cytowane wyniki dotyczące embriotoksyczności ZnO wskazują, że rozmiar nanocząstek ma istotny wpływ na toksyczność. Przyczynia się to do właściwej interpretacji uzyskanych rezultatów, a jednocześnie uwydatnia problem porównywania wyników różnych badań nad embriotoksycznością.

1.4. Nanocząstki tlenku cyrkonu (ZrO_2)

Nanocząstki tlenku cyrkonu (ZrO_2) to materiał o wysokiej twardości i stabilności chemicznej oraz szerokiej przerwie energetycznej, nierozpuszczalny w wodzie. Metodami często wykorzystywanymi do ich produkcji są m.in. metoda zol-gel, metoda solwotermalna (Dwivedi i in., 2011), chemiczne osadzanie z fazy gazowej (ang. chemical vapour deposition, CVD) (Nubian i in., 2000) oraz synteza w warunkach hydrotermalnych (Liu i in., 2022). Metody te umożliwiają uzyskanie cząstek o rozmiarach od kilku do kilkudziesięciu nanometrów oraz o różnych morfologiach (Mosavari i in., 2023). Dodatkowo dzięki dużej wytrzymałości mechanicznej, nanocząstki ZrO_2 znalazły zastosowanie w wytrzymałych ceramicznych komponentach dentystycznych,

Dane na temat embriotoksyczności nanocząstek opartych o ZrO_2 są mocno ograniczone. W badaniu przeprowadzonym przez Karthiga i in. (2018), badacze wykorzystali nanocząstki ZrO_2 własnej produkcji, uzyskane poprzez odparowanie prekursorów w łaźni wodnej a następnie, uzyskany żel, przefiltrowali próżniowo w celu uzyskania proszku. Uzyskane nanocząstki charakteryzowały się rozmiarem 15-20 nm oraz kształtem sferycznym. Zarodki *Danio rerio* w tym badaniu były narażone na działanie nanocząstek w czasie od 24 do 96 h po zapłodnieniu, natomiast dawki, które zostały sprawdzone w tym badaniu to 0,5; 1; 2; 3, 4 i 5 $\mu\text{g/ml}$. Wzrost zamierania zarodków był

widoczny już dla najniższej dawki, natomiast już od dawki 1 $\mu\text{g/ml}$ obserwowano powstawanie dużych ilości malformacji, które często prowadziły do śmierci. Kolejne badanie, gdzie inny zespół na tym samym modelu sprawdził trzy rodzaje nanocząstek z rdzeniem z tlenku krzemu oraz powłoką z tlenku cyrkonu, w wielkości 51 - 68 nm, ale powstałych z różnych prekursorów. Wykazali oni, że nanocząstki te w dawkach 5, 10 oraz 20 $\mu\text{g/ml}$ nie powodowały zmian w masie ciała danio pręgowanego oraz stwierdzili przeżywalność na poziomie 100% dla wszystkich grup badanych (Sajtos i in., 2021).

Ostatnie badanie, które porusza kwestię embriotoksyczności nanocząstek ZrO_2 zostało przeprowadzone na szczurach przez zespół Lyashenko i in., (2023). Wykorzystali oni nanocząstki własnej produkcji. W tym przypadku jedynie znana jest średnica hydrodynamiczna nanocząstek wynosząca 138 ± 24 nm, nie wiadomo nic na temat ich kształtu ani faktycznych rozmiarów fizycznych. Samice szczurów otrzymywały alimentarnie, od pierwszego dnia ciąży do dnia 20, codziennie nanocząstki w dawce 100 mg/kg masy ciała/dzień. W tym badaniu nie zaobserwowano wpływu nanocząstek ZrO_2 na powstawanie malformacji w płodach, jednocześnie nie zauważono również wpływu na śmiertelność po urodzeniu. Jednakże, 14 dni po urodzeniu była widoczna w potomstwie niższa masa ciała w porównaniu do kontroli. Natomiast po dwóch miesiącach po urodzeniu były obserwowane zaburzenia metabolizmu wątroby. Nasuwa to pytanie o potencjalne długoterminowe skutki narażenia na nanocząstki w czasie ciąży i wskazuje jednocześnie na brak danych dających podstawy do stwierdzenia bezpieczeństwa stosowania tych nanocząstek.

1.5. Nanocząstki tlenku itru (Y_2O_3)

Tlenek itru (Y_2O_3) budzi zainteresowanie ze względu m.in. na właściwości fizyczne takie jak wysoka przenikalność elektryczna, wysoka wytrzymałość mechaniczna oraz wysoka temperatura topnienia, dodatkowo materiał ten wykazuje dobrą stabilność chemiczną (Aghazadeh i in., 2013). Tlenek itru charakteryzuje się też dużą przerwą energetyczną, wysoką stałą dielektryczną oraz posiada wysoki współczynnik załamania światła co umożliwia wykorzystanie go jako materiał optyczny (Khajelakzay i in., 2016). Jednocześnie, istotny jest fakt, że nanocząstki te są nierozpuszczalne (Chiechio i in., 2023). Z punktu widzenia zastosowania biologicznego nanocząstki Y_2O_3 wykazują działanie

antybakteryjne. Autorzy pierwszego badania z zastosowaniem ekstraktu roślinnego (*Acalypha indica*) do syntezy nanocząstek Y_2O_3 zaobserwowali działanie antybakteryjne przeciw *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* oraz *Staphylococcus aureus*, jednakże mechanizm działania antybakteryjnego użytych nanocząstek nie jest dobrze poznany, proponowana przez autorów przyczyna to inaktywacja enzymów w komórkach bakteryjnych, a następnie ich śmierć na skutek akumulacji ROS (Kannan i Sundrarajan, 2015). Również inne zespoły badawcze zaobserwowały podobne wyniki przy zastosowaniu innych ekstraktów roślinnych (*Lantana camara*), jednocześnie otrzymane za pomocą zielonej syntezy wykazywały silniejsze działanie antybakteryjne, niż antybiotyki i nanocząstki Y_2O_3 do których syntezy nie stosowano ekstraktów roślinnych (Govindasamy i in., 2022). W tym samym badaniu wykazano również działanie antynowotworowe nanocząstek Y_2O_3 .

Inne badanie wykazało, że nanocząstkami Y_2O_3 posiadają właściwości hepatoprotekcyjne w mysim modelu ostrej niewydolności wątroby, po zastosowaniu dawki 250 mg/kg. Powodowały one m.in. niższy poziom MDA, podwyższały aktywność peroksydazy glutationowej, chroniły przed spadkiem aktywności SOD oraz zmniejszały aktywację szlaku NF- κ B. Jednocześnie w obrazie histologicznym powodowały one zmniejszenie uszkodzeń wątroby (Song i in., 2019).

Prócz badań nad działaniem terapeutycznym nanocząstek są podejmowane próby wykorzystania ich jako nośników leków oraz do obrazowania, gdy nanocząstki te są domieszkowane i dzięki temu wykazują luminescencje (Kaszewski i in., 2016). W temacie embriotoksyczności tych nanocząstek nie ma żadnych danych.

2. Cel badań, hipotezy badawcze, zadania badawcze

W przypadku nanocząstek ZnO, które są uznawane za bezpieczne ze względu na biodegradowalność i wcześniejsze eksperymenty na dorosłych ssakach, mamy doczynienia z licznymi badaniami, które często zostały wykonane na różnych modelach badawczych, z różnymi dawkami nanocząstek (nagminnie przekraczającymi dopuszczalne normy) oraz bazujące o wykorzystanie nanocząstek o różnych właściwościach fizyko-chemicznych (w tym również słabo lub w ogóle nie scharakteryzowanych, jak ma to miejsce przy wielu nanocząstkach komercyjnie dostępnych). Natomiast w przypadku nanocząstek niebiodegradowalnych, takich jak nanocząstki ZrO_2 oraz Y_2O_3 , praktycznie nie ma danych na temat ich embriotoksyczności. Z tego powodu, niemożliwe jest porównanie ze sobą

dostępnych danych literaturowych o różnicach we wpływie na rozwój zarodkowy między nanocząstkami biodegradowalnymi i niebiodegradowalnymi oraz o wpływie kształtu i matrycy. Powoduje to, że niemożliwe jest określenie bezpieczeństwa ich stosowania.

Celem niniejszej pracy jest porównanie potencjalnej embriotoksyczności nanocząstek na modelu zarodka kurzego, różniących się między sobą dwoma modalnościami: biodegradowalności oraz kształtu.

Hipotezy:

1. Nanocząstki tlenków metali (ZnO , ZrO_2 i Y_2O_3) przenikają do tkanek zarodka kurzego, a ich dystrybucja zależy od kształtu i dawki.
2. Nanocząstki tlenków metali o różnym kształcie (owalne vs. podłużne) nie wpływają na rozwój zarodka i nie indukują niekorzystnych zmian w jego tkankach.

Zadania badawcze:

1. Charakterystyka fizyczna nanocząstek – określenie morfologii, potencjału zeta oraz fluorescencji nanocząstek.
2. Potwierdzenie obecności nanocząstek tlenków metali (ZnO , ZrO_2 i Y_2O_3) w tkankach zarodka po ich podaniu do komory powietrznej jaja i określenie ich dystrybucji.
3. Określenie zmian markerów stresu oksydacyjnego po podaniu nanocząstek tlenków metali (aktywność SOD, poziom MDA i białek karbonylowanych) w rozwijających się zarodkach.
4. Określenie zmian na poziomie genomu po podaniu nanocząstek ZnO różniących się kształtem.
5. Sprawdzenie potencjalnych zmian histologicznych / histopatologicznych w tkankach rozwijających się zarodków kurzych po narażeniu na działanie nanocząstek tlenków metali.
6. Ocena zmian w profilu cytokin i chemokin w tkankach zarodka, dla wybranych dni po podaniu nanocząstek tlenków metali.

7. Ocena zmian w dystrybucji białek Bax, Bcl2 oraz aktywnej kaspazy-3 (CPP32) po narażeniu na działanie nanocząstek tlenków metali.

3. Materiały i metody

3.1. Synteza i charakterystyka nanocząstek

Nanocząstki zsyntetyzowano z wykorzystaniem metody hydrotermalnej – mikrofalowej w Instytucie Fizyki Polskiej Akademii Nauk w Warszawie (Rosowska i in., 2025). Rozmiar i morfologie powierzchni nanocząstek określono za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej (ang. scanning electron microscopy, SEM). Stabilność elektrostatyczną oraz stopień rozproszenia nanocząstek w zawiesinie scharakteryzowano na podstawie pomiarów potencjału zeta i średnicy hydrodynamicznej. Oznaczenia SEM prowadzono w systemie Hitachi SU-70, wyposażonym w detektor Energy Dispersive X-ray (EDX) do analizy składu pierwiastkowego. Uzyskane wyniki potwierdzono w systemie dyfrakcji rentgenowskiej Panalytical X'Pert Powder Diffractometer (Westborough, MA, USA, $\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$). Oznaczenia potencjału zeta i średnicy hydrodynamicznej prowadzono w temperaturze pokojowej ($\sim 25^\circ\text{C}$) przy użyciu aparatu Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, UK) z wykorzystaniem technik dynamicznego i elektroforetycznego rozpraszania światła (DLS, ELS). Przed pomiarem nanocząstki zawieszano w wodzie dejonizowanej, a następnie poddawano 4-minutowej sonifikacji w systemie Sonic VCCX500 (Sonic & Materials Inc., USA), aby ograniczyć ich agregację. pH nie było modyfikowane. Każdą próbkę zmierzono pięciokrotnie, a wyniki przedstawiono jako średnie wraz z odchyleniami standardowymi.

Nanocząstki, które zostały wykorzystane w niniejszej pracy to dwa rodzaje biodegradowalnych nanocząstek ZnO, różniących się kształtem (obłe – ZnO OVAL oraz podłużne – ZnO LONG) oraz niebiodegradowalne nanocząstki ZrO_2 i Y_2O_3 .

3.2. Izolacja fibroblastów zarodków kurzych (CEFs)

Pierwotne fibroblasty zarodków kurzych (CEFs) zostały wyizolowane z 12-dniowych zarodków kurzych zgodnie z protokołem opisanym przez Hernandeza i Browna

(2010). Zarodki zostały aseptycznie usunięte i usunięto z nich tkanki niezawierające fibroblastów. Pozostałą tkankę rozdrobiono, przepłukano roztworem PBS (sól fizjologiczna buforowana fosforanem) zawierającego wapń i magnez, a następnie strawiono przy użyciu 0,25 % trypsyny-EDTA (Gibco Life Technologies) w temperaturze 37°C przez 15-20 min. Uzyskaną zawiesinę komórek przesączono, odwirowano przy 12000×g przez 5 min, a następnie zawieszono w pożywce Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) z GlutaMAX™, uzupełnionej o 10% płodową surowicę bydlęcą (FBS) oraz 1 % penicylinę/streptomycynę (Gibco Life Technologies). Komórki policzono i wysiano w gęstości 1×10^6 komórek na kolbę hodowlaną o powierzchni 25 cm², a następnie hodowano w inkubatorze w wilgotności min. 90%, w temperaturze 37°C, w atmosferze z 5 % CO₂.

3.3. Test żywotności komórek

CEFs wysiewano w gęstości 1×10^6 komórek na studzienkę na płytkach hodowlanych 24-dołkowych i inkubowano w warunkach standardowych (jako opisano powyżej) do osiągnięcia 80–90 % konfluencji. Komórki traktowano malejącymi stężeniami nanocząstek (od 1 do 0,001 mg/ml) przez 24 h. Żywotność CEFs oceniano barwieniem błękitem trypanu. Po zakończeniu inkubacji komórki odklejono od podłoża poprzez trawienie 0,2 % trypsyną-EDTA, zawieszano w 1 ml PBS i mieszano z błękitem trypanu. Żywotność komórek określano przy użyciu automatycznego licznika komórek (Olympus Cell Counter, model R1), a wyniki przedstawiano jako procent żywych komórek. Wszystkie doświadczenia przeprowadzano w czterech powtórzeniach.

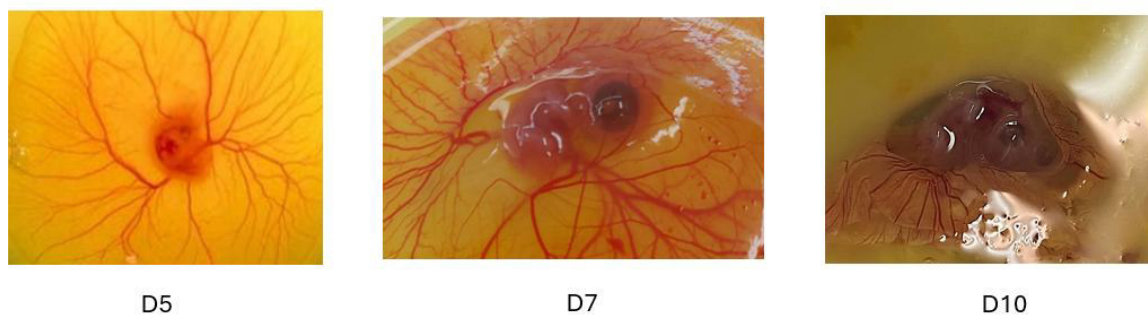
3.4. Model badawczy zarodków kurzych *in-ovo*

Materiał badawczy stanowiły zarodki kurze linii Ross 308. W przeprowadzonych badaniach stosowano zawiesiny nanocząstek w dwóch stężeniach: 10 µg/ml i 100 µg/ml w PBS. Zawiesiny (100 µl) były podawane przez otwory wywiercone w skorupie do komory powietrznej, zlokalizowanej wcześniej za pomocą owoskopu. Po aplikacji zawiesiny, otwory w skorupie uszczelniano za pomocą parafilmu. Grupa kontrolna otrzymywała 100 µl PBS. Inkubację prowadzono, od 3 do 7 dnia dla pomiaru metodą płomieniowej

spektrometrii absorpcji atomowej (AAS) lub od 4 do 10 dnia dla pozostałych oznaczeń, w temperaturze 39°C i wilgotności 70 %, w komercyjnych inkubatorach do jaj z ustawioną rotacją jaj co godzinę (Ryc. 2).



Ryc. 2. Schemat przedstawiający lokalizację komory powietrznej, podanie 100 µl zawiesiny NP lub PBS (dla grupy kontrolnej, CTRL) do komory powietrznej przed rozpoczęciem inkubacji jaj. Jaja przeznaczone do analizy metodą AAS inkubowano od 3 do 7 dnia, natomiast jaja, z których zarodki były izolowane do oznaczeń aktywności SOD, zawartości MDA oraz karbonylacji białek inkubowano od 4. do 10. dnia. Rycina została przygotowana przy użyciu aplikacji Biorender.



Ryc. 3. Zestawienie zdjęć poglądowych rozwoju zarodka z 5, 7 oraz 10 dnia inkubacji.

W celu pokazania wyglądu oraz szybkiego wzrostu zarodków wykonane zostały zdjęcia poglądowe zarodków kontrolnych z 5, 7 i 10 dnia inkubacji (Ryc. 3).

3.5. Oznaczanie stężenia Zn metodą płomieniowej spektrometrii absorpcji atomowej (AAS)

Zarodki kurze oraz próbki białka jaja, izolowano w 3, 4, 5, 6 i 7 dniu inkubacji po podaniu *in-ovo* nanocząstek ZnO LONG lub ZnO OVAL (10 i 100 µg/ml) bądź PBS (CTRL), pobrane próbki były ważone i przenoszone do naczyń teflonowych. Każdą próbkę traktowano 2 ml 65 % kwasu azotowego oraz 1 ml 30% nadtlenku wodoru (H₂O₂) i inkubowano przez 18 h w temperaturze pokojowej. Następnie przeprowadzano ich mineralizację przy użyciu systemu mikrofalowego Ethos 900 (Milestone, USA). Stężenie cynku w zmineralizowanych próbkach oznaczano za pomocą płomieniowej spektrometrii absorpcji atomowej (ang. Atomic Absorption Spectroscopy, AAS) (PerkinElmer 1100B). Dane eksperymentalne zebrano z 7-22 jaj dla każdej grupy doświadczalnej i kontroli w każdym dniu, przy czym doświadczenia prowadzono w 3 powtórzeniach technicznych.

3.6. Oznaczanie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD)

Aktywność SOD oznaczano metodą spektrofotometryczną (Alam i in., 2021). Do 200 mg wyizolowanych tkanek zarodka kurzego dodano 1 ml buforu do izolacji białek (PBS, 1 mM ditiotretitol (DTT), 1 mM fenylo-metylo-sulfonylu-fluorek (PMSF), 3 mM EDTA, 3 mM MgSO₄), a następnie tkanki homogenizowano, homogenizatorem IKA T10 Basic. Homogenaty odwirowano przy 12000×g przez 10 min w 4°C, po czym nadsącz przynoszono do probówek typu Eppendorf. Do 100 µl ekstraktu białkowego dodawano: 200 µl metioniny 0,19 M, 200 µl ryboflawiny 0,11 mM, 100 µl błękitu nitrotetrazolowego (NBT) 1,7 mM oraz 1400 µl PBS. Do próby ślepej zamiast ekstraktu białkowego dodawano bufor do izolacji białek. Absorbancję mierzono przy długości fali 560 nm z zastosowaniem czytnika płytek (CLARIO star plus, BMG LABTECH). Wyniki wyrażano w U/µg białka. Jedna jednostka (1 U) aktywności SOD to ilość ekstraktu hamująca powstawanie formazanu o 50 %. Eksperymenty wykonano w 6 powtórzeniach biologicznych i 3 powtórzeniach technicznych.

3.7. Oznaczanie zawartości grup karbonylowych białek (CP)

Zawartość grup karbonylowych białek oznaczano metodą spektrofotometryczną (Mesquita i in., 2014). Białka izolowano jak opisano powyżej i rozcieńczano w PBS do

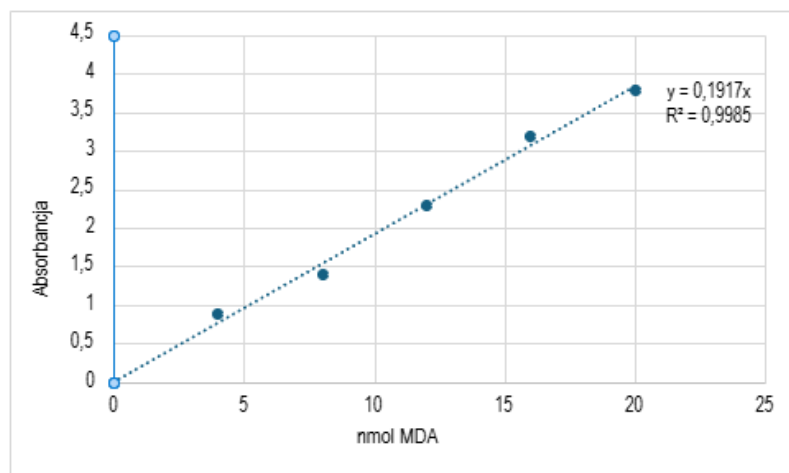
stężenia 1 µg/µl. Do 400 µl ekstraktu białkowego dodawano w stosunku 1:1 roztwór 10 mM 2,4-dinitrofenylohydrazyny (DNPH) w 0,5 M kwasie fosforowym (H₃PO₄). Mieszaninę inkubowano 10 min w RT. Do próby ślepej dodawano 0,5 M H₃PO₄ bez DNPH. Następnie dodawano 200 µl 6 M NaOH i inkubowano przez 10 min w RT. Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm z zastosowaniem czytnika płytek (CLARIO star plus, BMG LABTECH). Stężenie grup karbonylowych obliczano z wykorzystaniem współczynnika ekstynkcji $\varepsilon = 22\,308\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Zawartość białek karbonylowanych wyrażano jako nmol/µg białka. Eksperymenty wykonano w 6 powtórzeniach biologicznych i 3 powtórzeniach technicznych.

3.8. Oznaczanie zawartości dialdehydu malonowego (MDA)

Zawartość MDA w tkankach zarodków kurzych oznaczano metodą spektrofotometryczną dwiema procedurami: klasyczną metodą opisaną przez Esterbauera i Cheesemana (Esterbauer i Cheeseman, 1990) oraz z wykorzystaniem zestawu komercyjnego Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (MAK085, Sigma-Aldrich).

W przypadku metody klasycznej, 200 mg wyizolowanych tkanek homogenizowano w 1 ml 0, 1% TCA (kwas trójchlorooctowy) zawierającego 0,01 % BHT (butylowany hydroksytoluen). Po odwirowaniu homogenatów (10000×g, 15 min, 4°C) do nadsącza dodawano PBS oraz 0,5 % TBA (kwas tiobarbiturowy) rozpuszczony w 20 % TCA (1:1:2). Próbkę inkubowano 30 min w 95°C, chłodzono na lodzie i mierzono absorbancję przy 532 nm z zastosowaniem czytnika płytek (CLARIO star plus, BMG LABTECH). Stężenie MDA obliczano z wykorzystaniem współczynnika ekstynkcji $\varepsilon = 15,5\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Wyniki wyrażano w nmol/g tkanki.

W drugiej procedurze wykorzystano 50 mg tkanek homogenizowanych w buforze lizy dostarczonym w zestawie (zawierającym BHT). Po odwirowaniu (13000×g, 10 min, 4°C) do nadsącza dodawano roztwór TBA zgodnie z protokołem zestawu. Próbkę inkubowano 60 min w 95°C, następnie chłodzono na lodzie i mierzono absorbancję przy 532 nm z zastosowaniem czytnika płytek (CLARIO star plus, BMG LABTECH). Stężenie MDA obliczano na podstawie krzywej wzorcowej (Ryc. 4). Wyniki wyrażano w nmol/g tkanki.

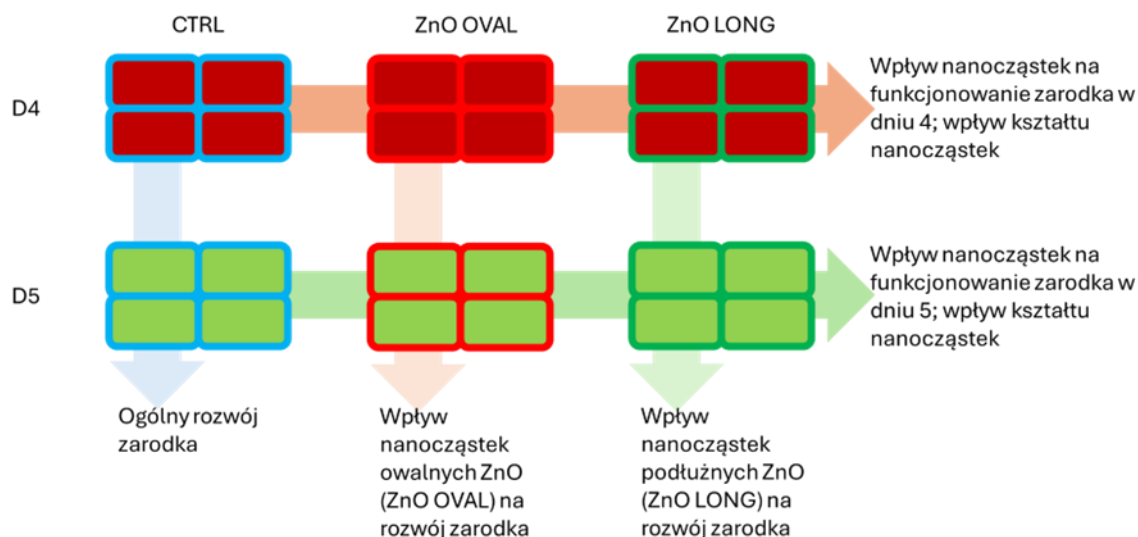


Ryc. 4. Krzywa wzorcowa dla oznaczenia zawartości MDA.

3.9. Mikromacierze

RNA izolowano z zarodków kurzych inkubowanych przez 4 i 5 dni po podaniu nanocząstek (10 µg/ml nanocząstek ZnO OVAL lub ZnO LONG zawieszonych w PBS, 100 µl na jajo). Grupie kontrolnej podawano 100 µL PBS. Całkowite RNA izolowano przy użyciu zestawu RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Niemcy). Podczas izolacji RNA zastosowano DNazę (RNase-Free DNase Set, Qiagen, Hilden, Niemcy), w celu usunięcia zanieczyszczeń DNA. Cała procedura była prowadzona zgodnie z instrukcją producenta. Do oceny czystości i stężenia uzyskanego RNA wykorzystano spektrofotometr NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Jakość RNA weryfikowano przy użyciu systemu Agilent Bioanalyzer 2100 i zestawu Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Do analiz mikromacierzowych wykorzystano próbki bardzo dobrej jakości o wysokim współczynniku integralności (RIN ang. RNA Integrity Number = 10). Schemat przeprowadzonego doświadczenia z zastosowaniem mikromacierzy przedstawiono na Ryc.5. W celu identyfikacji genów o zmienionej ekspresji wykonano 24 mikromacierze. W eksperymencie zastosowano mikromacierze ekspresyjne Chicken (V2) Gene Expression Microarrays, 4x44k (Agilent Technologies, USA) (Agilent Technologies, USA) oraz zestaw odczynników Agilent Technologies, zgodnie z procedurą producenta. W pierwszym etapie RNA zostało przepisane na komplementarne DNA (cDNA), a w kolejnym zostało przepisane na cRNA z jednoczesnym znakowaniem cyjaniną 3 (Cy3) przy użyciu zestawu Low Input Quick Amp Labeling Kit, One-color.. Zastosowano RNA Spike-In Kit jako wewnętrzną kontrolę

w celu monitorowania wydajności znakowania i hybrydyzacji. Uzyskane cRNA przygotowano do hybrydyzacji używając zestawu Gene Expression Hybridization Kit. Hybrydyzację prowadzono w temperaturze 65 °C przez 17 h w piecu hybrydyzacyjnym.



Ryc. 5. Schemat przedstawiający analizę mikromacierzy. Wyniki mikromacierzy analizowano w ujęciu horyzontalnym (wpływ nanocząstek OVAL i LONG w porównaniu z grupą kontrolną w dniach 4 i 5) oraz w ujęciu wertykalnym, ukazując zmiany specyficzne dla poszczególnych typów nanocząstek (ZnO OVAL i ZnO LONG) w ekspresji genów pomiędzy dniem 4 i 5, z wyłączeniem zmian związanych z naturalnym rozwojem zarodka kurzego (w grupie kontrolnej CTRL).

Po hybrydyzacji mikromacierze płukano z wykorzystaniem dedykowanych buforów z zestawu Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent Technologies, USA). Intensywność świecenia zhybrydyzowanych cząstek cRNA szczytano przy użyciu skanera (Agilent DNA Microarray Scanner G2505C), a następnie dane intensywności świecenia były konwertowane do danych liczbowych przy pomocy programu Agilent Feature Extraction (FE) Software, wersja 10.7.3.1.

3.10. Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)

W celu walidacji wyników z mikromacierzy zastosowano technikę PCR w czasie rzeczywistym. Potwierdzono wyniki kilku wybranych genów: *COL6A2* (łańcuch alfa-2 kolagenu VI), *SDHA* (podjednostka flawoproteinowa dehydrogenazy bursztynianowej [ubichinonowej], mitochondrialna), *PSMB7* (podjednostka beta 7 proteasomu 20S), *STEAP3* (metalloreduktaza STEAP3) metodą PCR w czasie rzeczywistym. Do amplifikacji

wszystkich wybranych genów zastosowano komercyjne zestawy starterów (PrimePCR SYBR Green Assay, Chicken, Bio-Rad, Warszawa, Polska). Gen *RPL13* (białko rybosomalne 60S L13) wykorzystano jako gen referencyjny, po wcześniejszej weryfikacji jego stabilności algorytmem geNorm. Do odwrotnej transkrypcji użyto zestawu Script cDNA Synthesis Kits (Bio-Rad), zgodnie z procedurą producenta. Reakcję PCR w czasie rzeczywistym przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu iTaq Univer SYBR Green Supermix (Bio-Rad) na termocyklerze Aria Mx (Agilent Technologies). Warunki reakcji obejmowały: aktywację polimerazy w 95 °C przez 2 min; amplifikację (40 cykli) obejmującą denaturację w 95 °C przez 5 s oraz przyłączanie starterów i elongację w 60 °C przez 30 s. Względny poziom ekspresji badanych genów oznaczano metodą $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak i Schmittgen, 2001).

3.11. Oznaczenia zawartości cytokin

Tkanki zarodków kurzych CTRL oraz traktowanych nanocząstkami ZnO OVAL, ZnO LONG, ZrO₂ i Y₂O₃ w stężeniu 10 µg/ml izolowano w 5 i 7 dniu inkubacji. Izolowane tkanki homogenizowano homogenizatorem IKA T10 Basic w buforze zawierającym: PBS; 0,1% Triton X-100; 0,5 mM EDTA oraz inhibitor proteaz. Homogenaty wirowano przy 12000×g przez 15 min w 4°C, a uzyskany nadsącz przenoszono do probówek typu Eppendorf i rozcieńczano buforem reakcyjnym dostarczonym w zestawie.

Oznaczenia wykonano z zastosowaniem zestawu MILLIPLEX® Chicken Cytokine/Chemokine Panel (GCYT1-16K, Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy) zgodnie z instrukcją producenta. Panel obejmuje oznaczanie następujących cytokin i chemokin: IL-2 (interleukina 2), IL-6 (interleukina 6), IL-10 (interleukina 10), IL-16 (interleukina 16), IL-21 (interleukina 21), MIP-1α/CCL3 (białko zapalne makrofagów 1 alfa), MIP-1β/CCL4 (białko zapalne makrofagów 1 beta), IFN-α (interferon alfa), IFN-γ (interferon gamma), M-CSF (czynn timer stymulujący tworzenie kolonii makrofagów), VEGF (czynn timer wzrostu śródbłnka naczyniowego), RANTES/CCL5.

Analizę przeprowadzono w technologii xMAP® Luminex®, umożliwiającej jednoczesne, ilościowe oznaczanie wielu białek w jednej próbce. Próbki inkubowano z mikrokulkami pokrytymi przeciwciałami swoistymi 2h w temperaturze pokojowej, a następnie z biotynylowanymi przeciwciałami detekcyjnymi i streptawidyną sprzężoną z

fykoerytryną (SAPE). Sygnał fluorescencji rejestrowano przy użyciu systemu Bio-Plex® 200 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), a dane poddano analizie zgodnie z procedurą producenta.

3.12. Przygotowanie preparatów histologicznych

Do przygotowania preparatów histologicznych zarodki kurze były zbierane w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Zarodki utrwalano w formalinie przez 24 h, a następnie przenoszono do 70% etanolu. Do zatapiania w parafinie próbki poddawano procesowi odwodnienia w gradiencie stężeń etanolu (70%, 80%, 96%, 99%), następnie w ksylenie, a ostatecznie infiltracji parafiną z użyciem procesora do tkanek (STP 120, Microm). Błoczki zatopione w parafinie z których następnie wykonano preparaty o grubości 5 µm na potrzeby mikroskopii konfokalnej oraz o grubości 3 µm na potrzeby oceny histopatologicznej. Przygotowane preparaty odparafinowano poprzez inkubację dwukrotnie, po 10 min w ksylenie oraz następnie w szeregu alkoholowym etanolu po 5 min na każde stężenie (99%, 96%, 70%).

3.13. Barwienie hematoksyliną i eozyną

Odparafinowane preparaty zostały przepłukane wodą destylowaną. Następnie zostało przeprowadzone przez 10 min barwienie hematoksyliną Erlicha. Potem preparaty zostały odpłukane oraz przeniesione do zakwaszonego alkoholu. W kolejnym etapie zostało wykonane barwienie eozyną przez 5 min. Po odpłukaniu preparaty zostały odwodnione w szeregu alkoholowym 70%, 80%, 90%, 96%, 99,8% przez 5 min w każdym stężeniu. W ostatnim kroku preparaty zostały umieszczone na 10 min w ksylenie a następnie zaklejone. Ocena histopatologiczna została wykonana w Zakładzie Patologii Zwierząt Katedry Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Instytutu Medycyny Weterynaryjnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Do badania wykorzystano mikroskop świetlny Olympus BX43 (Olympus, Japonia) wyposażony w oprogramowanie do analizy obrazu.

3.14. Mikroskopia konfokalna

Wizualizację jąder komórkowych wykonano z wykorzystaniem barwnika 7-aminoaktynomycyna D (7-AAD, Cayman Chemical) lub Hoechst 33342 (Biotium), skrawki inkubowano w zależności od użytego barwnika, 15 min lub 3 min w ciemności oraz płukano trzykrotnie w PBS.

Dla określenia zmian w ekspresji markerów apoptotycznych w tkankach zarodków poddanych działaniu nanocząstek, zostało przeprowadzone znakowanie immunohistochemiczne dla białka Bax, Bcl2 oraz aktywnej kaspazy-3 (CPP32). Skrawki po odparafinowaniu blokowano w roztworze 1% BSA przez 30 min. Po przepłukaniu PBS nakładano na nie królicze przeciwciała pierwszorzędowe (w rozcieńczeniach od 1:200 dla CPP32 (Merck) i 1:300 – dla Bax i Bcl2 (Sigma-Aldrich)) i inkubowano przez 1 h w RT dla CPP32 lub 24 h w 4°C – dla Bax i Bcl2. Po dwukrotnym płukaniu PBS na skrawki nakładano przeciwciała drugorzędowe sprzężone z fluorochromami. Dla kontroli i nanocząstek ZnO OVAL i LONG oraz Y₂O₃ stosowano przeciwciała anty-królik sprzężone z AlexaFluor 488 (zielona fluorescencja). Dla nanocząstek ZrO₂ stosowano przeciwciała anty-królik sprzężone z AlexaFluor 546 (czerwona fluorescencja).

Obrazowanie przeprowadzono przy użyciu obiektywu 20x w systemie skaningowej mikroskopii konfokalnej FV-500 Olympus (Olympus, Polska) w trybie skanowania sekwencyjnego. Zastosowano następujące filtry wzbudzenia-emisji: 405 nm vs. 430–450 nm; 488 nm vs. 505–525 nm; 543 nm vs. 560 IF. Obrazy mikroskopii konfokalnej zestawiono do rycin w programie Adobe Photoshop CS6.

3.15. Analiza statystyczna

Wszystkie uzyskane wyniki poddano wstępnej analizie pod kątem jednorodności wariancji oraz rozkładu normalnego (test Kołmogorowa-Smirnowa). W zależności od uzyskanych rezultatów przeprowadzano analizę statystyczną z użyciem ANOVA z testem post hoc Tuckeya (dla rozkładu normalnego) lub testu Manna–Whitneya (dla rozkładu nienormalnego). Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono w programie Graph-Pad In-Stat 3.10. Przyjęto poziom istotności: $p \leq 0.05$ jako istotny, $p \leq 0.01$ lub $p \leq 0.001$ jako wysoce istotny, a $p \leq 0.1$ jako trend.

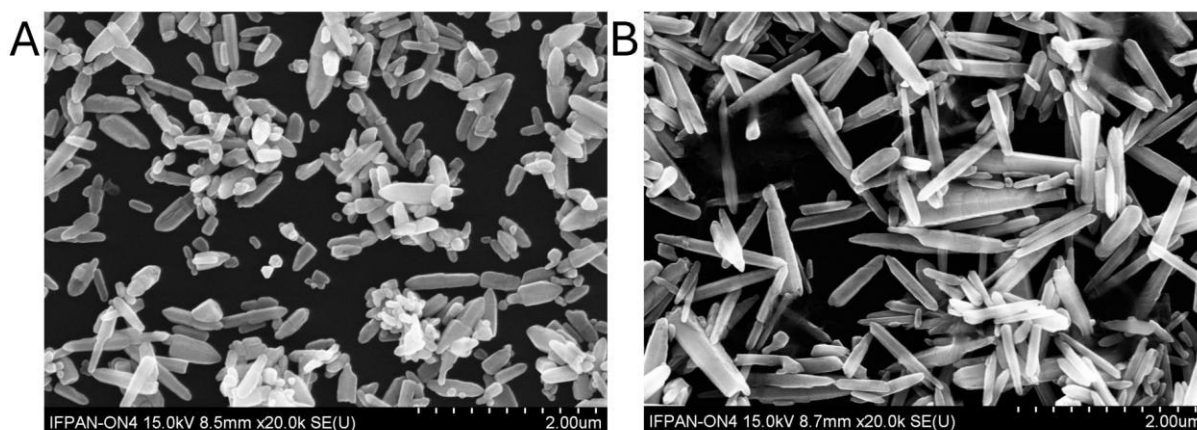
Analizę statystyczną danych mikromacierzowych wykonano w programie Gene Spring14 (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Zbiory prób filtrowano według flag, aby usunąć próby niskiej jakości (oznaczone jako „absent”). Istotność statystyczną różnic oceniano przy użyciu testu Moderated T-test ($p < 0.05$) oraz zastosowano korekcję wielokrotnych porównań metodą Benjamini-Hochberg opartą o kontrolę współczynnika fałszywych odkryć ($FDR < 0,05$). Dane mikromacierzowe zdeponowano w repozytorium Gene Expression Omnibus (numer dostępu: GSE301197)

4. Omówienie i dyskusja wyników

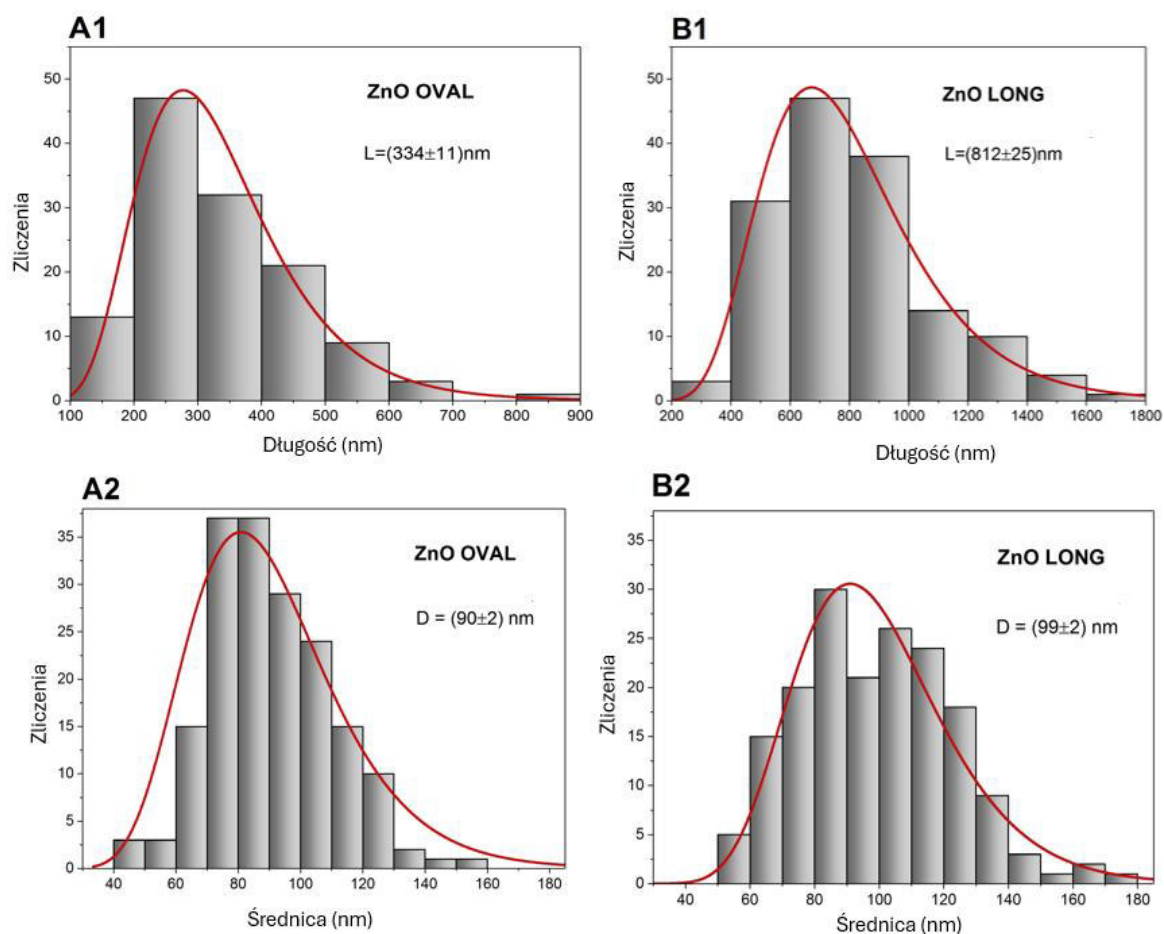
4.1. Nanocząstki ZnO

4.1.1. Charakterystyka morfologiczna nanocząstek ZnO metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)

Nanocząstki ZnO OVAL (Ryc. 6A) cechują się kształtem o łagodnie zaokrąglonych krawędziach, na podstawie zdjęć z SEM mają one długość 334 nm, natomiast ich szerokość to 90 nm (Ryc. 7A1 i A2). ZnO OVAL charakteryzują się bardziej zróżnicowaną i heterogeniczną morfologią, oprócz pojedynczych nanocząstek obecne są struktury bliźniacze powstałe w wyniku fuzji mniejszych kryształów.



Ryc. 6. Mikrofotografie SEM nanocząstek ZnO: ZnO OVAL (A) i ZnO LONG (B).

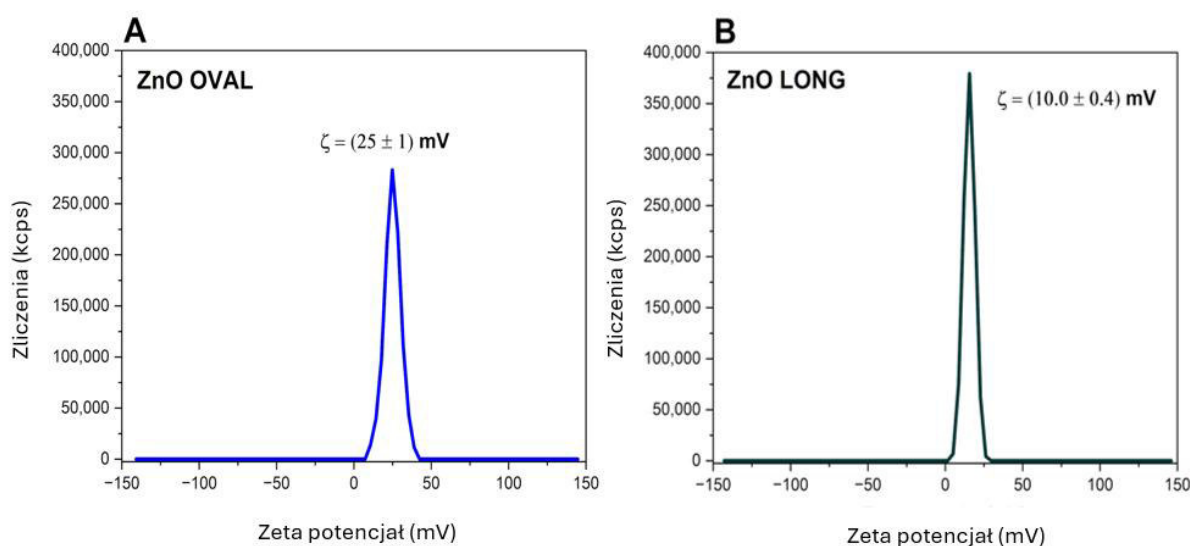


Ryc. 7. Histogramy rozkładu rozmiaru z dopasowanymi krzywymi rozkładu log-normalnego dla nanocząstek ZnO na podstawie analizy obrazów SEM. A1, A2 – rozkład długości i średnicy nanocząstek ZnO OVAL; B1, B2 – rozkład długości i średnicy nanocząstek ZnO LONG. Średnią długość nanocząstek ZnO OVAL określono z pominięciem struktur bliźniaczych. Podano średnie arytmetyczne długości nanocząstek wraz z odchyleniem standardowym.

Nanocząstki ZnO LONG (Ryc. 6B), charakteryzują się morfologią sześciokątnych pryzmatów z wyraźnym wydłużeniem. Powierzchnie nanocząstek ZnO OVAL są bardziej nieregularne w porównaniu z dobrze wykształconymi krawędziami ZnO LONG, a ich rozmiary to 612 nm długości i 99 nm szerokości (Ryc. 7B1 i B2).

4.1.2. Wyniki pomiarów potencjału zeta

Potencjał zeta nanocząstek dla ZnO OVAL wynosił około 25 mV, natomiast dla nanocząstek ZnO LONG był znacząco niższy i wynosił około 10,0 mV (Ryc.8). Różnice te wskazują na wyraźne zróżnicowanie właściwości powierzchniowych, sugerując odmienne profile stabilności koloidalnej obu materiałów. Obserwowany średni rozmiar hydrodynamiczny był większy niż pomiary nanocząstek wykonane w SEM, co wynika z ich obłego lub podłużnego kształtu (Tab. 1).



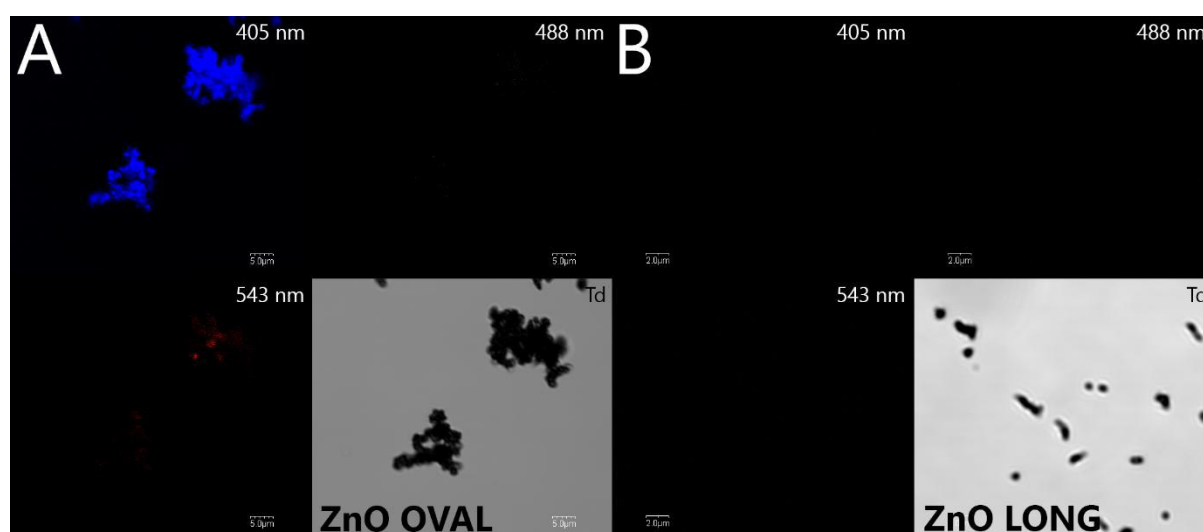
Ryc. 8. Rozkład potencjału zeta nanocząstek ZnO OVAL (A) i ZnO LONG (B).

Tabela 1. Średni rozmiar hydrodynamiczny wraz z odchyleniem standardowym oraz indeks polidispersyjności (PDI) nanocząstek ZnO mierzony w 25 °C.

Nanocząstka	Średni rozmiar (nm) $\pm$ SD	PDI
ZnO OVAL	369 ± 7	0.1854
ZnO LONG	2845 ± 95	0.2008

4.1.3. Charakterystyka właściwości optycznych ZnO OVAL

Jony Eu w ilości 0,3% zostały wprowadzone jako czynnik domieszkowy do ZnO OVAL w celu indukowania luminescencji, umożliwiając detekcję nanocząstek w tkankach zarodków przy użyciu konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej, powszechnie stosowanych w badaniach biomedycznych. W miarę biodegradacji sieci ZnO fluorescencja związana z defektami indukowanymi przez Eu zanika (Kiełbik i in., 2017b), co pozwala na bezpośrednie potwierdzenie obecności nanocząstek, a nie jedynie efektu jonów Zn. W przypadku ZnO LONG dodanie jonów Eu doprowadziło do utraty kształtu NPs. W związku z tym nie udało się bezpośrednio potwierdzić obecności nanocząstek w tkankach.

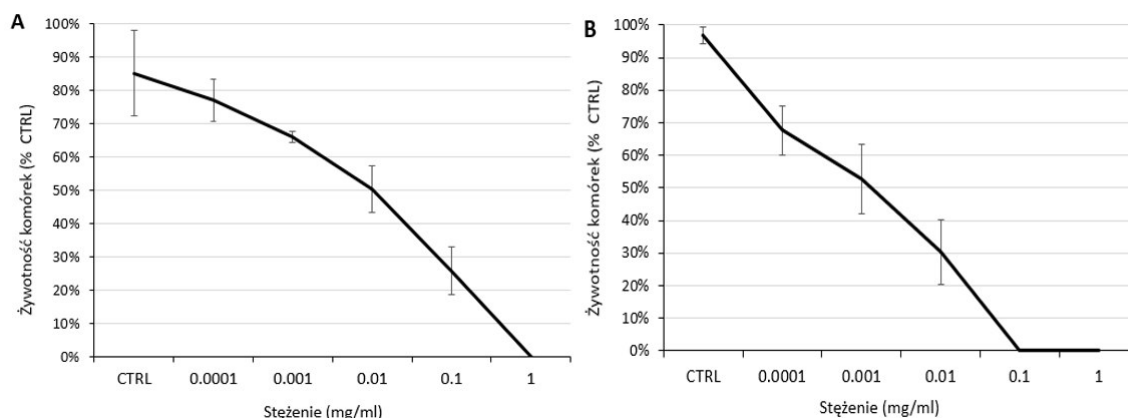


Ryc. 9. Obrazy mikroskopii konfokalnej nanocząstek ZnO OVAL (A) i ZnO LONG (B) zdyspergowanych w wodzie, przedstawiające emisję fluorescencji przy 430–450 nm (wzbudzenie 405 nm), 505–525 nm (wzbudzenie 488 nm) oraz 560 IF (wzbudzenie 543 nm). Kształt agregatów nanocząstek widoczny przy użyciu detektora światła przechodzącego (Td). Widoczna niebieska fluorescencja w przypadku ZnO OVAL jest najprawdopodobniej związana z defektami powierzchni kryształów Zn, powstałymi w wyniku wbudowania Eu w matrycę krystaliczną. Powiększenie obiektywu 40×, zoom cyfrowy 5×. Skala 5 μm.

Jak przedstawiono na Ryc. 9, intensywna fluorescencja związana z defektami powierzchniowymi pod wzbudzeniem 405 nm była obserwowana w przypadku ZnO OVAL, z niewielką fluorescencją czerwoną powiązaną z jonami Eu w zakresie 560 IF pod wzbudzeniem przy 543 nm (Ryc. 9A). Dla ZnO LONG nie zaobserwowano fluorescencji przy żadnym z dostępnych źródeł wzbudzenia (Ryc. 9B).

4.1.4. Oznaczanie żywotności komórek

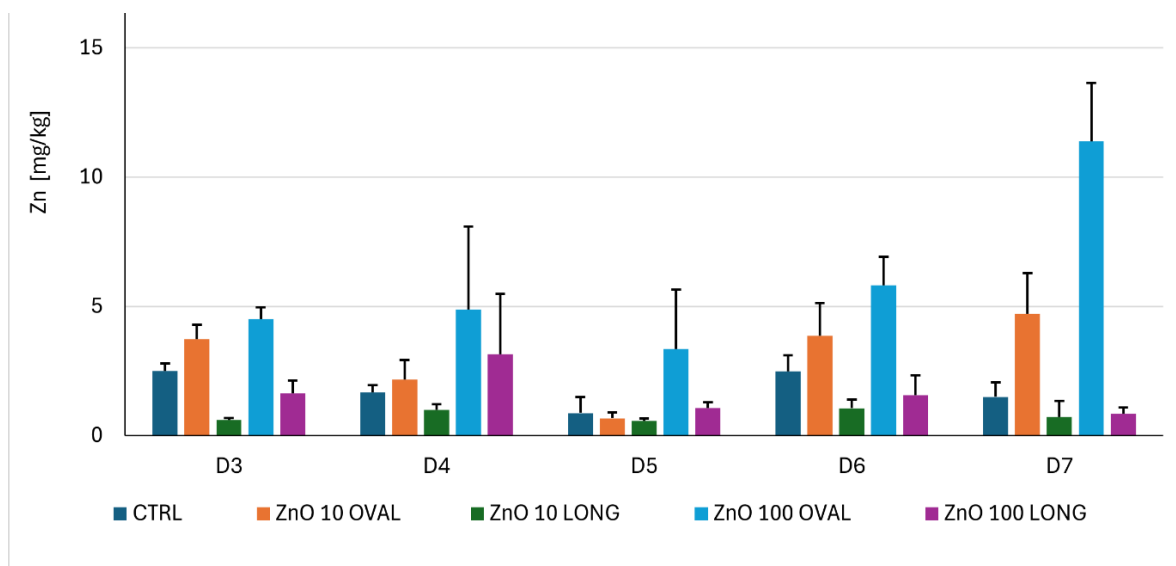
Test żywotności komórek wykazał różnice w zależności od kształtu zastosowanych nanocząstek ZnO. W przypadku ZnO OVAL żywotność fibroblastów zarodków kurzych (CEF) obniżyła się do 50% przy stężeniu 0,01 mg/ml (Ryc. 10A). Natomiast dla ZnO LONG spadek żywotności CEF do poziomu 50% wystąpił już przy stężeniu 0,001 mg/ml (Ryc. 10B), co wskazuje na ich wyższą toksyczność *in vitro*.



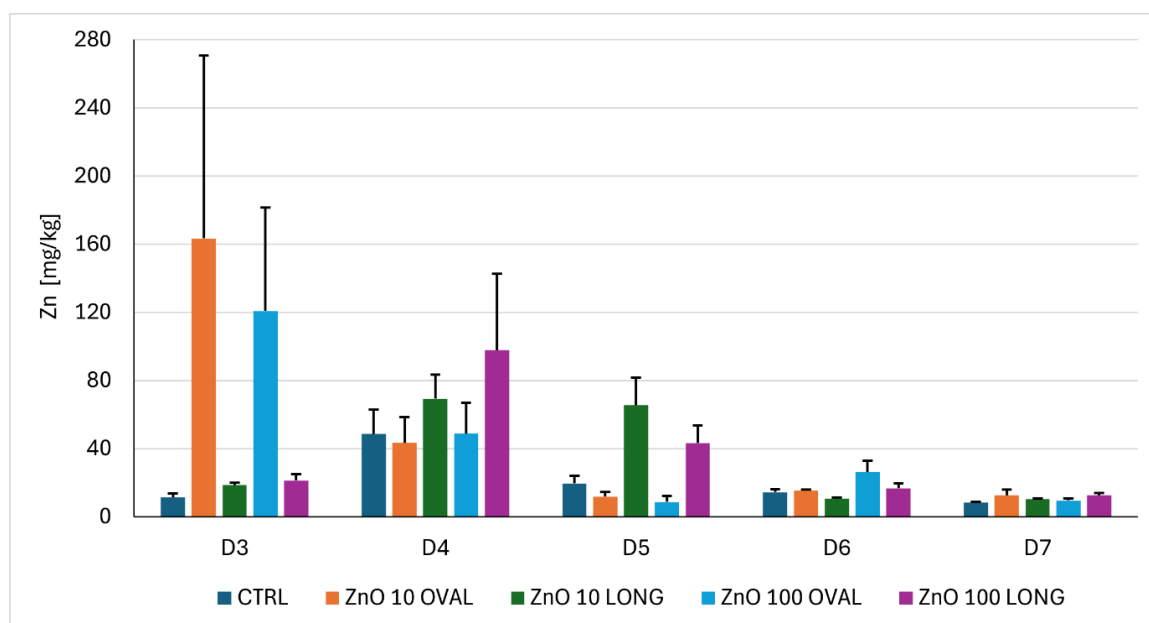
Ryc. 10. Żywotność pierwotnych fibroblastów zarodków kurzych (CEFs) wyrażona jako % żywych komórek 24 h po podaniu ZnO OVAL (A) i ZnO LONG (B) w różnych stężeniach. W przypadku grupy kontrolnej (CTRL) do pożywki hodowlanej dodano odpowiednią objętość PBS.

4.1.5. Stężenie Zn w zarodku i białku jaja dla po podaniu nanocząstek ZnO

Stężenie cynku w białku jaja nie różniło się istotnie statystycznie od grupy kontrolnej (CTRL) (Ryc. 11) i nie przekraczały w większości przypadków 5 mg/kg. Wartość ta odpowiada średniemu stężeniu Zn w jajach, wskazując na brak istotnych zmian zawartości cynku po podaniu nanocząstek.



Ryc. 11. Średnie stężenie cynku w białku jaja od 3 do 7 dnia inkubacji po podaniu jednokrotnej dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ (ZnO 10) lub 100 $\mu\text{g/ml}$ (ZnO 100) nanocząstek ZnO OVAL bądź ZnO LONG.



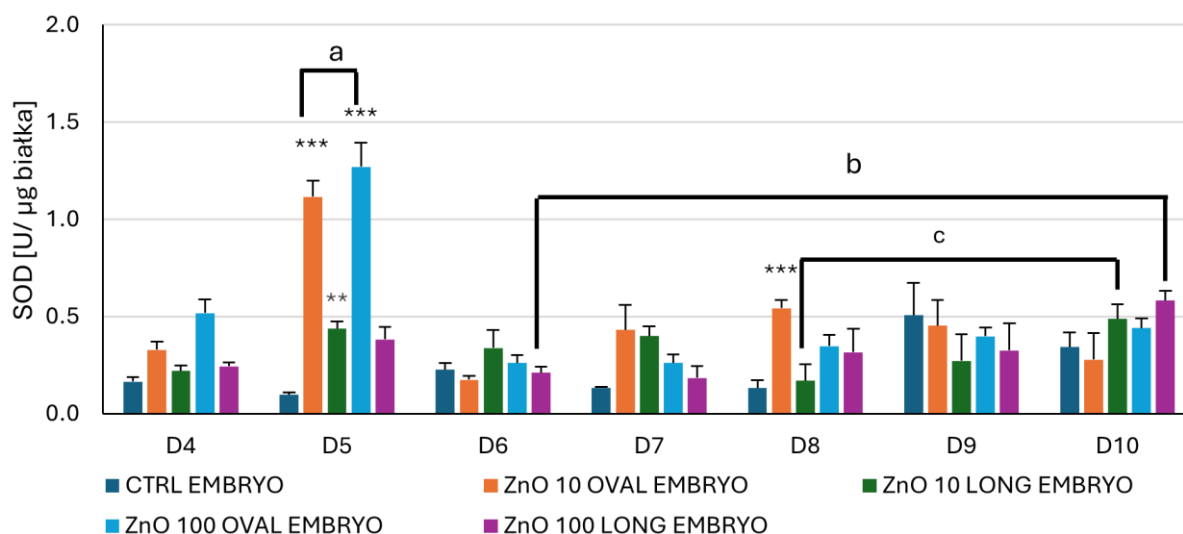
Ryc. 12. Średnie stężenie cynku w zarodkach kurzych od 3 do 7 dnia inkubacji po podaniu jednokrotnej dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ (ZnO 10) lub 100 $\mu\text{g/ml}$ (ZnO 100) nanocząstek ZnO OVAL bądź ZnO LONG.

Średnie stężenie cynku w zarodkach przedstawiono na Ryc. 12. Ze względu na dużą zmienność osobniczą zawartości Zn po aplikacji ZnO OVAL w 3 dniu inkubacji nie uzyskano istotności statystycznej. Jednak zaobserwowano trend obniżania się uzyskanych wyników ($p < 0,1$), zarówno dla obu zastosowanych stężeń (10 i 100 $\mu\text{g/ml}$) ZnO OVAL

między 3 a 4 dniem, jak i pomiędzy ZnO OVAL i ZnO LONG w 3 dniu (dla obu stężeń nanocząstek). Ostatecznie w 6 i 7 dniu poziomu zawartości ZnO we wszystkich badanych kombinacjach był porównywalny do CTRL.

4.1.6. Aktywność SOD po podaniu nanocząstek ZnO

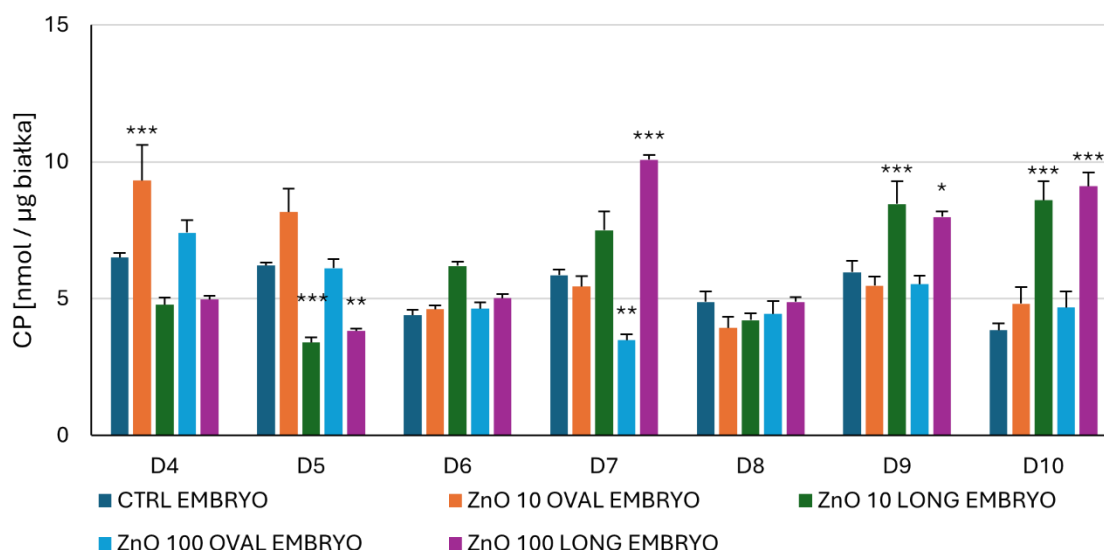
Aktywność SOD zmieniała się istotnie względem CTRL w 5 i 8 dniu inkubacji (Ryc. 13). W 5 dniu po podaniu ZnO OVAL zaobserwowano wysoce istotny wzrost aktywności SOD ($p < 0,001$) dla obu stężeń nanocząstek oraz dla ZnO LONG ($p < 0,01$) przy stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$. Ponadto w 5 dniu stwierdzono istotną różnicę ($p < 0,001$) w aktywności SOD względem innych dni eksperymentu dla obu dawek nanocząstek ZnO OVAL (oznaczoną jako a). W przypadku ZnO LONG istotny wzrost aktywności SOD odnotowano między 6 a 10 dniem (oznaczony jako b) dla wyższego stężenia nanocząstek (100 $\mu\text{g/ml}$), oraz między 8 a 10 dniem (oznaczony jako c) dla niższego stężenia (10 $\mu\text{g/ml}$).



Ryc. 13. Aktywność dysmutazy nadtlenkowej (SOD) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu jednokrotnej dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ (ZnO 10) lub 100 $\mu\text{g/ml}$ (ZnO 100) nanocząstek ZnO OVAL lub ZnO LONG. 1U – ilość ekstraktu enzymatycznego powodująca 50% inhibicję tworzenia formazanu. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Litery oznaczają istotność statystyczną: a – dawki istotnie różniące się względem innych dni eksperymentu; b, c – istotność statystyczna pomiędzy wskazanymi dniami.

4.1.7. Zawartość białek karbonylowanych po podaniu nanocząstek ZnO

Zawartość białek karbonylowanych różniła się istotnie względem CTRL już od 4 dnia inkubacji (Ryc. 14). Po podaniu ZnO OVAL istotne zmiany odnotowano jedynie przy stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$, wysoce istotny wzrost ($p<0,001$) wystąpił w 4 dniu po podaniu nanocząstek, a następnie w 5 dniu odnotowano tendencję wzrostową ($p<0,1$). Dla stężenia 100 $\mu\text{g/ml}$ ZnO OVAL zawartość białek karbonylowanych była zbliżona do wartości oznaczonej dla CTRL we wszystkie dniach, z wyjątkiem 7 dnia, kiedy zaobserwowano istotne obniżenie ($p<0,01$). Po podaniu ZnO LONG w dawce 10 $\mu\text{g/ml}$, widoczne było znaczące obniżenie ($p<0,001$) w ilości białek karbonylowanych w 5 dniu, natomiast wzrost ($p<0,001$) w dniach 9 i 10. Dla ZnO LONG w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ istotne statystycznie obniżenie odnotowano dnia 5 ($p<0,01$). Istotny wzrost był natomiast widoczny w 7 dniu ($p<0,001$), w 9 dniu ($p<0,05$) oraz w 10 dniu ($p<0,001$) po podaniu nanocząstek.

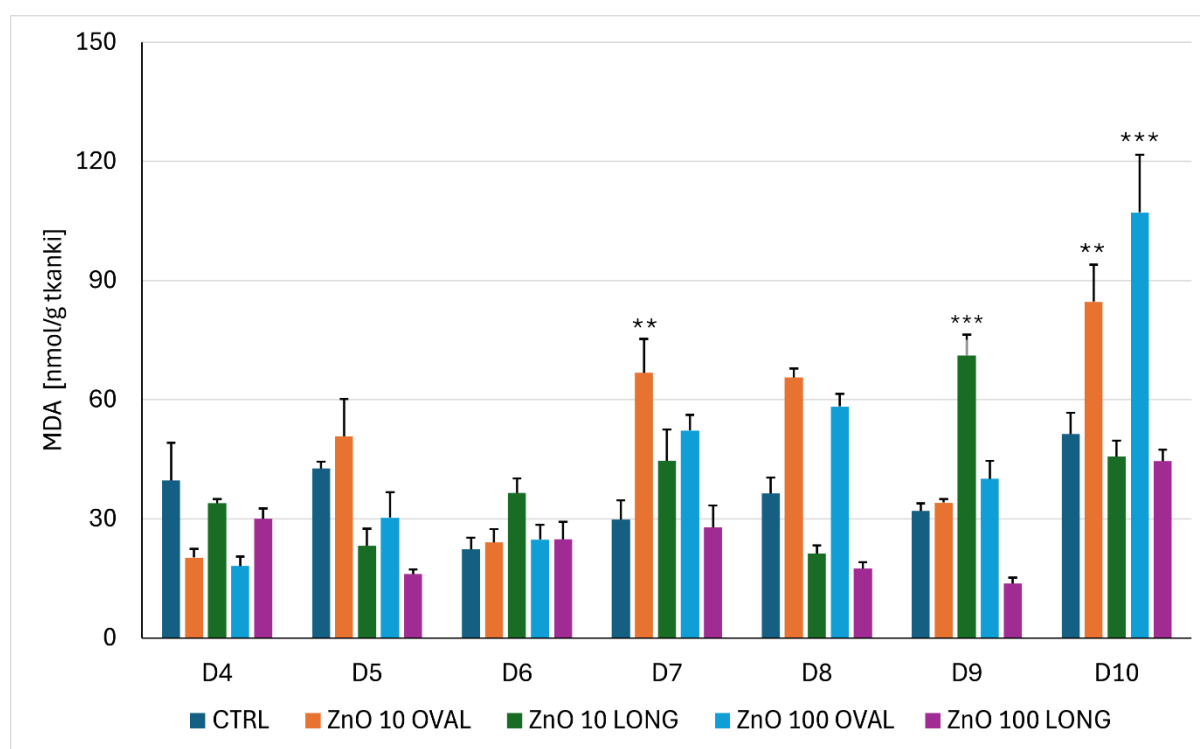


Ryc. 14. Zawartość białek karbonylowanych (CP) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu jednokrotnej dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ (ZnO 10) lub 100 $\mu\text{g/ml}$ (ZnO 100) nanocząstek ZnO OVAL lub ZnO LONG. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

4.1.8. Zawartość MDA po podaniu nanocząstek ZnO

Po podaniu nanocząstek ZnO OVAL w obu stężeniach (10 i 100 $\mu\text{g/ml}$) w zarodkach obserwowano tendencję do wzrostu poziomu peroksydacji lipidów od 5 dnia aż do końca eksperymentu (z obniżeniem do poziomu CTRL w 9 dniu). Istotny wzrost

względem CTRL ($p < 0,01$) odnotowano w 7 i 10 dniu dla stężenia 10 $\mu\text{g/ml}$, natomiast dla stężenia 100 $\mu\text{g/ml}$ wysoce istotny wzrost ($p < 0,001$) miał miejsce w 10 dniu (Ryc. 14). Po wprowadzeniu nanocząstek ZnO LONG przy stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ tendencję wzrostową peroksydacji lipidów zaobserwowano od 6 dnia, przy czym wysoce istotny wzrost względem CTRL ($p < 0,001$) wystąpił 9 dnia (Ryc. 15). Natomiast po podaniu nanocząstek ZnO LONG przy stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ poziom oksydacji lipidów utrzymywał się na poziomie zbliżonym do CTRL lub niższym, bez istotności statystycznej ani wyraźnej tendencji.

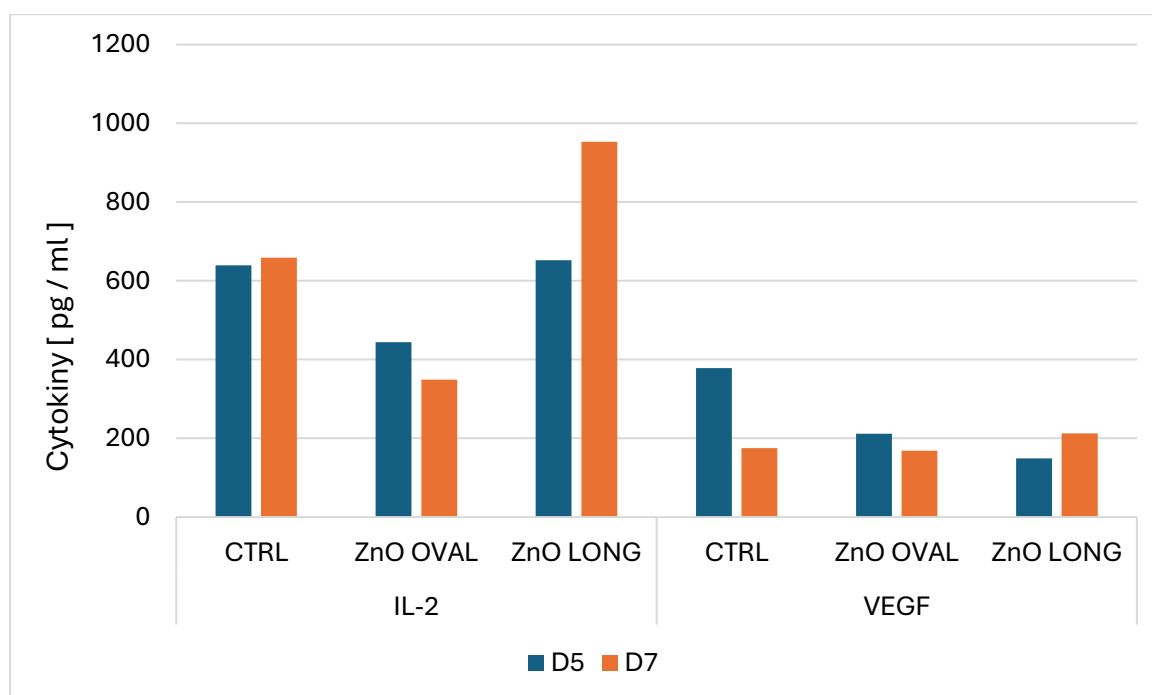


Ryc. 15. Zawartość dialdehydu malonowego (MDA) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu jednokrotnej dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ (ZnO 10) lub 100 $\mu\text{g/ml}$ (ZnO 100) nanocząstek ZnO OVAL lub ZnO LONG. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.9. Poziom cytokin po podaniu nanocząstek ZnO

Jedyne cytokiny dla których otrzymano powtarzalne wyniki to IL-2 oraz VEGF. Dla pozostałych cytokin jedynie w pojedynczych próbkach były obserwowane wyniki wyższe od zera, w związku z czym nie zostały one przedstawione. Ze względu na ograniczenia techniczne testu, niemożliwe było uzyskanie informacji statystycznie

istotnych. Dla IL-2 obserwowano obniżenie stężenia względem kontroli w 5 i 7 dniu po podaniu nanocząstek ZnO OVAL i podwyższenie stężenia dla ZnO LONG w 7 dniu. W przypadku VEGF obserwowano obniżenie stężenia dla obu typów nanocząstek tylko w 5 dniu (Ryc. 16).

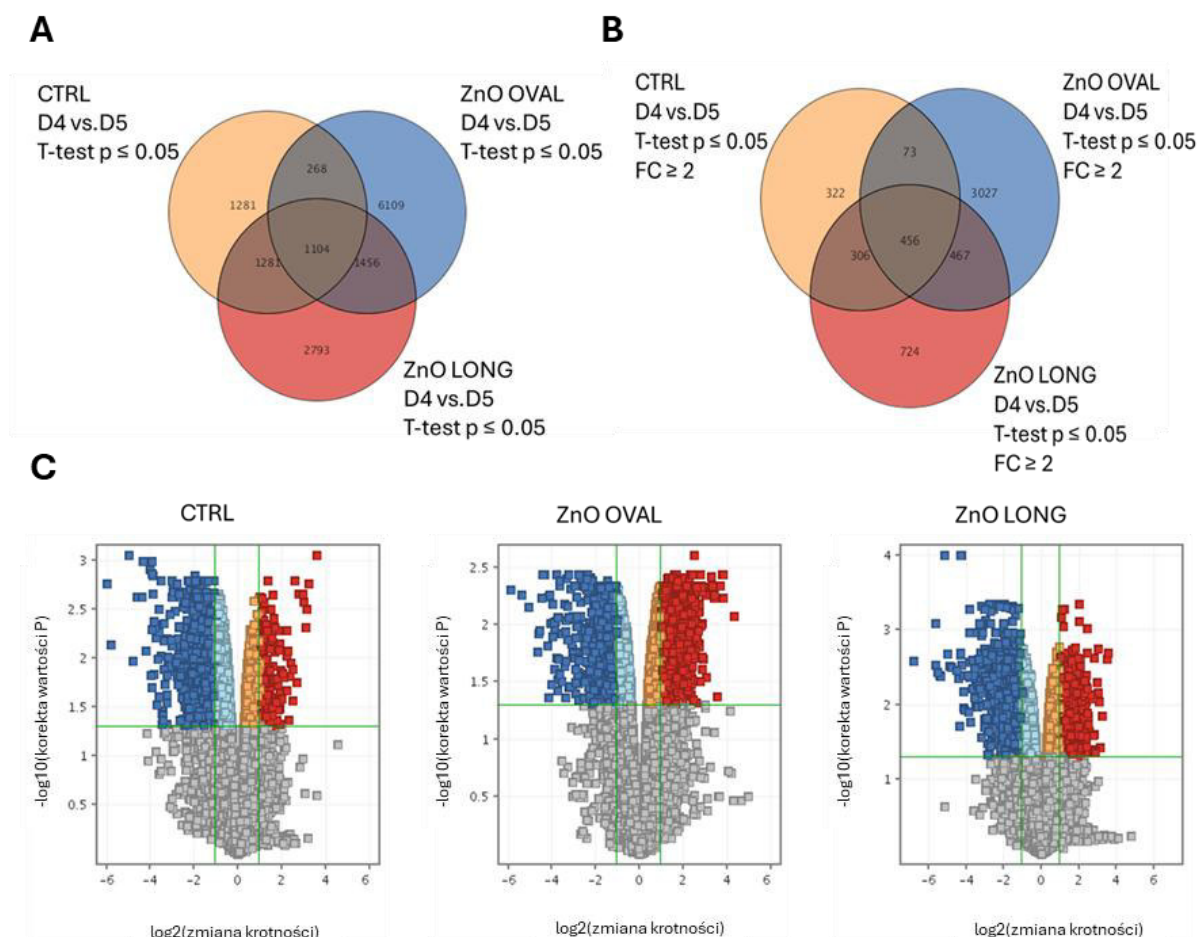


Ryc. 16. Porównanie ilości (pg/ml) IL-2 oraz VEGF w zarodkach z dnia 5 i 7 inkubacji po jednokrotnym podaniu nanocząstek ZnO OVAL oraz ZnO LONG w dawce 10 µg/ml.

4.1.10. Mikromacierze i ilościowy PCR w czasie rzeczywistym (RT-qPCR)

Zarodki kurze traktowano 10 µg/ml ZnO OVAL lub ZnO LONG i inkubowano przez 4 lub 5 dni. Zaobserwowano zmiany w ekspresji 6109 transkryptów specyficznych dla ZnO OVAL oraz 2793 transkryptów dla ZnO LONG (Ryc. 17A). Po uwzględnieniu jedynie tych transkryptów, których wartość zmiany krotności (FC) ≥ 2 , uzyskano 3027 transkryptów zmieniających się pomiędzy 4. a 5. dniem inkubacji dla ZnO OVAL oraz 724 transkrypty dla ZnO LONG (Ryc. 17B). W kolejnym etapie analizy wybrano transkrypty przypisane do konkretnych genów, a następnie, korzystając z bazy danych szlaków metabolicznych Reactome zbadano, do jakich szlaków zostały one przypisane. Dla ZnO OVAL 1487 transkryptów zostało przypisanych do genów, z czego 1108 znalazło swoje

miejsce w bazie Reactome. W przypadku ZnO LONG zidentyfikowano 548 genów, z czego 358 zostało przypisanych do konkretnych szlaków. Dla obu kształtów nanocząstek ZnO główne zmiany dotyczyły genów związanych z wewnątrzkomórkowym przekazywaniem sygnałów oraz metabolizmem energetycznym.

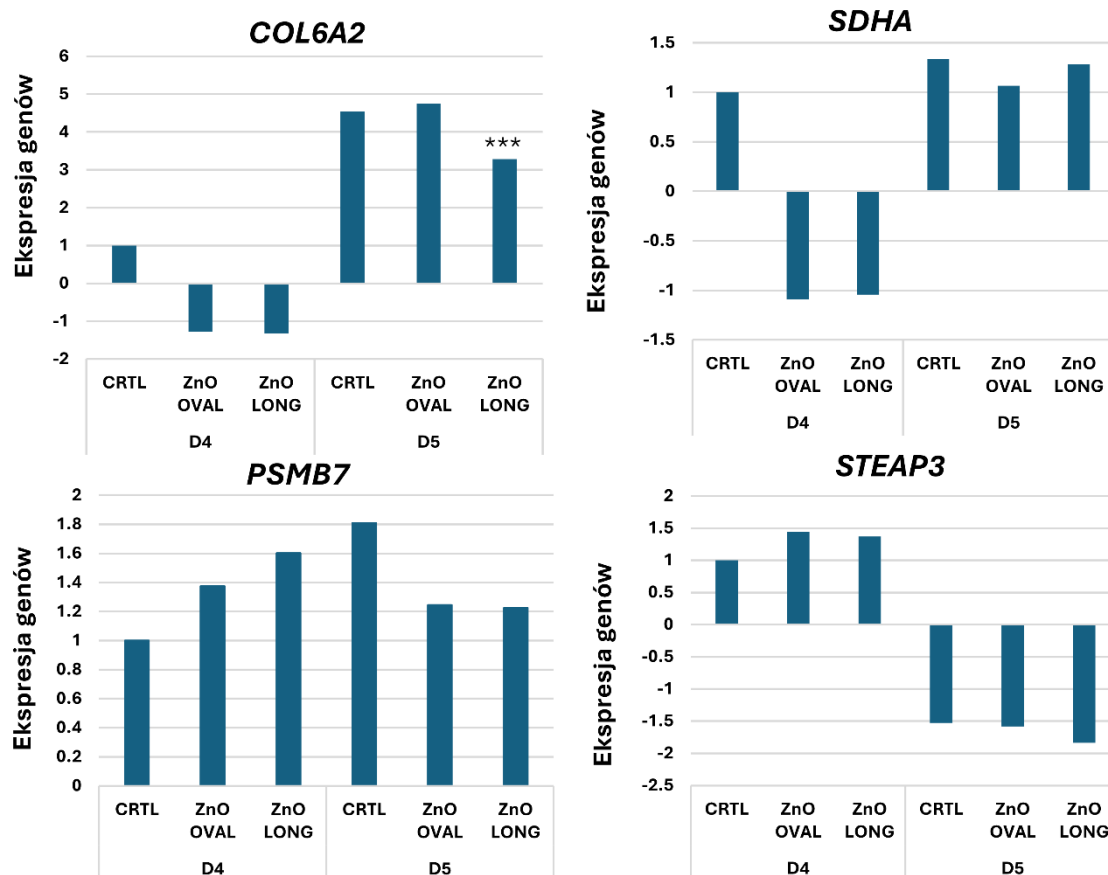


Ryc. 17. Liczba wszystkich transkryptów, których ekspresja uległa istotnym statystycznie zmianom (test t moderowany, $p \leq 0,05$, $FDR < 0,05$), przedstawiona na diagramie Venna (A) oraz po uwzględnieniu zmian tylko w transkryptach o zmianę krotności ($FC \geq 2$) (B), ilość transkryptów odrzuconych po uwzględnieniu zmiany krotności ($FC \geq 2$) została przedstawiona na wykresach Vulcano (C).

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych z mikromacierzy przeprowadzono analizę metodą RT-qPCR. Do walidacji wybrano trzy geny: *COL6A2*, *STEAP3* oraz *PSMB7* (Tab. 2). Ponadto, podczas testów genów referencyjnych zaobserwowano interesujący wynik dla *SDHA*, który również został przedstawiony (Ryc. 18). Statystycznie istotny spadek ekspresji odnotowano jedynie dla genu *COL6A2* w przypadku ZnO LONG w 5 dniu inkubacji względem CTRL ($p < 0,001$). Ekspresja wszystkich wybranych genów korelowała z wynikami mikromacierzy.

Tabela 2. Zmiany ekspresji genów (ich transkryptów) określone z zastosowaniem mikromacierzy zostały zwalidowane RT-qPCR. Zmiany ekspresji genów wyrażono jako zmiana krotności (ang. Fold change, FC) pomiędzy dniem 4 a 5 oraz wartość p (skorygowaną FDR) < 0,01.

Symbol genu	ZnO OVAL		ZnO LONG		CTRL	
	FC	Regulacja	FC	Regulacja	FC	Regulacja
<i>COL6A2</i>	4.19	w dół			3.43	w dół
<i>COL6A2</i>					4.27	w dół
<i>COL6A2</i>					4.42	w dół
<i>STEAP3</i>	3.28	w górę	3.37	w górę		
<i>STEAP3</i>	2.88	w górę				
<i>PSMB7</i>	2.56	w górę	3.10	w górę		

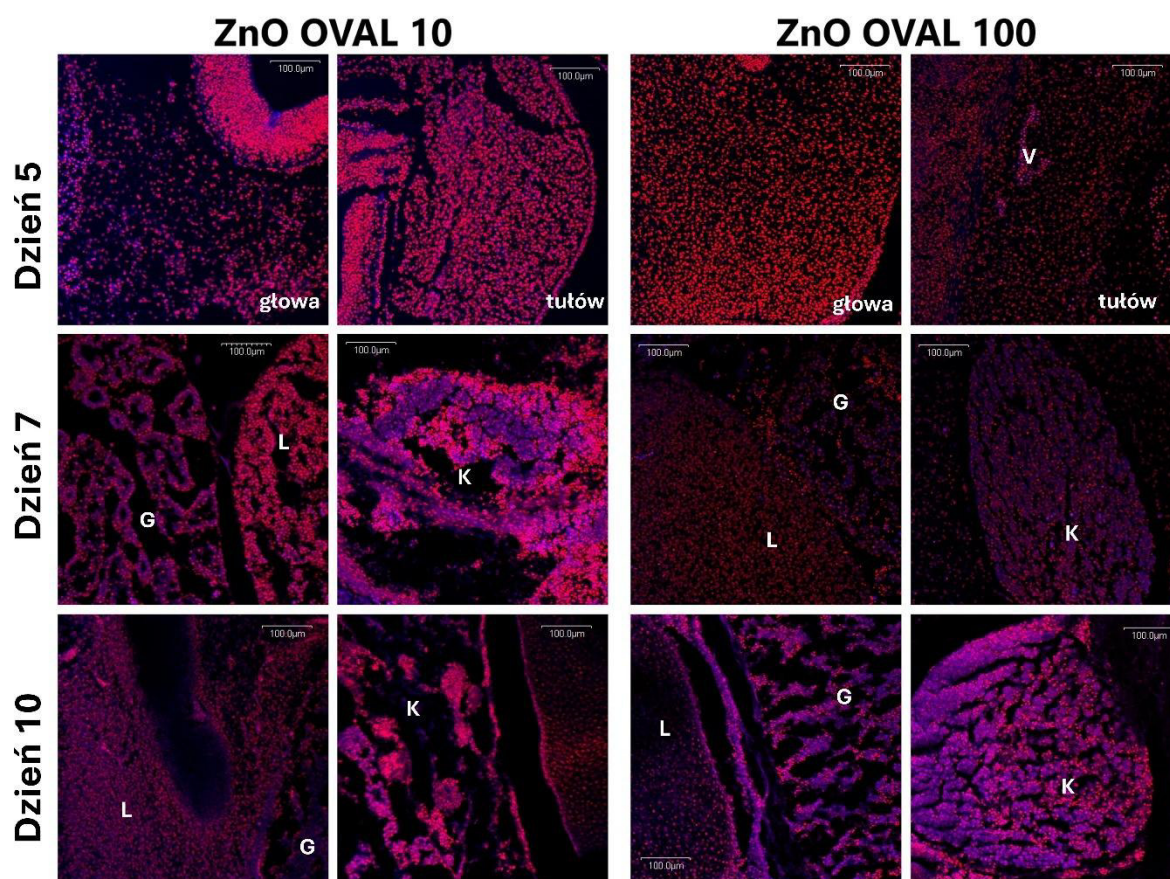


Ryc. 18. Względna ilościowa analiza ekspresji genów *COL6A2*, *SDHA*, *PSMB7* i *STEAP3*. Gwiazdki oznaczają wysoki poziom istotności statystycznej w porównaniu z CTRL z dnia 4; *** $p < 0,001$.

Ekspresja *COL6A2* 4 dnia była niższa niż w CTRL, a 5 dnia wzrosła względem dnia czwartego, co było zgodne z wynikami mikromacierzy. W przypadku genu *STEAP3*, chociaż wyniki uzyskane metodą ilościowego RT-qPCR nie były statystycznie istotne, wykazały tę samą tendencję zmian ekspresji co analiza z użyciem mikromacierzy. Ekspresja *STEAP3* była wyższa w 4 dniu niż w dniu 5. Pomimo dość wysokiej wartości FC dla *STEAP3* uzyskanej z mikromacierzy, zmiany te nie były tak duże w przypadku RT-qPCR ani nie osiągnęły istotności statystycznej. Dla genu *SDHA* zmianę ekspresji względem kontroli odnotowano jedynie w dniu 4, bez istotności statystycznej; w dniu 5 poziomy ekspresji były zbliżone do CTRL. Dla genu *PSMB7* nie zaobserwowano statystycznie istotnych zmian, jednak odnotowano podwyższoną ekspresję w 4 dniu po podaniu obu typów nanocząstek względem kontroli, przy czym większy efekt obserwowano dla ZnO LONG. Natomiast piątego dnia ekspresja uległa obniżeniu względem CTRL.

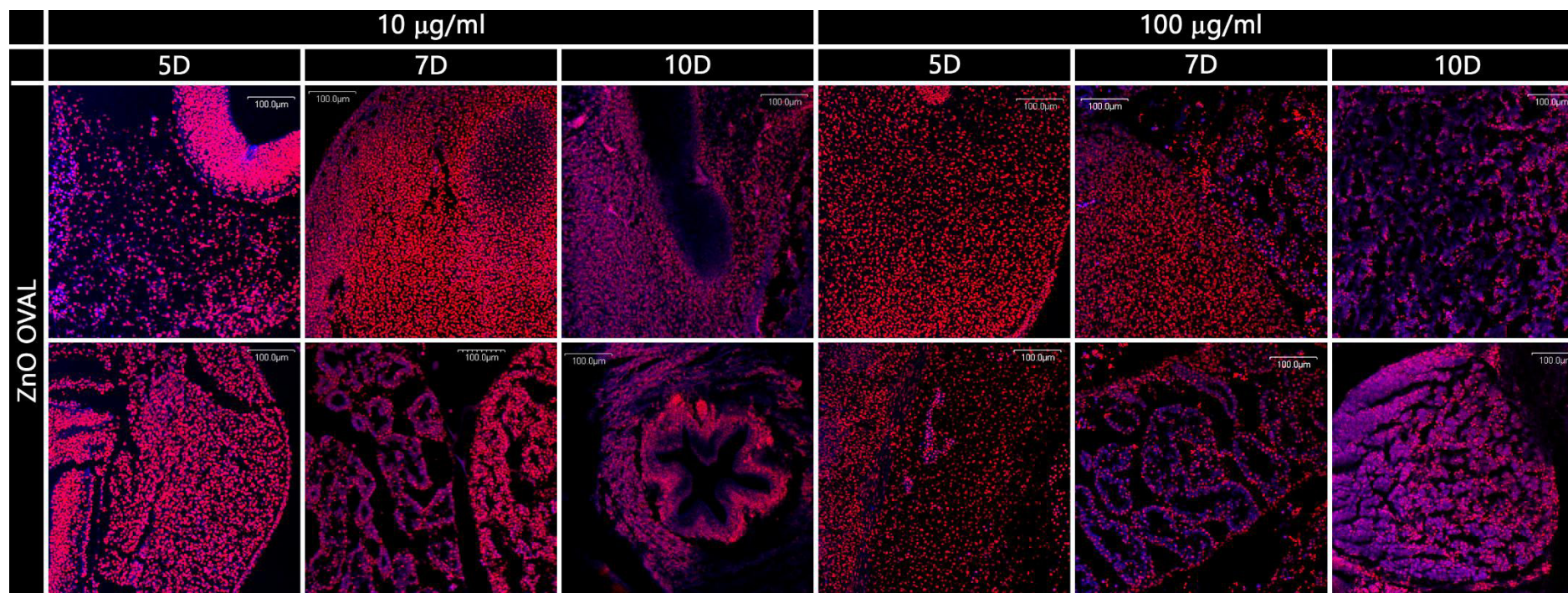
4.1.11. Mikroskopia konfokalna

Dzięki wykorzystaniu nanocząstek ZnO OVAL posiadających domieszkowanie Eu możliwe było potwierdzenie obecności tych nanocząstek w tkankach zarodka. W przypadku obu dawek można stwierdzić obecność nanocząstek, jednakże dla dawki 100 µg/ml (Ryc. 19). Obserwowano porównywalny sygnał fluorescencyjny pochodzący od nanocząstek (fluorescencja niebieska) dla obszaru głowy i tułowia w dniu 5 dla stężenia 10 µg/ml, i wyraźnie niższy sygnał dla stężenia 100 µg/ml, z wyjątkiem tkanek w bezpośrednim sąsiedztwie naczyń krwionośnych (V). Dla dawki 10 µg/ml w dniach 7 i 10 obserwowano nagromadzenie nanocząstek w jelitach (G), wątrobie (L) i znaczące nagromadzenie nanocząstek w nerkach (K). Dla dawki 100 µg/ml intensywność sygnału fluorescencyjnego od ZnO OVAL jest mniejsza od tej obserwowanej dla dawki 10 µg/ml w dniu 7, a porównywalne wartości pomiędzy dawkami osiąga dopiero w dniu 10. Podobnie jak dla mniejszej dawki, widoczne jest nagromadzenie nanocząstek w jelicie (G), wątrobie (L) i nerkach (K).



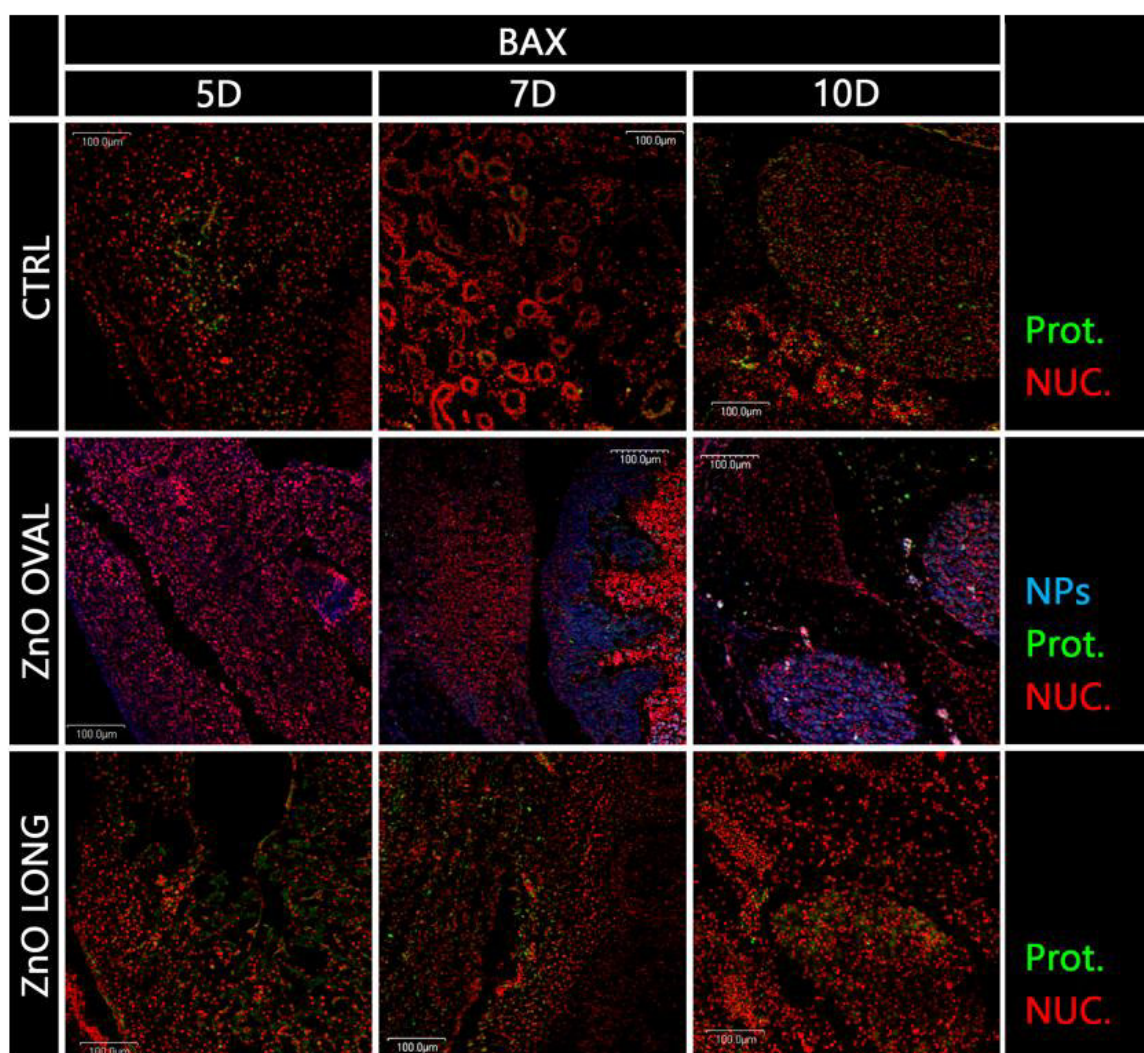
Ryc. 19. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL w stężeniach 10 µg/mL (ZnO OVAL 10) i 100 µg/mL (ZnO OVAL 100) w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20×. Czerwona fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym 7-AAD, natomiast niebieska fluorescencja wskazuje nanocząstki ZnO OVAL. L – wątroba, K – nerka, G – jelito, V – naczynie. Skala 100 µm.

Widoczne jest też równomierne rozmieszczenie nanocząstek ZnO OVAL w tkankach (Ryc. 20).

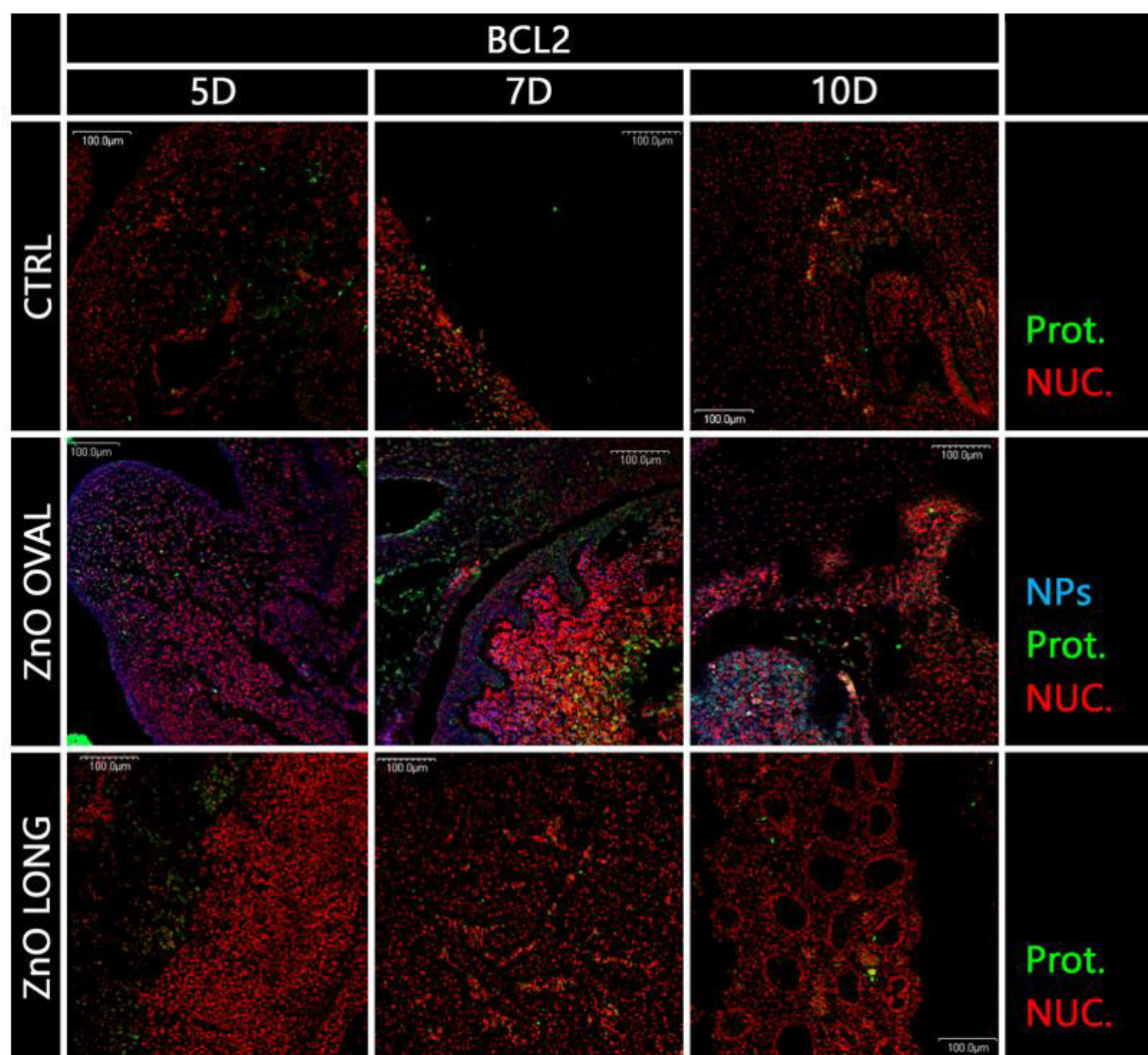


Ryc. 20. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL w stężeniach 10 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Czerwona fluorescencja odpowiada jądrów komórkowym wybarwionym 7-AAD, natomiast niebieska fluorescencja wskazuje nanocząstki ZnO OVAL.

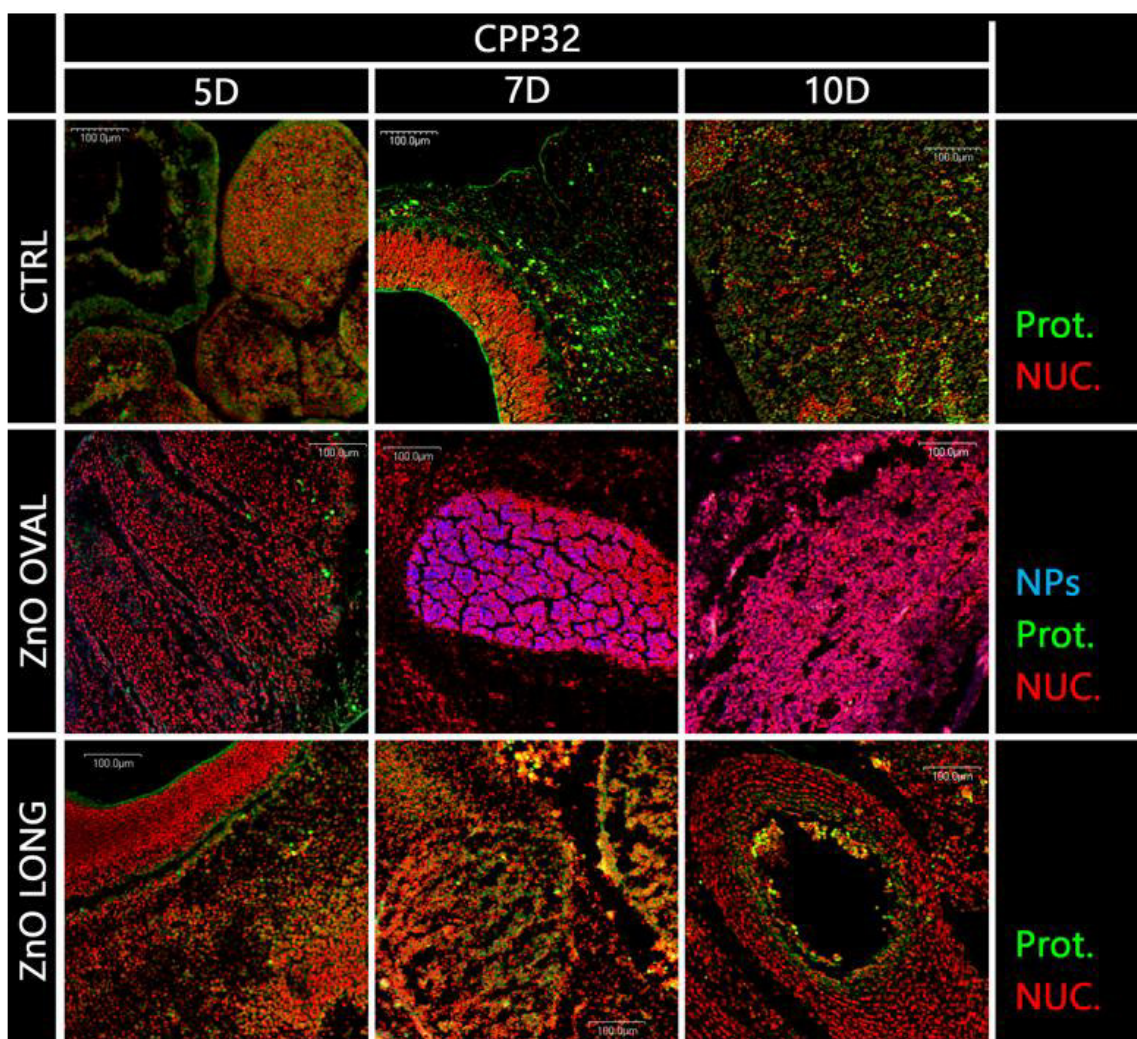
Znakowanie immunohistochemiczne dla białka Bax (Ryc. 21), Bcl2 (Ryc. 22) oraz aktywnej kaspazy-3 (CPP32) (Ryc. 23) po podaniu nanocząstek ZnO LONG wykazało porównywalną zawartość dla wszystkich tych białek dla ZnO LONG względem CTRL. Natomiast po podaniu nanocząstek ZnO OVAL widoczna jest niższa zawartość białek Bax i aktywnej kaspazy-3 (CPP32) we wszystkich dniach, oraz wyższa zawartość białka Bcl2, szczególnie w dniu 7.



Ryc. 21. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL oraz ZnO LONG w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ w 5, 7 oraz 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Zielona fluorescencja wskazuje na obecność białka Bax (Prot.). Czerwona fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym 7-AAD (NUC.), natomiast niebieska fluorescencja wskazuje obecność nanocząstki ZnO OVAL (NPs). Skala 100 μm .



Ryc. 22. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL oraz ZnO LONG w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ w 5, 7 oraz 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Zielona fluorescencja wskazuje na obecność białka Bcl2 (Prot.). Czerwona fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym 7-AAD (NUC.), natomiast niebieska fluorescencja wskazuje obecność nanocząstki ZnO OVAL (NPs). Skala 100 μm .



Ryc. 23. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL oraz ZnO LONG w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ w 5, 7 oraz 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Zielona fluorescencja wskazuje na obecność aktywnej kaspazy-3 (CPP32) (Prot.). Czerwona fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym 7-AAD (NUC.), natomiast niebieska fluorescencja wskazuje obecność nanocząstki ZnO OVAL (NPs). Skala 100 μm .

4.2. Dyskusja wyników dla biodegradowalnych nanocząstek ZnO

W zarodkach kurcząt zaobserwowano silny wzrost stężenia cynku po podaniu nanocząstek ZnO OVAL w 3 dniu inkubacji, po czym nastąpił gwałtowny spadek w 4 dniu w stosunku do poziomu kontroli (Ryc. 12) dla dawki 10 $\mu\text{g/ml}$. Niższe stężenie cynku przy dawce 100 $\mu\text{g/ml}$ w 3 dniu inkubacji może być spowodowane zwiększoną agregacją nanocząstek, co wpływa na tempo ich penetracji do zarodka. Dla obu zastosowanych stężeń nanocząstek (10 i 100 $\mu\text{g/ml}$) poziomy cynku w zarodkach spadają do wartości kontrolnych

w 4 dniu inkubacji i w kolejnych dniach. Zjawisko to można tłumaczyć aktywacją mechanizmów usuwania nanocząstek w rozwijającym się organizmie zarodka, co zaskakujące, pokrywa się on z początkiem formowania się nerek oraz ich rozwojem funkcjonalnym w zarodkach kurcząt. Warto przy tym zauważyć, że wcześniejsze badania na modelach ssaczych wykazały dominującą rolę wątroby i żółci w recyrkulacji i usuwaniu nanocząstek z organizmu (Kielbik i in., 2017a). Może to sugerować, że u ptaków eliminacja nanocząstek zachodzi głównie przez nerki albo że jest to mechanizm specyficzny dla stadium zarodkowego. Bez względu na to, jest to nowe spostrzeżenie, które wymaga dalszych badań. Obserwacje te potwierdzają zdjęcia z mikroskopii konfokalnej, na których niebieska fluorescencja związana z nanocząstkami ZnO OVAL z czasem słabnie, choć wysokie ich stężenie utrzymuje się w nerkach (Ryc. 19). Ponadto obrazowanie konfokalne (Ryc. 19 i 20) wykazało różnice w przepuszczalności nanocząstek do tkanek embrionalnych przy ich różnych stężeniach. Niższe stężenie ZnO OVAL (10 µg/ml) szybciej penetrowało tkanki embrionalne, co najprawdopodobniej wiąże się z ich mniejszą agregacją niż przy stężeniu 100 µg/ml. Zbyt duże agregaty uniemożliwiały nanocząstkom przekroczenie błon komórkowych oraz barier tkankowych (nierównomierny rozkład nanocząstek przy 100 µg/ml i duże stężenie nanocząstek w tkankach otaczających naczynie krwionośne – Ryc. 19, V). Wpływ stężenia na agregację nanocząstek obserwowano również w innych badaniach (Singh i in., 2019).

Porównując wyniki płomieniowej spektroskopii absorpcji atomowej (AAS) dla ZnO OVAL i ZnO LONG, można zauważyć przesunięcie we wzroście stężenia cynku w zarodkach oraz późniejszym spadku poziomu Zn odpowiednio, 4 i 6 dzień inkubacji dla ZnO LONG. Może to wskazywać, że nanocząstki o wydłużonym kształcie mają mniejszą zdolność migracji w obrębie jaja – zarówno do embrionu, jak i wyjścia z niego. Ponadto relatywnie niższa wartość potencjału zeta może wpływać na dyspersję tych nanocząstek w przeważnie negatywnie naładowanym środowisku jaja. Znaczenie kształtu i struktury nanocząstek ZnO dla ich właściwości biologicznych ilustruje test żywotności komórek, w którym ZnO LONG wykazał większą toksyczność wobec pierwotnych fibroblastów embrionalnych kurczaka (CEF) – obserwowano wartość CD50 równą 0,001 mg/ml, wobec 0,01 mg/ml w przypadku ZnO OVAL. Jednakże wyniki te nie zostały potwierdzone w eksperymentach *in ovo*, gdzie nie stwierdzono wpływu nanocząstek na przeżywalność zarodków, co prawdopodobnie wynika z ich niższej penetracji do zarodka i dodatkowo

wskazuje na różne, zależne od kształtu zachowanie nanomateriałów w materiałach biologicznych i tkankach.

Wyniki pomiarów stężenia cynku w białku jaja nie wykazały odchyłeń względem kontroli ani istotnych różnic statystycznych, a zmierzone stężenia cynku nie przekroczyły 5 mg/kg. W porównaniu ze średnią zawartością cynku w białku jaja kurzego (~5 mg/kg), zastosowane dawki nanocząstek nie zmieniły ogólnego zasobu tego pierwiastka ani nie powinny znacząco wpłynąć na jego przemiany. W związku z tym nie oczekiwano ani nie wykazano zależności między spadkiem poziomu cynku w zarodkach a wynikami uzyskanymi dla białka jaja. Należy podkreślić, że analiza AAS dostarcza informacji wyłącznie o stężeniu cynku w badanej objętości/masie, a nie o jego postaci chemicznej. Oznacza to, że wyniki obejmują cynk zarówno w postaci nanocząstek, jak i jonów. Jednak jak wykazały zdjęcia z mikroskopu konfokalnego, obecność fluorescencji charakterystycznej dla nanocząstek wyraźnie wskazuje na obecność nanocząstek ZnO OVAL w większości tkanek embrionalnych (Ryc. 19 i 20). W badaniu na myszach, którym podano nanocząstki ZnO domieszkowane europem (Eu), organizm szybko regulował poziom cynku przez usuwanie nadmiaru, ale jednocześnie w próbkach histologicznych nadal widoczna była fluorescencja związana z nanocząstkami (Kielbik i in., 2017a). Porównanie wyników AAS z mikrofotografiami konfokalnymi wskazuje więc, że tkanki już na etapie rozwoju zarodkowego są w stanie regulować zawartość cynku niezależnie od jego formy (porównaj Ryc. 12, 19 i 20).

Jednym ze skutków zwiększonej zawartości cynku w tkankach jest wzrost poziomu ROS. Powstająca wówczas peroksydacja lipidów oraz gromadzenie się białek karbonylowanych wraz ze zmianami aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) mogą wskazywać na stres oksydacyjny i stanowić pierwszy sygnał reakcji organizmu na nanocząstki tlenków metali. Zaskakująco, w naszym badaniu jedynie wzrost poziomu białek karbonylowanych pokrywał się z podwyższonym stężeniem cynku w zarodku kury (Ryc. 14). Ogólnie rzecz biorąc, zarówno peroksydacja lipidów (uwidoczniona przez rosnące poziomy MDA – Ryc. 15), jak i poziomy białek karbonylowanych (Ryc. 14) stopniowo wzrastały od 7 do 10 dnia, co wspiera hipotezę, że podobnie jak w modelu mysim, same poziomy cynku mogą nie odzwierciedlać rzeczywistej akumulacji nanocząstek ZnO w tkankach.

Aktywność SOD jest jednym z markerów stresu oksydacyjnego, ponieważ enzymy z tej rodziny przekształcają anion rodnika nadadtlenkowego w nadtlenek wodoru (Surai i in., 2019). Porównanie aktywności SOD (Ryc.13) z wynikami AAS dla obu rodzajów nanocząstek ZnO wykazuje, że istotny wzrost aktywności SOD pokrywa się ze spadkiem poziomu cynku do wartości kontrolnych. Sugeruje to, że samo przemieszczanie się nanocząstek oraz związane z nim zapotrzebowanie energetyczne i transdukcja sygnału (potwierdzone wynikami mikromacierzy) mogą wywoływać większy stres oksydacyjny niż sama obecność nanocząstek ZnO w tkankach zarodka. Wczesny epizod stresu oksydacyjnego związany z większą dynamiką ruchu ZnO LONG i zawartością białek karbonylowanych wydaje się być równoważony silną odpowiedzią antyoksydacyjną, co obrazuje wyraźny wzrost aktywności SOD w 5 dniu inkubacji (Ryc. 13). Już do 6 dnia zarówno aktywność SOD, jak i poziom białek karbonylowanych wracają do wartości kontrolnych, co sugeruje skuteczną aktywację mechanizmów kompensacyjnych i wyrównanie zaburzeń oksydacyjnych.

Gen *COL6A2*, wybrany do dalszej analizy, koduje łańcuch $\alpha 2(VI)$ kolagenu VI (COL6), który stanowi istotny składnik strukturalny macierzy pozakomórkowej i jest silnie ekspresjonowany w mózgu (Gregorio i in., 2018). Wykazano, że COL6 odgrywa ważną rolę w ośrodkowym układzie nerwowym – jego niedobór prowadzi do zaburzonej regulacji autofagii, zwiększonej podatności na stres oksydacyjny oraz spontanicznej apoptozy neuronów (Cescon i in., 2016). W 5 dniu po podaniu nanocząstek ZnO LONG zaobserwowano statystycznie istotny spadek ekspresji genu *COL6A2* w porównaniu do kontroli (Ryc. 18), co może wskazywać na wczesne zaburzenie integralności macierzy pozakomórkowej związanego ze stresem oksydacyjnym. Jednocześnie od 6 dnia po podaniu zaobserwowano tendencję wzrostu poziomu MDA (Ryc. 15) oraz odpowiadającą temu tendencję zwiększonej akumulacji białek karbonylowanych (Ryc. 14), co może sugerować postępującą akumulację uszkodzeń peroksydacyjnych.

Gen *SDHA* koduje główną podjednostkę katalityczną enzymu dehydrogenazy bursztynianowej (Bardella, Pollard, Tomlinson, 2011). Chociaż obniżenie ekspresji genu *SDHA* obserwowane w 4 dniu inkubacji nie było statystycznie istotne, odzwierciedlało subtelną, acz konsekwentną tendencję (Ryc. 18), potencjalnie wskazującą na wczesne zaburzenie funkcji mitochondriów i wzrost produkcji ROS (Hadrava Vanova i in., 2020). Inne badania wykazały korelację między obniżeniem ekspresji jednej z podjednostek SDH a wzrostem aktywności SOD (Yao i in., 2018). W naszym badaniu zmniejszenie ekspresji

genu *SDHA* zbiega się w czasie z wyraźnym wzrostem aktywności SOD w 5 dniu (Ryc. 13), zwłaszcza w zarodkach traktowanych ZnO OVAL. Oba testowane stężenia nanocząstek wywołały porównywalny wzrost aktywności SOD, co sugeruje, że nawet niskie stężenia nanocząstek ZnO mogą uruchamiać mechanizmy obronne antyoksydacyjne. Czas wystąpienia tej reakcji antyoksydacyjnej może odzwierciedlać wczesną odpowiedź komórek na podwyższony poziom ROS (Guo i in., 2013), prawdopodobnie wywołany ekspozycją na nanocząstki podczas wrażliwych faz rozwoju embrionalnego.

Gen *PSMB7* koduje β -podjednostkę 7 rdzenia proteasomu 20S, odpowiedzialną za aktywność proteolityczną podczas degradacji uszkodzonych, nieprawidłowo pofałdowanych lub niefunkcyjnych białek. Utrzymanie homeostazy białkowej, zwłaszcza w reakcji na uszkodzenia oksydacyjne, w dużej mierze zależy od układu proteasomowego, który odgrywa kluczową rolę w rozpoznawaniu i eliminacji białek dysfunkcyjnych (Basler i Groettrup, 2021). W obecnym badaniu zaobserwowano tendencję wzrostu ekspresji genu *PSMB7* w 4 dniu po podaniu zarówno nanocząstek ZnO OVAL, jak i ZnO LONG (Ryc. 18). Choć ta tendencja nie była statystycznie istotna, może odzwierciedlać wczesną odpowiedź proteasomalną na wzrost poziomu uszkodzonych białek, co sugeruje akumulacja białek karbonylowanych, zwłaszcza w zarodkach eksponowanych na ZnO OVAL (Ryc. 14). Związany ze stresem oksydacyjnym wzrost karbonylacji białek wskazuje na trwające uszkodzenia peroksydacyjne, które mogą wymagać zwiększonej aktywności proteolitycznej z udziałem ścieżki ubikwityna–proteasom.

Peroksydacja lipidów jest markerem stresu oksydacyjnego, który może znacząco wpływać na rozwijający się zarodek (Schaur i in., 2015). W badaniach zaobserwowano, że wzrost poziomu MDA, jest bardziej charakterystyczny dla ekspozycji na ZnO OVAL niż na ZnO LONG (Ryc. 15). Może to sugerować, zwłaszcza w powiązaniu z wynikami z AAS i analizy mikromacierzy, że transport nanocząstek ZnO przez błony komórkowe przyczynia się bezpośrednio lub pośrednio do nasilonej peroksydacji lipidów.

Różnice w markerach stresu oksydacyjnego obserwowane pomiędzy ZnO OVAL a ZnO LONG (Ryc. 13-15) oraz różnice w ich wpływie na ekspresję genów (Ryc. 17-18) wskazują na silny związek między kształtem nanocząstek a ich oddziaływaniem na organizm – aspekt ten bywa często pomijany w badaniach. Udowodniliśmy, że kształt nanocząstek ZnO ma znacznie większy wpływ na czas pojawienia się i dynamikę

uszkodzeń oksydacyjnych w rozwijającym się zarodku niż dziesięciokrotne zwiększenie ich stężenia. Co więcej, wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek zwiększa się ich agregacja, co potwierdzają rozbieżności między rozmiarami uzyskanymi metodami SEM, pomiarem średnicy hydrodynamicznej (Ryc.7 i Tab. 1). Wyraźna różnica w przepuszczalności tkanek przy różnych stężeniach nanocząstek ZnO OVAL została zobrazowana na mikrofotografiach konfokalnych (Ryc. 19-20). Przy wyższej dawce nanocząstki mogą łatwiej tworzyć większe agregaty, co utrudnia ich penetrację do tkanek i komórek. Dodatkowo metoda AAS może fałszywie zawyżać zmierzone stężenia cynku (nanocząstek) w tkankach przy wysokich stężeniach nanocząstek, ponieważ nie rozróżnia nanocząstek znajdujących się wewnątrz komórek od tych w krążeniu lub luźno związanych z erytrocytami.

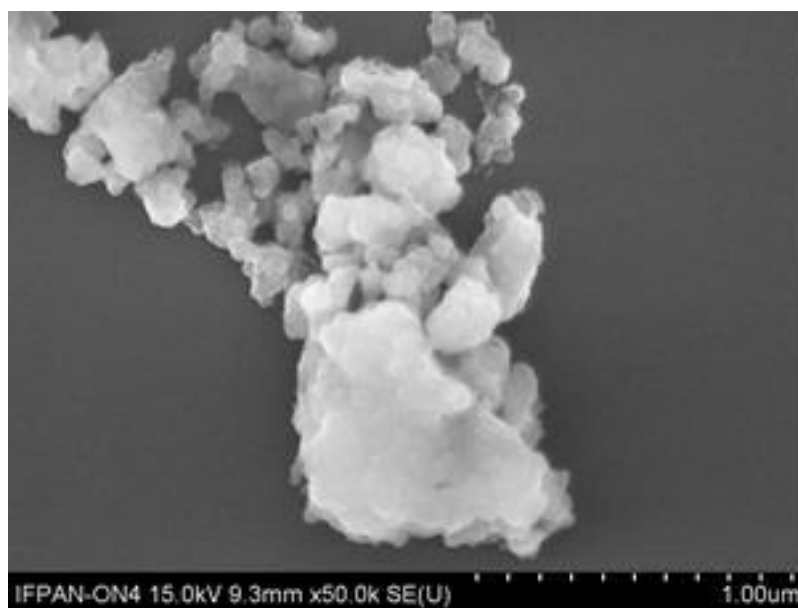
Ogólne zmiany na poziomie genomowym ujawnione w wynikach badania mikromacierzy był oszałamiający. Zmiany ekspresji 1487 zidentyfikowanych genów (w tym 1108 przypisanych do określonych ścieżek biologicznych) dla ZnO OVAL oraz 548 genów (w tym 358 przypisanych do ścieżek) dla ZnO LONG wskazują nie tylko na silną zależność od kształtu zastosowanych nanocząstek, ale przede wszystkim na istotny wpływ ekspozycji na nanocząstki ZnO na rozwijający się zarodek. Było to zaskakujące, ponieważ wstępne badania na hodowli komórek Caco-2, odzwierciedlającej funkcjonalny nabłonek jelitowy, nie wykazały żadnych zmian w ekspresji genów po ekspozycji na nanocząstki tlenków (dane niepublikowane, zgłoszenie patentowe w toku). Badania nad konkretnymi szlakami zmieniającymi się po podaniu nanocząstek trwają obecnie, jednymi ze szlaków potencjalnie interesujących, a zmieniających się pod wpływem ZnO OVAL są szlaki kinazy tyrozynowej i szlaki transbłonowego transportu żelaza. W jednym z badań na modelu *Danio rerio*, w którym porównano zmiany w ekspresji genów po podaniu nanocząstek ZnO oraz jonów Zn^{2+} w postaci $ZnSO_4$, stwierdzono większy zakres zmian dla $ZnSO_4$ niż dla nanocząstek (Kim i in., 2017). Uzyskane wyniki sugerują, że kształt nanocząstek wywiera większy wpływ niż same jony Zn^{2+} , co podkreśla konieczność dalszych badań nad embriotoksycznością nanocząstek oraz ich bezpieczeństwem. Co warto podkreślić, dla obu stężeń i kształtów nanocząstek, nie zaobserwowano znaczącego ich wpływu na przeżywalność zarodków, ani zmian w obrazowaniu histopatologicznym (Ryc. 51 i 52). Może to sugerować, że obserwowane zmiany na poziomie genetycznym, jak i późniejsza odpowiedź na stres oksydacyjny, jest w pełni kompensowalna przez zarodek.

Na podstawie wyników z oznaczeń immunohistochemicznych możliwe jest zaobserwowanie, że nanocząstki ZnO LONG po porównaniu do CTRL wykazują podobny schemat zmian w zawartości białek Bax, Bcl2 oraz aktywnej kaspazy-3. Ciekawe jest również, że ekspozycja na ZnO OVAL powoduje wyraźne zmiany w profilu białek regulujących apoptozę – obserwowano spadek poziomu proapoptotycznego białka Bax, i aktywnej kaspazy-3 (jednej z głównych kaspaz wykonawczych apoptozy (Silva i in., 2022), Ryc. 21 i 23), a obserwowano wzrost intensywności fluorescencji związanej z jednym z podstawowych białek antyapoptotycznych – Bcl2 (Ryc. 22). Podczas porównania tych wyników ze spadkiem poziomu interleukiny-2 (IL-2, Ryc. 23) dla ZnO OVAL, jednej z cytokin zaangażowanych w regulację szlaków receptorowych apoptozy (AICD – z ang. activation-induced cell death) związanych z Fas, Fas-L i kaspazą-8, wydaje się, że obecność nanocząstek ZnO OVAL sprzyjać może wywierając działanie antyapoptotyczne w tkankach. Nie zaobserwowano też korelacji pomiędzy stężeniem IL-2 i białkiem Bcl2 w tkankach w dniu 5 dla ZnO OVAL i dniu 7 dla ZnO LONG, wskazywaną przez poprzednie badania *in-vitro* (Akbar i in., 1996). Sugeruje to, że zmiany poziomu Bcl2 w tkankach mogą być związane z innymi szlakami programowanej śmierci komórki (np. szlakiem mitochondrialnym) (Hoetelmans i in., 2000). O ile wyniki mikroskopowe i Elisa są interesujące i dostarczają potencjalnie ciekawych danych lokalizacyjnych wymagać będą jeszcze potwierdzenia innymi metodami, np. Western Blot. Wyniki z oceny histopatologicznej nie wykazały zmian w zarodkach traktowanych nanocząstkami ZnO w porównaniu do CTRL (Ryc. 51 i 52).

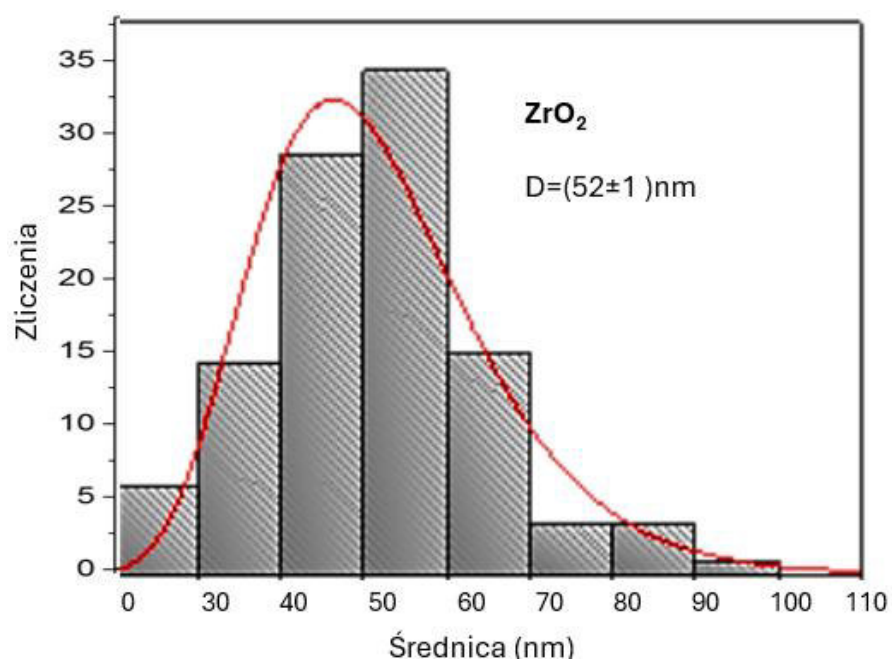
4.3. Wyniki dla nanocząstek ZrO₂

4.3.1. Charakterystyka morfologiczna nanocząstek ZrO₂ metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)

Nanocząstki ZrO₂ (Ryc. 24) tworzą skupiska ziaren o sferycznym kształcie (o średnim rozmiarze 52 nm). Widoczne są zwarte skupienia cząstek tworzące agregaty. Mimo tego pozostają one względnie jednorodne pod względem kształtu i rozmiaru, co zostało przedstawione na histogramie z rozkładem wielkości tych nanocząstek (Ryc. 25).



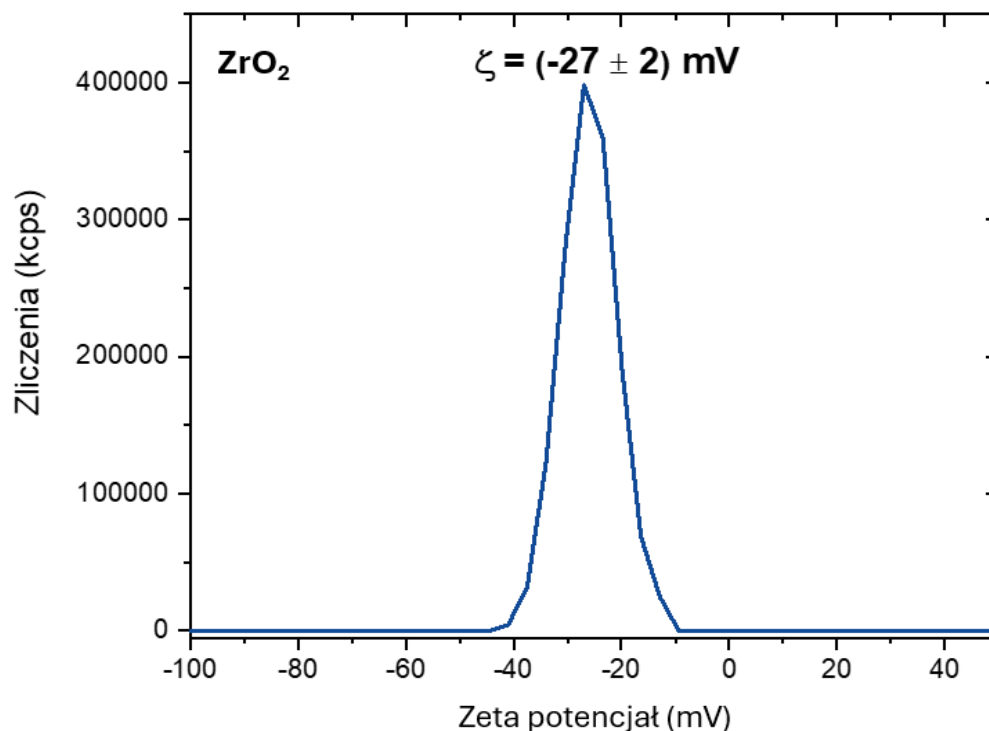
Ryc. 24. Mikrofotografie SEM przedstawiająca nanocząstki ZrO_2 .



Ryc. 25. Histogram rozkładu wielkości z dopasowanymi krzywymi rozkładu log-normalnego dla wymiarów nanocząstek ZrO_2 na podstawie analizy obrazów SEM.

4.3.2. Wyniki pomiaru potencjału zeta

Potencjał zeta nanocząstek ZrO_2 wynosił około -27 mV, (Ryc.26), co świadczy o ich względnie dobrej stabilności w roztworze.



Ryc. 26. Rozkład potencjału zeta nanocząstek ZrO_2 .

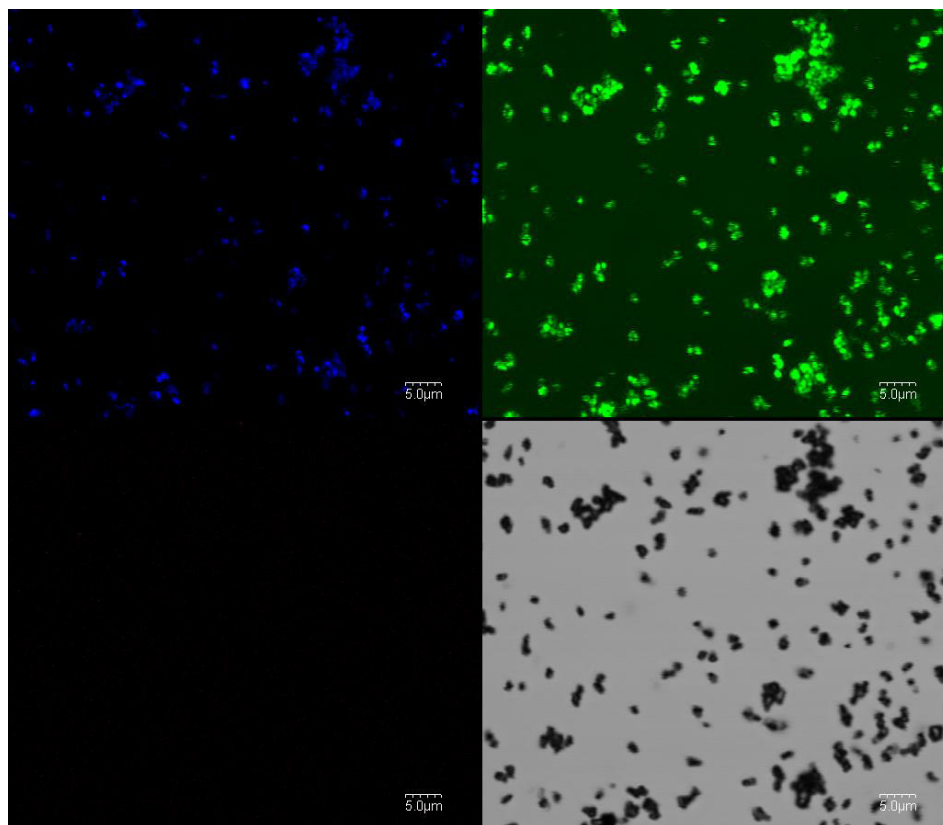
W tabeli 3 przedstawiono średni rozmiar hydrodynamiczny nanocząstek ZrO_2 . Był on wyższy niż bezwzględne pomiary średnicy nanocząstek, w związku z ich tendencją do tworzenia agregatów.

Tabela 3. Średni rozmiar hydrodynamiczny wraz z odchyleniem standardowym oraz indeks polidispersyjności (PDI) nanocząstek ZrO_2 zmierzony w 25 °C.

Nanocząstka	Średni rozmiar (nm) $\pm$ SD	PDI
ZrO_2	471 $\pm$ 5	0,2

Podobnie jak dla nanocząstek ZnO OVAL nanocząstki ZrO_2 domieszkowane były metalami ziem rzadkich w celu zwiększenia ich właściwości luminescencyjnych. Zastosowano w tym przypadku 0,5% dodatek jonów Tb stabilizowane 3% dodatkiem Y.

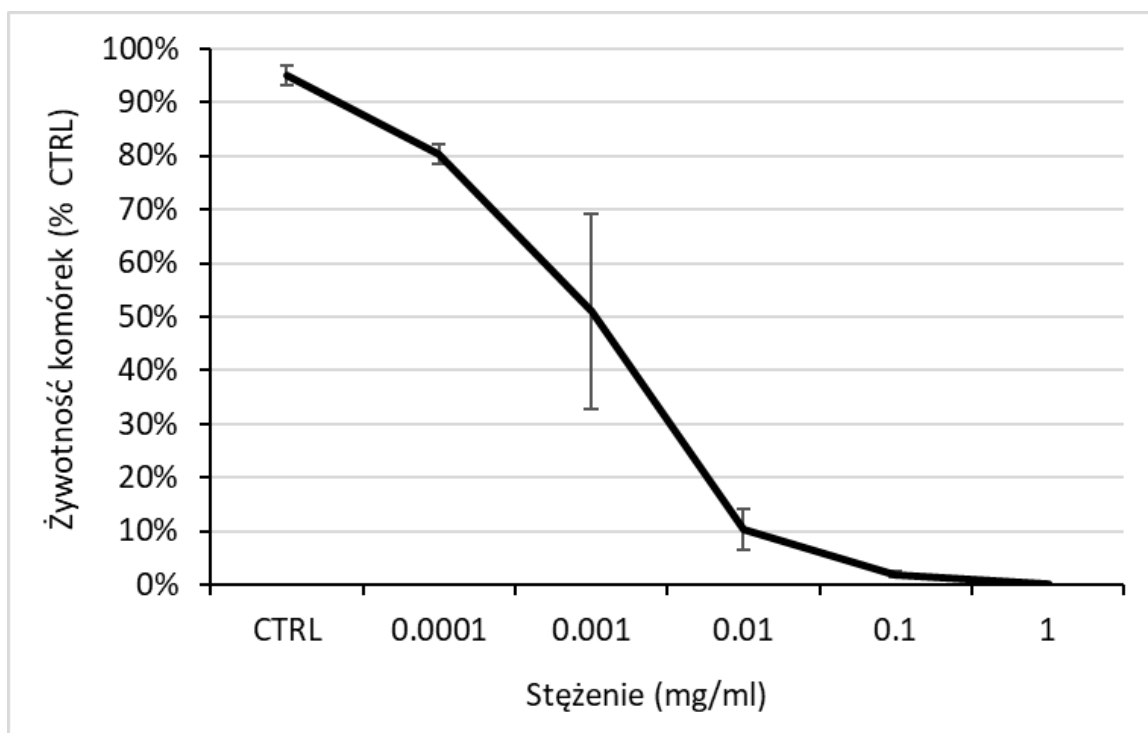
Obrazowanie mikroskopowe (Ryc. 27.) pokazało, że nanocząstki ZrO_2 domieszkowane Tb mają podstawowy zakres świecenia w zakresie 505-525 nm przy wzbudzeniu 488 nm, co jest charakterystycznym pasmem świecenia dla terbu. Ponadto, duże agregaty nanocząstek wykazywały świecenie w paśmie 430-450 nm przy wzbudzeniu 405 nm, co jest związane najprawdopodobniej z przejściowymi stanami powierzchniowymi.



Ryc. 27. Obrazy mikroskopii konfokalnej nanocząstek ZrO_2 zdyspergowanych w wodzie, przedstawiające emisję fluorescencji przy 430–450 nm (wzbudzenie 405 nm), 505–525 nm (wzbudzenie 488 nm) oraz 560 IF (wzbudzenie 543 nm). Powiększenie obiektywu 40×, zoom cyfrowy 5×. Skala 5 μm.

4.3.3. Oznaczanie żywotności komórek

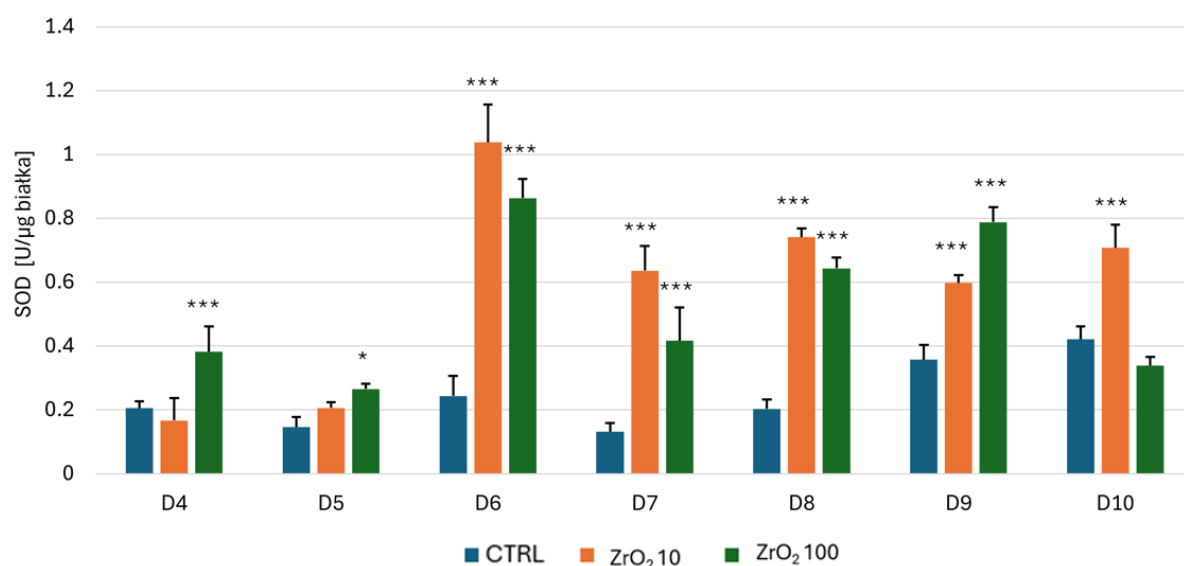
Test żywotności komórek wykazał, że po inkubacji z nanocząstkami ZrO_2 żywotność CEF obniżyła się do 50% przy stężeniu 0,001 mg/ml (Ryc. 28), natomiast już przy stężeniu 0,01 mg/ml żywotność CEF spadała do 10%.



Ryc. 28. Żywotność pierwotnych fibroblastów zarodków kurzych (CEFs) wyrażona jako % żywych komórek 24 h po podaniu nanocząstek ZrO_2 w różnych stężeniach. W przypadku grupy kontrolnej (CTRL) do pożywki hodowlanej dodano odpowiednią objętość PBS.

4.3.4. Aktywność SOD po podaniu nanocząstek ZrO_2

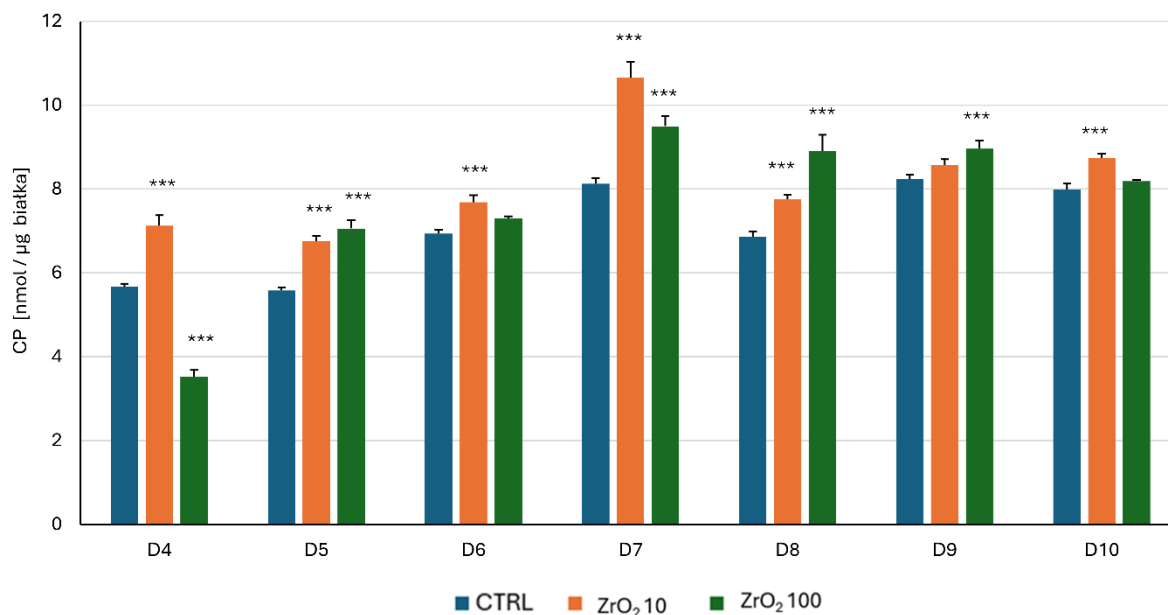
Aktywność SOD (Ryc. 29) była istotnie wyższa w dniu 4 ($p < 0,001$) i 5 ($p < 0,05$) stosunku do CTRL jedynie przy zastosowaniu stężenia 100 $\mu\text{g/ml}$ nanocząstek ZrO_2 . Natomiast od 6 do 9 dnia zastosowanie zarówno niższego (10 $\mu\text{g/ml}$), jak i wyższego (100 $\mu\text{g/ml}$) stężenia skutkowało wysoce istotnie zwiększoną aktywnością SOD w porównaniu z CTRL. W 6, 7 i 8 dniu aktywność enzymu była wyższa po podaniu dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ w stosunku do zastosowaniu dawki 100 $\mu\text{g/ml}$. Odwrotna zależność wystąpiła w 9 dniu, kiedy to większe wartości, świadczące o aktywności enzymatycznej uzyskano dla dawki 100 $\mu\text{g/ml}$. W 10 dniu wysoce istotny wzrost aktywności SOD względem CTRL stwierdzono wyłącznie w próbach traktowanych nanocząstkami ZrO_2 w dawce 10 $\mu\text{g/ml}$.



Ryc. 29. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ (ZrO_2 10) lub 100 $\mu\text{g/ml}$ (ZrO_2 100) nanocząstek ZrO_2 . 1U – ilość ekstraktu enzymatycznego powodująca 50% inhibicję tworzenia formazanu. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

4.3.5. Zawartość białek karbonylowanych po podaniu nanocząstek ZrO_2

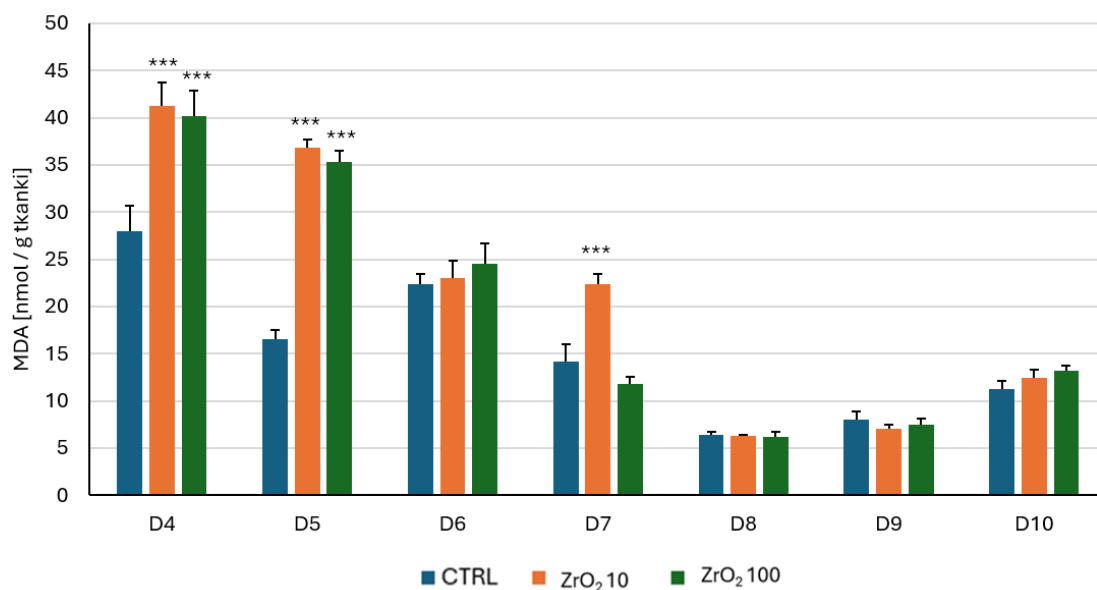
Wysoce istotne zmiany ($p < 0,001$) w zawartości białek karbonylowanych po podaniu nanocząstek ZrO_2 obserwowano w zarodkach od 4 do 10 dnia inkubacji (Ryc. 30). W 4 dniu po zastosowaniu nanocząstek w niższym stężeniu (10 $\mu\text{g/ml}$) odnotowano istotny wzrost zawartości białek karbonylowanych. Wyższe stężenie nanocząstek ZrO_2 (100 $\mu\text{g/ml}$) prowadziło w tym dniu do istotnego obniżenia poziomu białek karbonylowanych. W pozostałych dniach poziom białek karbonylowanych wzrastał istotnie dla obu dawek nanocząstek, z wyjątkiem dni 6 i 10 dla dawki 100 $\mu\text{g/ml}$, gdzie zaobserwowany wzrost stężenia nie był istotny statystycznie i dnia 9, gdy nieistotnie statystyczny wzrost obserwowano dla stężenia 10 $\mu\text{g/ml}$.



Ryc. 30. Zawartość białek karbonylowanych (CP) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki 10 µg/ml (ZrO₂ 10) lub 100 µg/ml (ZrO₂ 100) nanocząstek ZrO₂. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; *** p<0,001.

4.3.6. Zawartość MDA po podaniu nanocząstek ZrO₂

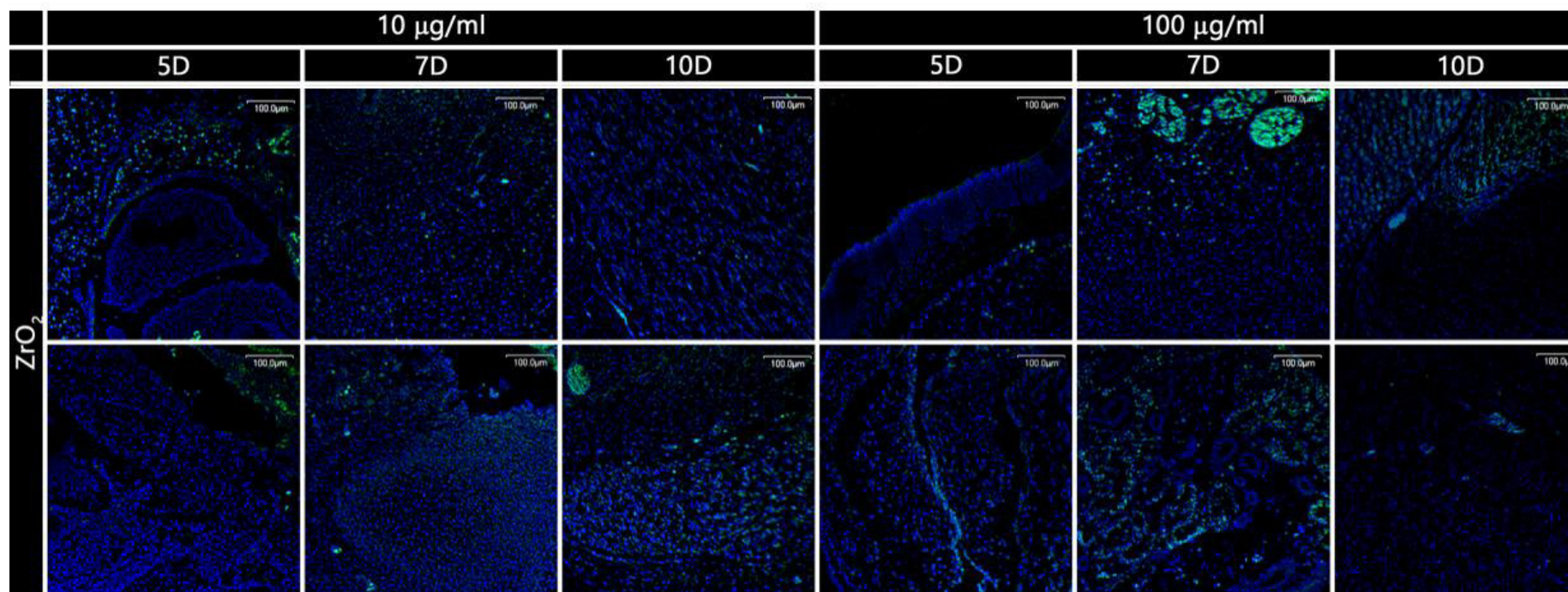
Największe wysoce istotne statystycznie zmiany zawartości MDA obserwowano na początku rozwoju zarodków (Ryc.31). Dnia 4 i 5, były one obserwowane niezależnie od zastosowanego stężenia nanocząstek. Wyższą zawartość MDA w stosunku do zarodków kontrolnych odnotowano dnia 7 tylko po zastosowaniu stężenia 10 µg/ml nanocząstek ZrO₂. W pozostałych punktach czasowych (dzień 5, 8, 9 i 10) stężenie MDA było podobne do oznaczonego w próbach kontrolnych, a dnia 8 i 9 najniższe z obserwowanych w badanych próbach.



Ryc. 31. Zawartość dialdehydu malonowego (MDA) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki 10 µg/ml (ZrO₂ 10) lub 100 µg/ml (ZrO₂ 100) nanocząstek ZrO₂. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; *** p<0,001.

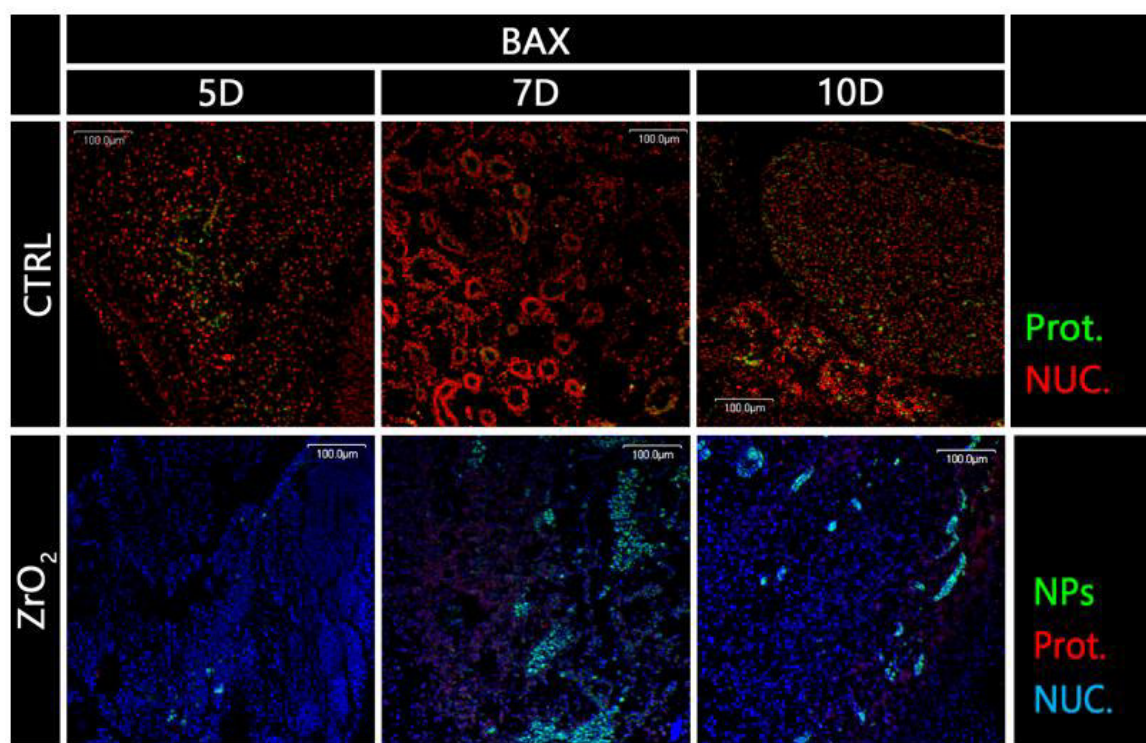
4.3.7. Mikroskopia konfokalna

Na zdjęciach z mikroskopii konfokalnej (Ryc. 32) możemy zaobserwować zmiany w dystrybucji nanocząstek ZrO₂ zależne od dawki oraz od dnia inkubacji. W przypadku dawki 10 µg/ml widoczna jest obecność nanocząstek już 5 dnia inkubacji. Podczas gdy dla dawki 100 µg/ml obecność nanocząstek widoczna jest od dnia 7. W przeciwieństwie do nanocząstek ZnO OVAL widoczne są też różnice w lokalnej dystrybucji nanocząstek ZrO₂. Dla preparatów z dnia 7 dla dawki 100 widoczne jest wysokie nagromadzenie nanocząstek w nerkach.

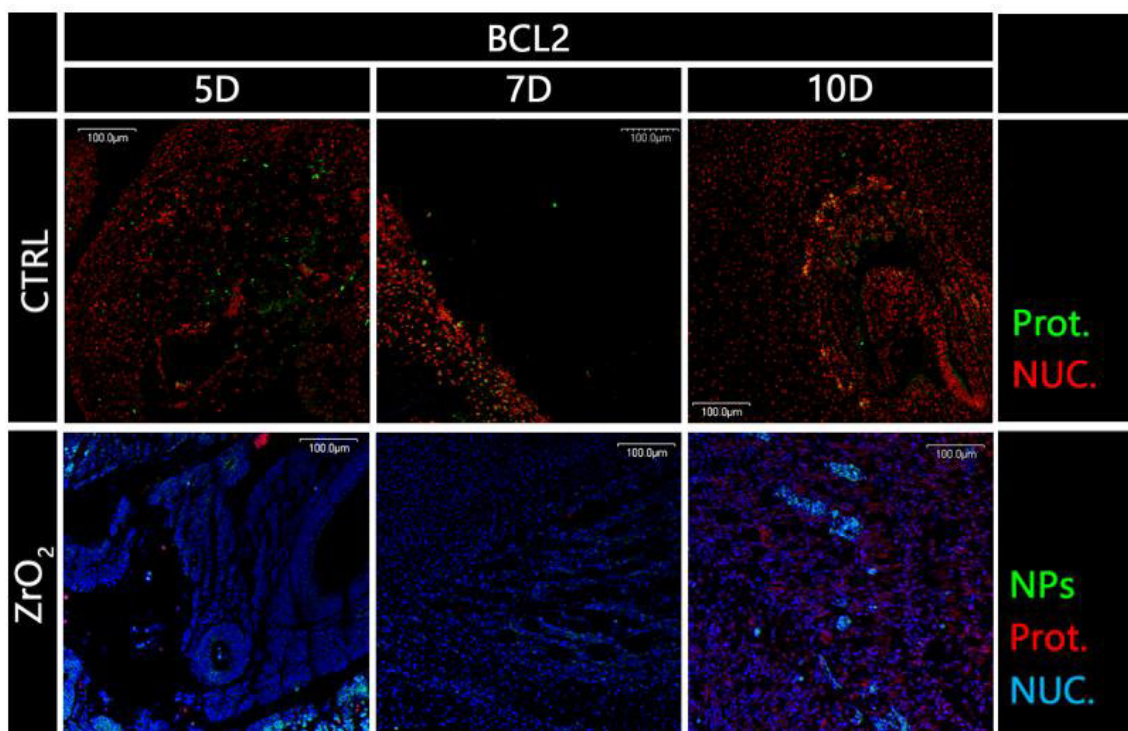


Ryc. 32. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZrO_2 w stężeniach 10 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, natomiast zielona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek ZrO_2 . Skala 100 μm .

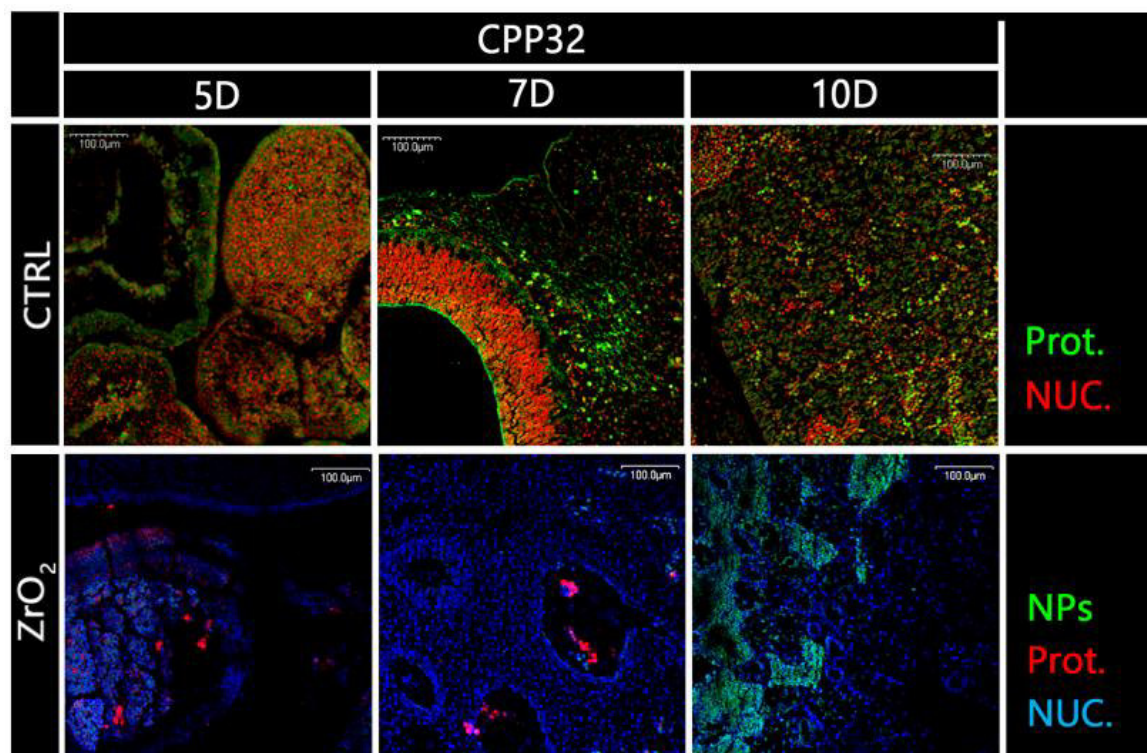
Po zastosowaniu znakowania immunohistochemicznego dla białek Bax, Bcl2 oraz aktywnej kaspazy-3 (CPP32) możliwa była obserwacja zwiększonej zawartości białka Bax w dniu 7 i 10 po podaniu nanocząstek ZrO_2 , natomiast w dniu 5 była ona zbliżona do CTRL (Ryc. 33). Wyniki dla zawartości Bcl2 (Ryc. 34) nie odbiegały od kontroli. Z kolei poziom aktywnej kaspazy-3 we wszystkich dniach był porównywalny, lub nieznacznie niższy niż w CTRL (Ryc. 35).



Ryc. 33. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZrO_2 w stężeniach 10 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Dla zdjęć, gdzie z CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko Bax zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu ZrO_2 - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, czerwona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bax, natomiast zielona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek ZrO_2 . NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala 100 μm .



Ryc. 34. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZrO₂ w stężeniach 10 μg/ml i 100 μg/ml w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20×. Dla zdjęć, gdzie z CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko Bcl2 zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu ZrO₂ - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, czerwona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bax, natomiast zielona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek ZrO₂. NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala 100 μm.

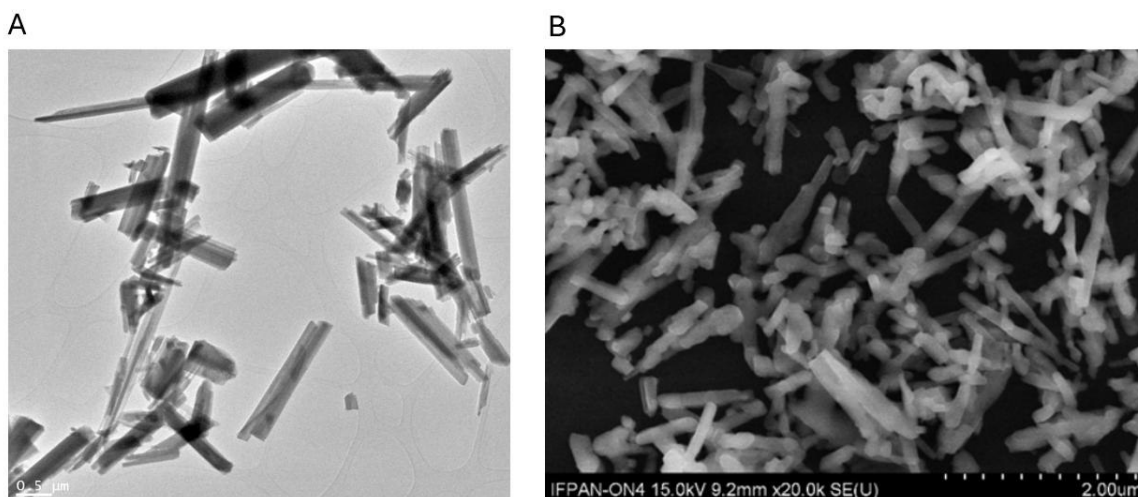


Ryc. 35. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZrO₂ w stężeniach 10 μg/ml i 100 μg/ml w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20×. Dla zdjęć, gdzie z CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko CPP32 zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu ZrO₂ - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, czerwona fluorescencja związana jest z obecnością białka CPP32, natomiast zielona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek ZrO₂. NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala 100 μm.

4.4. Wyniki dla nanocząstek Y₂O₃

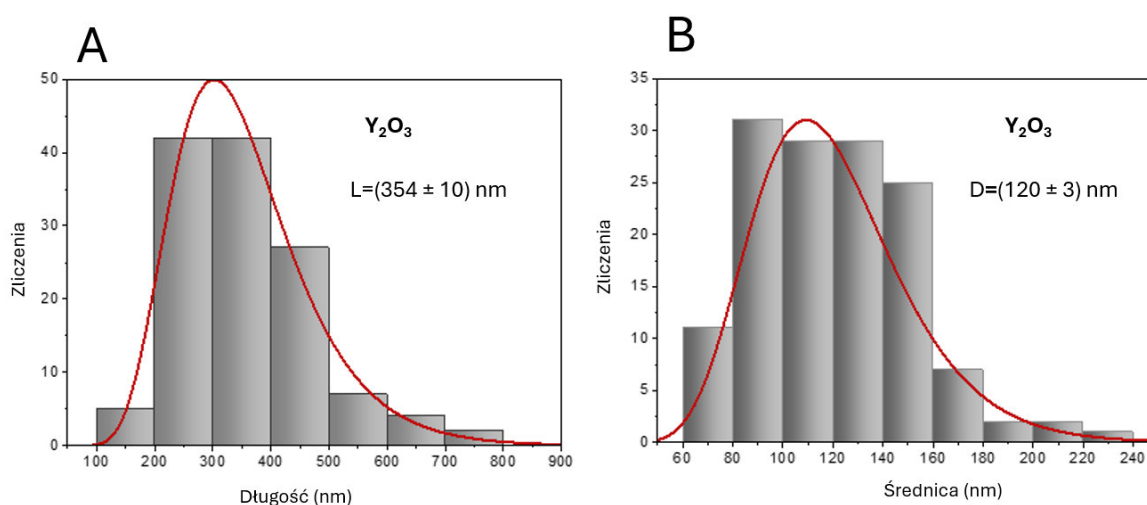
4.4.1. Charakterystyka morfologiczna nanocząstek Y₂O₃ metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)

Nanocząstki Y₂O₃ wykorzystane do badań wykazują morfologię wydłużonych i smukłych igieł o stosunkowo ostrych końcach (Ryc. 36). By wzmocnić efekt ich fluorescencji zostały one domieszkowane jonami Eu oraz poddane procesowi kalcynacji w celu rekrytalizacji domen luminescencyjnych (Kaszewski i in., 2016). Niestety efektem ubocznym kalcynacji było skrócenie długości nanocząstek, co widać po porównaniu zdjęć przed kalcynacją oraz po (Ryc. 36. porównaj A i B).



Ryc. 36. Mikrofotografie SEM nanocząstek Y_2O_3 niekalcynowane (A), po kalcynacji (B).

Średni rozmiar nanocząstek Y_2O_3 do badań biologicznych wyniósł: długość 354 nm, szerokość 120 nm (Ryc. 37).

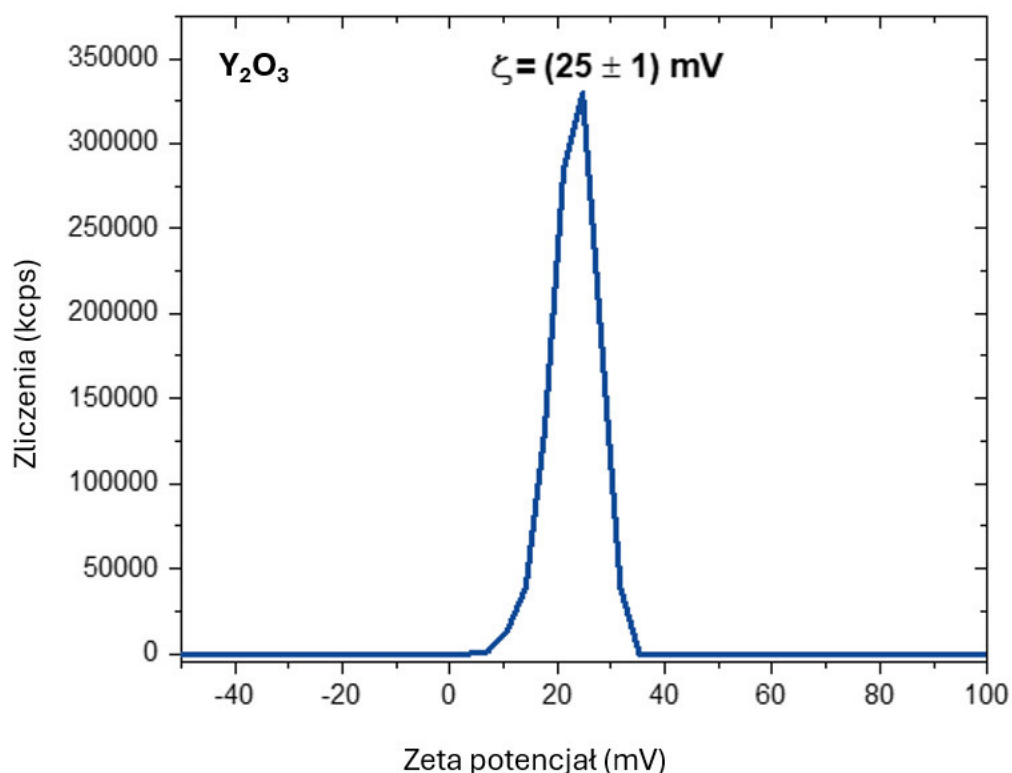


Ryc. 37. Histogram rozkładu wielkości z dopasowanymi krzywymi rozkładu log-normalnego dla wymiarów nanocząstek Y_2O_3 na podstawie analizy obrazów SEM.

4.4.2. Wyniki pomiarów potencjału zeta

Potencjał zeta nanocząstek dla Y_2O_3 wynosił około 25 mV (Ryc.38), taka wartość świadczy o ich względnie dobrej stabilności w roztworze. Ich dobra dyspersyjność jest widoczna również w wynikach średniej średnicy hydrodynamicznej (Tab. 4), która nie

różni się w znacznym stopniu od rozmiarów widocznych z pomiarów SEM (porównaj Ryc. 37. i Tab. 4).

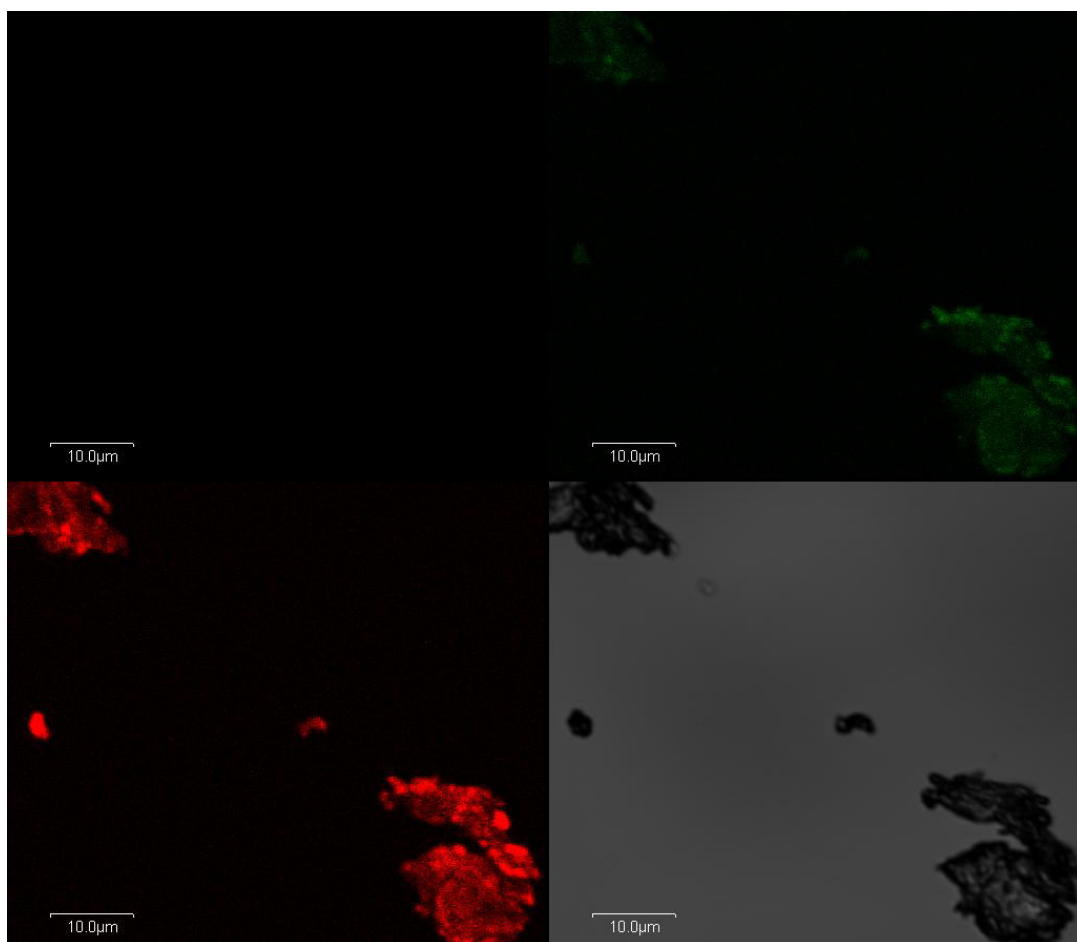


Ryc. 38. Rozkład potencjału zeta nanocząstek Y_2O_3 .

Tabela 4. Średni rozmiar hydrodynamiczny wraz z odchyleniem standardowym oraz indeks polidispersyjności (PDI) nanocząstek Y_2O_3 mierzony w 25 °C.

Nanocząstka	Średni rozmiar (nm) $\pm$ SD	PDI
Y_2O_3	$363,5 \pm 2$	0,6

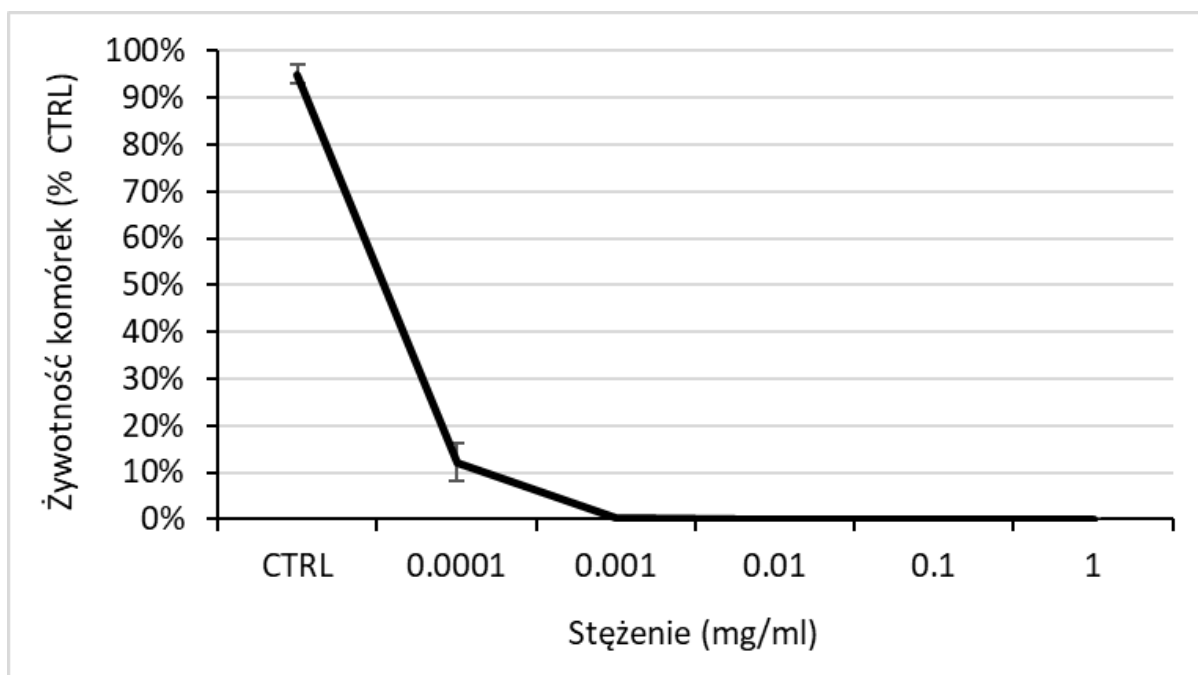
Na skutek domieszkowania Eu (0,5 %mol) w strukturze krystalicznej nanocząstek Y_2O_3 możliwe jest obserwowanie dominującej czerwonej fluorescencji pochodzącej z matrycy nanocząstek po wzbudzeniu laserem o długości fali 543 nm (Ryc. 39). Dodatkowo widoczna jest śladowa fluorescencja zielona przy wzbudzeniu wiązką o długości 488 nm. Fluorescencja w zakresie zielonym dotyczy wyłącznie dużych agregatów nanocząstek i nie była obserwowana w tkankach zarodka (Ryc. 45.).



Ryc. 39. Obrazy mikroskopii konfokalnej nanocząstek Y_2O_3 zdyspergowanych w wodzie, przedstawiające emisję fluorescencji przy 430–450 nm (wzbudzenia 405 nm), 505–525 nm (wzbudzenia 488 nm) oraz 560 IF (wzbudzenia 543 nm). Powiększenie obiektywu 40×, zoom cyfrowy 5×. Skala 10 μm.

4.4.3. Oznaczanie żywotności komórek

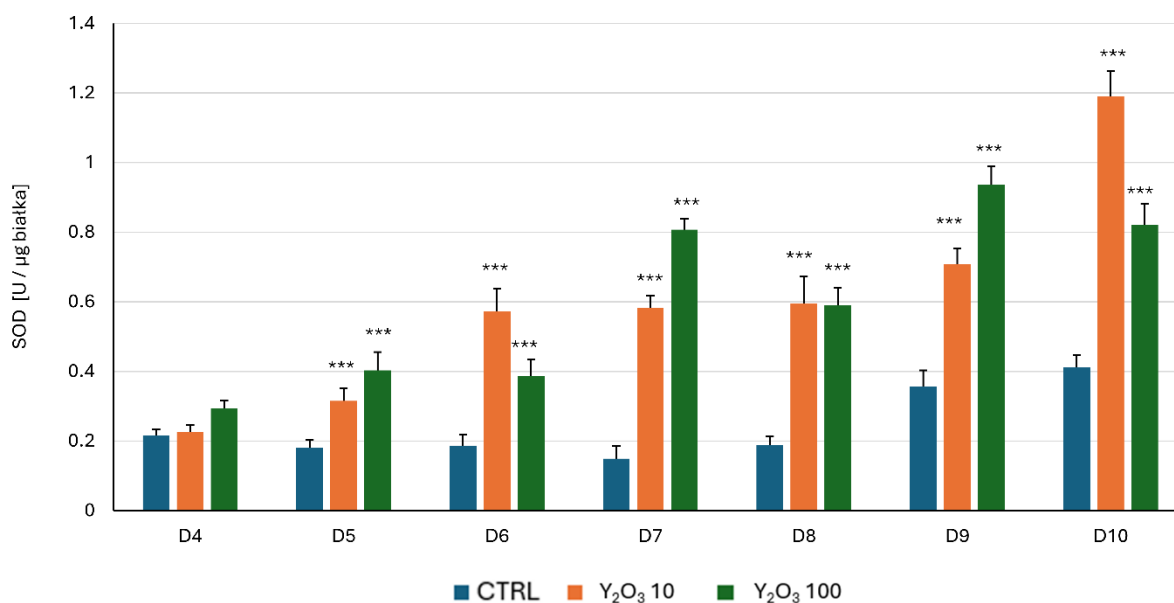
Test żywotności komórek wykazał, że po inkubacji z nanocząstkami Y_2O_3 w najniższym badanym stężeniu 0,0001 mg/ml żywotność CEF obniżyła się do 10% (Ryc. 40). Zastosowanie wyższego stężenia 0,001 mg/ml powodował 100% śmiertelność CEF. Pomimo tak wysokiej cytotoksyczności w komórkach CEFs, nie obserwowano zmian w zamieralności zarodków względem kontroli.



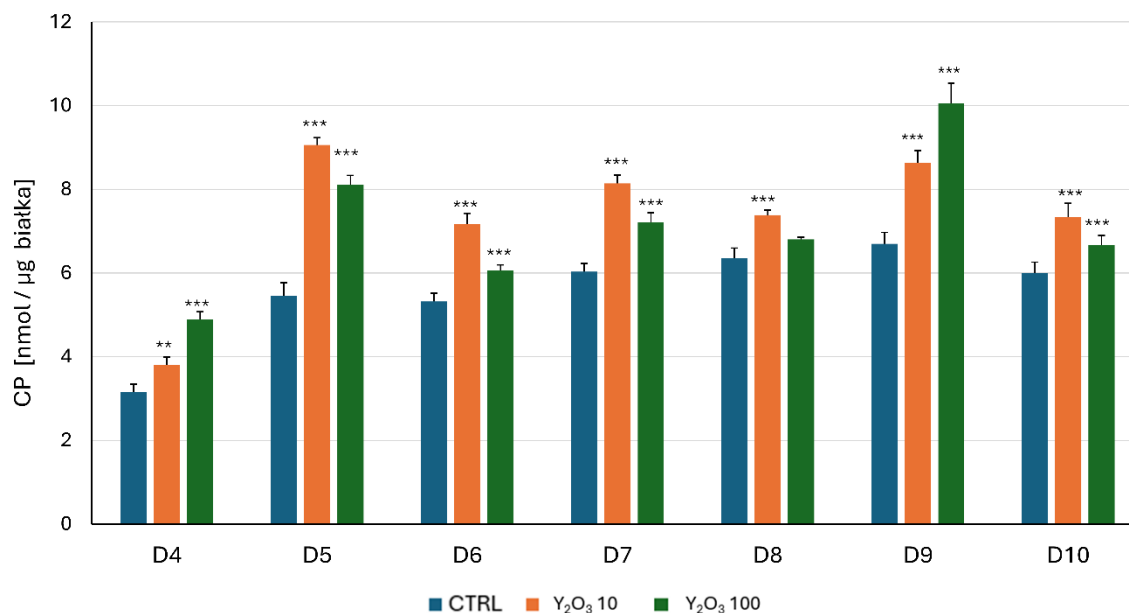
Ryc. 40. Żywotność pierwotnych fibroblastów zarodków kurzych (CEFs) wyrażona jako % żywych komórek 24 h po podaniu Y_2O_3 w różnych stężeniach. W przypadku grupy kontrolnej (CTRL) do pożywki hodowlanej dodano odpowiednią objętość PBS.

4.4.4. Aktywność SOD po podaniu nanocząstek Y_2O_3

Wysoce istotny wzrost aktywności SOD był widoczny w zarodkach od 4-5 do 10 dnia rozwoju. Niezależnie od zastosowanej dawki nanocząstek Y_2O_3 . Najwyższa aktywność SOD była odnotowana 10 dnia po traktowaniu nanocząstkami w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$, wynosiła ona około 1,2 U/ μg białka i było to 3 razy więcej niż w próbach kontrolnych (Ryc. 41). Dnia 6 i 10 wyższa aktywność SOD była obserwowana po zastosowaniu niższego stężenia nanocząstek Y_2O_3 , natomiast odwrotna zależność wystąpiła dnia 5, 7 i 9.



Ryc. 41. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ (Y_2O_3 10) lub 100 $\mu\text{g/ml}$ (Y_2O_3 100) nanocząstek Y_2O_3 . 1U – ilość ekstraktu enzymatycznego powodująca 50% inhibicję tworzenia formazanu. Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; *** $p < 0,001$.



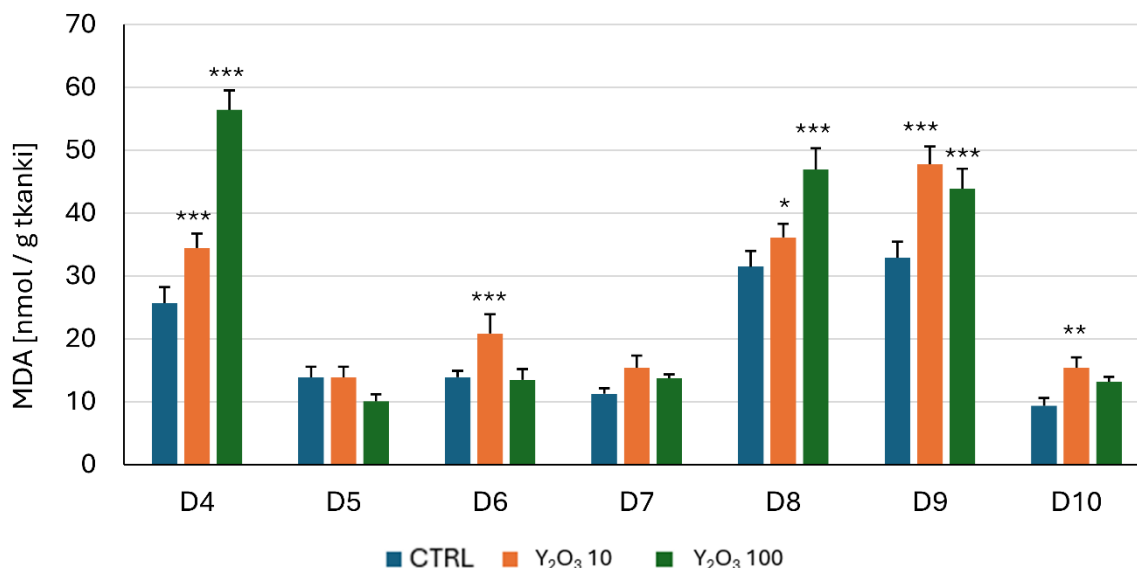
Ryc. 42. Zawartość białek karbonylowanych (CP) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ (Y_2O_3 10) lub 100 $\mu\text{g/ml}$ (Y_2O_3 100) nanocząstek Y_2O_3 . Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; *** $p < 0,001$.

4.4.5. Zawartość białek karbonylowanych po podaniu nanocząstek Y_2O_3

Zawartość białek karbonylowanych wykazywała wysoce istotne zmiany we wszystkich punktach czasowych względem prób CTRL (Ryc.42). Niższe stężenie nanocząstek ($10 \mu\text{g/ml}$) silniej stymulowało tworzenie białek karbonylowanych w 5, 6, 7, 8 i 10 dniu rozwoju zarodka. Najwyższą zawartość białek karbonylowanych odnotowano 9 dnia po zastosowaniu wyższego stężenia nanocząstek Y_2O_3 ($100 \mu\text{g/ml}$).

4.4.6. Zawartość MDA po podaniu nanocząstek Y_2O_3

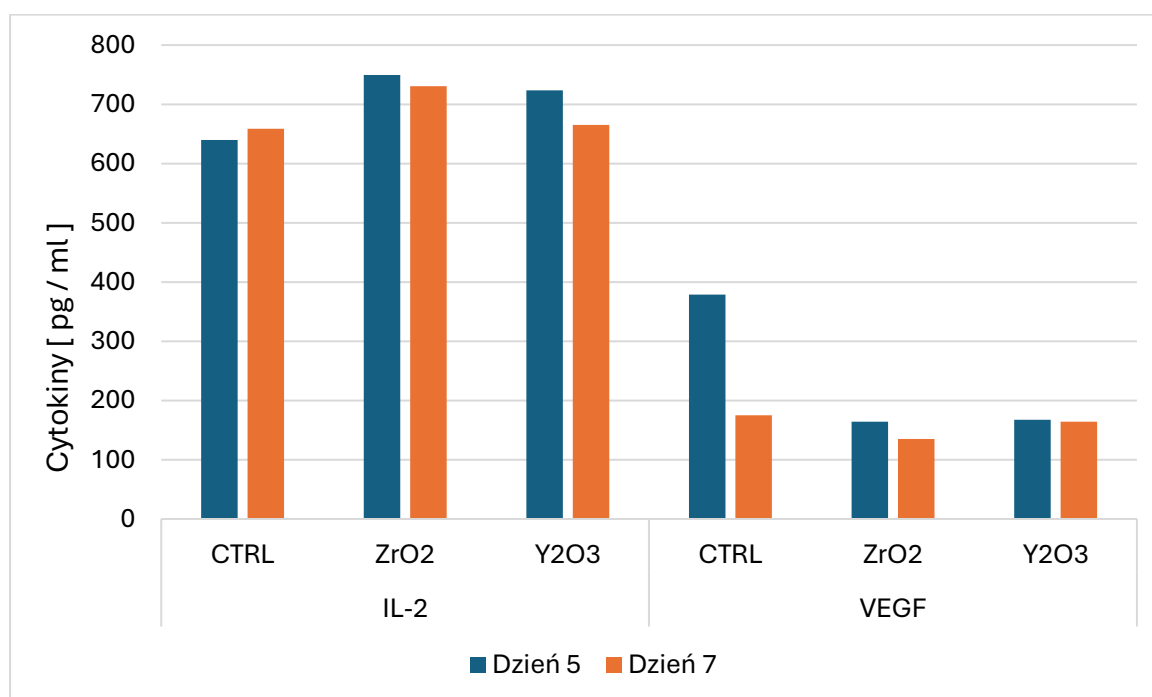
Zawartość MDA w badanych zarodkach (Ryc. 43) była wysoce istotnie wyższa po zastosowaniu wyższej dawki nanocząstek Y_2O_3 w 4 i 8 dniu rozwoju. Najwyższą wartość odnotowano 4 dnia po zastosowaniu stężenia $100 \mu\text{g/ml}$, osiągnęła ona około 55 nmol/g tkanki , co stanowiło ponad dwukrotność wartości CTRL. Nieistotnie statystycznie obniżenie zawartości MDA względem kontroli obserwowano w dniach od 5 do 7 oraz 10. Wyjątkiem był 6 i 10 dzień, kiedy zastosowanie nanocząstek Y_2O_3 w dawce $10 \mu\text{g/ml}$ powodowało istotny wzrost poziomu MDA. Dnia 6 i 9 stężenie MDA było wyższe dla dawki nanocząstek $10 \mu\text{g/ml}$.



Ryc. 43. Zawartość dialdehydu malonowego (MDA) w zarodkach kurzych od 4 do 10 dnia inkubacji po podaniu pojedynczej dawki $10 \mu\text{g/ml}$ (Y_2O_3 10) lub $100 \mu\text{g/ml}$ (Y_2O_3 100) nanocząstek Y_2O_3 . Gwiazdki oznaczają istotne różnice względem grupy CTRL danego dnia; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.4.7. Poziom cytokin po podaniu nanocząstek ZrO_2 oraz Y_2O_3

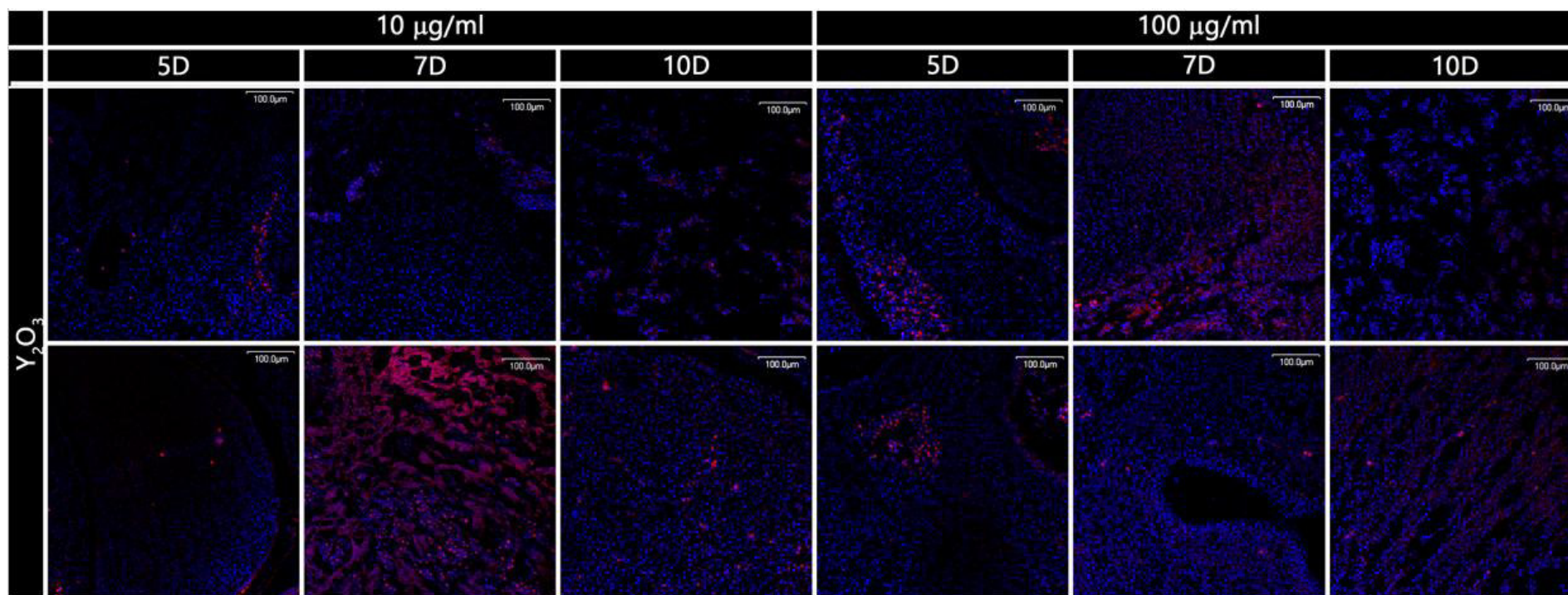
Podanie nanocząstek ZrO_2 oraz Y_2O_3 prowadziło do zmian zawartości tylko dwóch cytokin: IL-2 oraz VEGF. Stężenie IL-2 było nieznacznie podwyższone w stosunku do CTRL niezależnie od zastosowanej nanocząstki oraz czasu inkubacji zarodków (Ryc. 44). Zawartość VEGF w zarodkach po zastosowaniu nanocząstek ZrO_2 oraz Y_2O_3 była na podobnym poziomie. Wyższe stężenie VEGF obserwowano dla zarodków CTRL 5 dnia w porównaniu do dnia 7 (Ryc. 44).



Ryc. 44. Porównanie ilości (pg/ml) IL-2 oraz VEGF w zarodkach z dnia 5 i 7 inkubacji po podaniu nanocząstek ZrO_2 oraz Y_2O_3 w dawce 10 $\mu\text{g/ml}$.

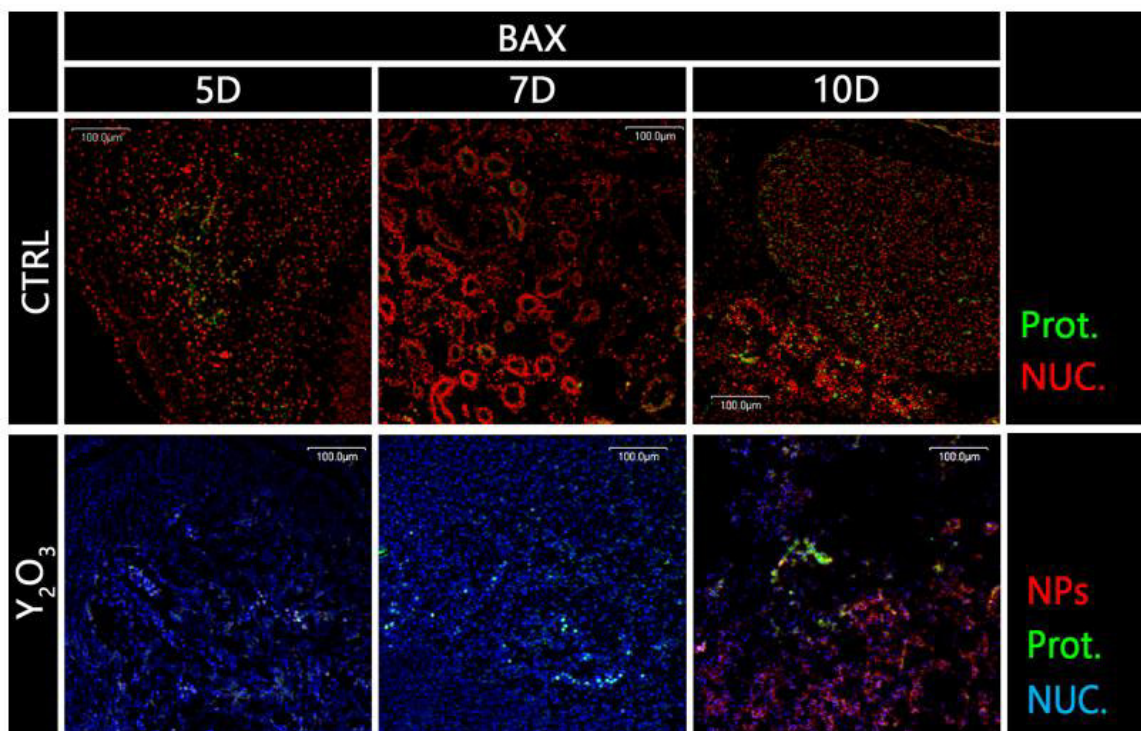
4.4.8. Mikroskopia konfokalna

Na zdjęciach z mikroskopii konfokalnej możemy zaobserwować zmiany w dystrybucji nanocząstek Y_2O_3 zależne od dawki oraz od dnia inkubacji. W dniu 5, po zastosowaniu dawki 10 $\mu\text{g/ml}$ widoczna jest mniejsza zawartość nanocząstek w tkankach niż po ekspozycji na dawkę 100 $\mu\text{g/ml}$. Jednakże, w dniu 7 tendencja ta wydaje się odwrócona, choć jest to uzależnione od obserwowanej lokalizacji. W dniu 10 nie widać większych różnic w zawartości nanocząstek w tkankach pomiędzy dawkami (Ryc. 45).

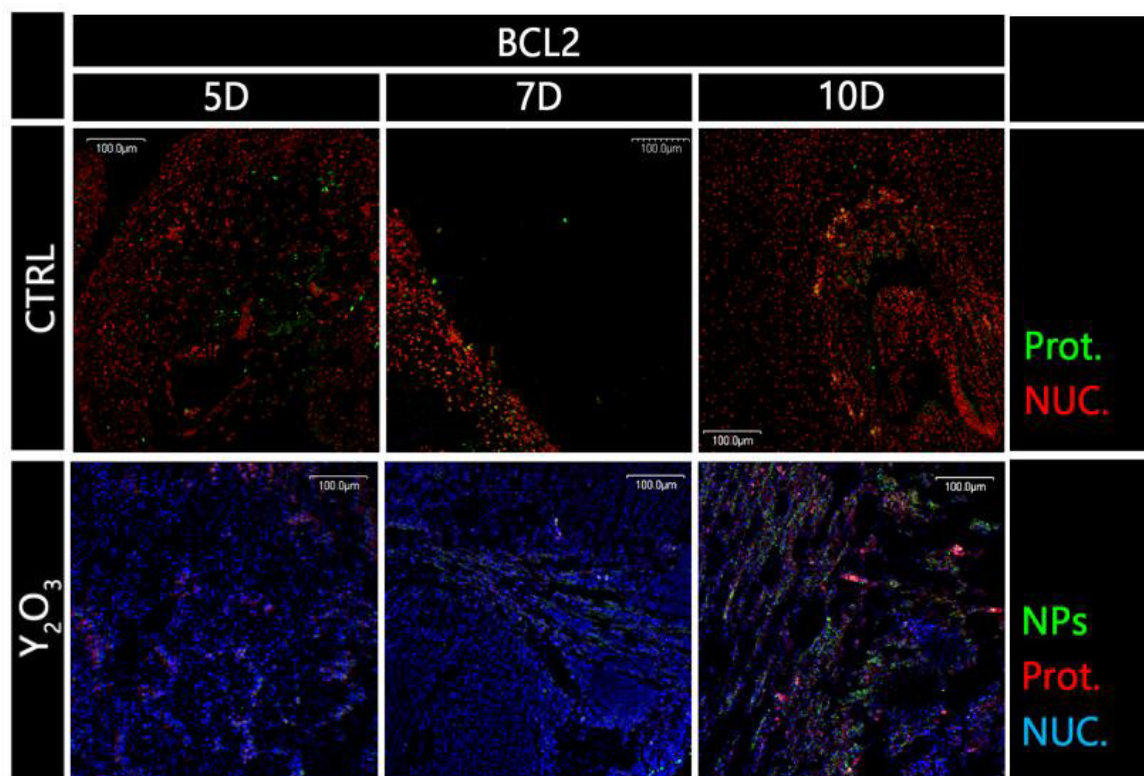


Ryc. 45. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek Y_2O_3 w stężeniach 10 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y_2O_3 . Skala 100 μm . Skala 100 μm .

Zawartość białka Bax po ekspozycji na nanocząstki Y_2O_3 (Ryc. 46) jest niższa w 5 dniu od podania. Natomiast w dniu 7 i 10 jest wyższa względem CTRL. Dla zawartości białka Bcl2 obserwujemy inną dynamikę zmian: w dniu 5 oraz 7 jego ilość jest porównywalna do CTRL, natomiast w dniu 10 jest go więcej niż w CTRL (Ryc. 47).

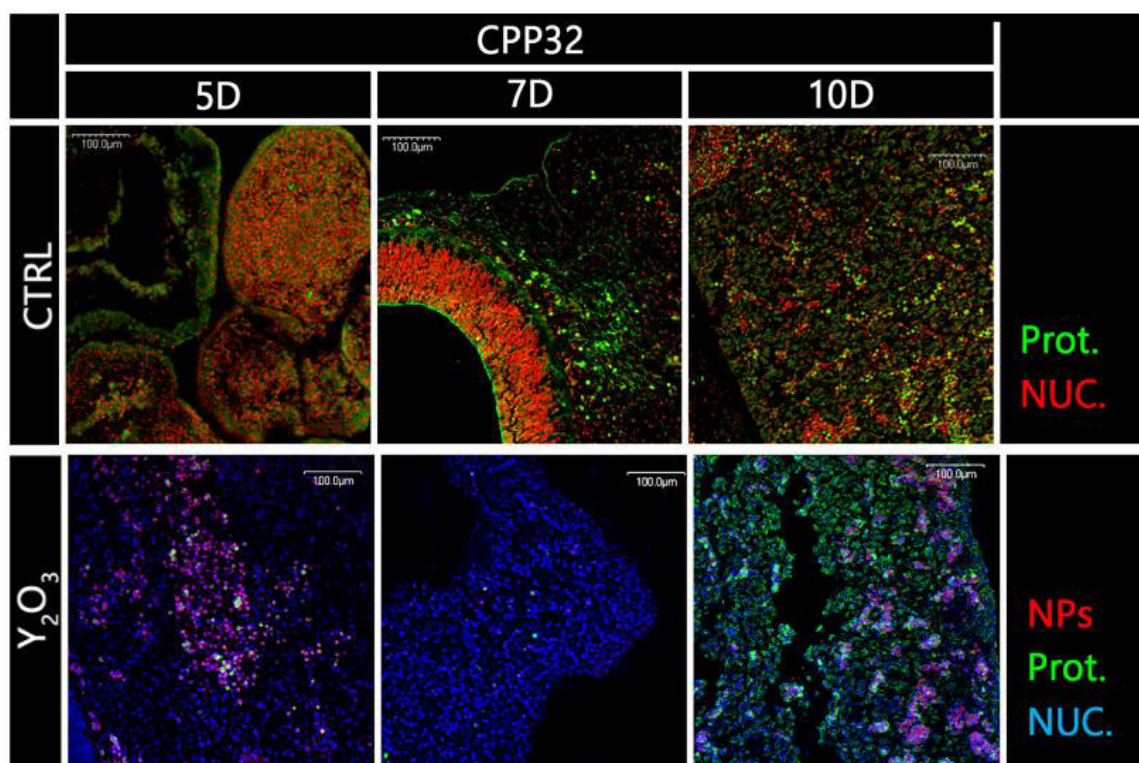


Ryc. 46. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek Y_2O_3 w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20 $\times$. Dla zdjęć CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko Bax zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu Y_2O_3 - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bax, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y_2O_3 . NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala 100 μm .



Ryc. 47. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek Y₂O₃ w stężeniu 10 μg/ml w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20×. Dla zdjęć CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko Bcl2 zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu Y₂O₃ - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bcl2, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y₂O₃. NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala 100 μm.

Zawartość aktywnej kaspazy-3 (CPP32) w dniu 5 oraz 7 od ekspozycji na nanocząstki Y₂O₃ była niższa niż w CTRL, natomiast w dniu 10 była porównywalna do tej obserwowanej w kontroli (Ryc. 48).



Ryc. 48. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek Y_2O_3 w stężeniu $10 \mu g/ml$ w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu $20\times$. Dla zdjęć CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko aktywnej kaspazy-3 (CPP32) zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu Y_2O_3 - niebieska fluorescencja odpowiada jądrów komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja związana jest z obecnością białka aktywnej kaspazy-3 (CPP32), natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y_2O_3 . NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Skala $100 \mu m$.

4.5. Dyskusja wyników dla niebiodegradowalnych nanocząstek ZrO_2 oraz Y_2O_3

Nanocząstki ZrO_2 oraz Y_2O_3 są to nanomateriały nieulegające biodegradacji, które dodatkowo różnią się morfologią. Nanocząstki ZrO_2 mają kształt sferyczny, natomiast Y_2O_3 mają kształt owalny, który jest porównywalny do nanocząstek ZnO OVAL. Różnice kształtów mogą powodować odmienne interakcje obu typów nanocząstek z układami biologicznymi. Analiza cytotoksyczności przeprowadzona na CEFs wykazała, że ekspozycja na nanocząstki ZrO_2 prowadziła do obniżenia żywotności komórek do około 50% żywotności grupy CTRL już przy stężeniu $0,001 \text{ mg/ml}$. W przypadku nanocząstek Y_2O_3 obserwowano niemal całkowitą utratę żywotności komórek już przy najniższym badanym stężeniu, wynoszącym $0,0001 \text{ mg/ml}$. Wyniki te jednoznacznie wskazują na

istotnie wyższą toksyczność nanocząstek Y_2O_3 w porównaniu do ZrO_2 . Można przypuszczać, że obserwowany efekt związany jest z większą cytotoksycznością nanocząstek o wydłużonej morfologii. Znajduje to potwierdzenie w literaturze, dotyczącej wpływu kształtu nanocząstek na ich oddziaływania biologiczne (Andelman i in., 2009).

Zarówno dla nanocząstek ZrO_2 , jak i Y_2O_3 , z powodu ograniczeń dostępnej aparatury, nie było możliwe przeprowadzenie analizy przy użyciu AAS w celu oceny zmian w dystrybucji tych nanocząstek w zarodku, konieczne było więc ich domieszkowanie metalami ziem rzadkich w celu wywołania ich luminescencji w klasycznych pasmach wzbudzenia dla mikroskopii konfokalnej. Dzięki domieszkowaniu terbem (Tb i Y) nanocząstek ZrO_2 oraz domieszkowania europem (Eu) nanocząstek Y_2O_3 możliwe jest potwierdzenie ich obecności w tkankach zarodków. Dla nanocząstek ZrO_2 widoczna jest wyraźna, zielona fluorescencja w tkankach zarodka (Ryc. 32), która świadczy o obecności tych nanocząstek w zarodku. Podobne obserwacje były wykonane dla nanocząstek Y_2O_3 , gdzie widoczna jest czerwona fluorescencja pochodząca od Eu (Ryc. 45).

Porównując dystrybucję obu tych nanocząstek w tkankach widoczne jest ciekawa zależność, wynikająca zarówno z zastosowanej matrycy nanocząstek, jak również dawki. W przypadku 5 dnia widoczna jest większa zawartość ZrO_2 w tkankach zarodka w porównaniu do Y_2O_3 dla dawki 10 $\mu g/ml$, natomiast po podaniu nanocząstek Y_2O_3 trend był odwrotny i więcej nanocząstek jest widocznych dla dawki 100 $\mu g/ml$. W 7 dniu inkubacji zaobserwowano odwrócenie zależności w stosunku do 5 dnia. Po podaniu nanocząstek Y_2O_3 w dawce 10 $\mu g/ml$, widoczne było więcej nanocząstek w zarodku. Jednocześnie dla dawki 100 $\mu g/ml$ zaobserwowano porównywalną ilość obu nanocząstek w tkankach. Jednakże, nanocząstki ZrO_2 , podane w wyższym stężeniu, tworzą większe skupiska w badanych tkankach. Obserwowana różnica między 5 a 7 dniem może wynikać w pierwszej kolejności z różnicy w kształcie, małe sferyczne nanocząstki ZrO_2 szybciej ulegają dystrybucji w tkankach. Kolejny czynnik, to tendencja do tworzenia agregatów, która była widoczna już w zdjęciach SEM dla ZrO_2 oraz w średnicy hydrodynamicznej (Ryc. 24 i Tab. 3). Powstające agregaty nanocząstek ZrO_2 , w porównaniu do nanocząstek Y_2O_3 , ulegają wolniejszej dystrybucji w tkankach, pomimo tego, że są one utworzone z mniejszych nanocząstek. Tendencja do tworzenia skupisk przez ZrO_2 możliwe, że wpływa też na niższą cytotoksyczność obserwowaną w komórkach CEFs (Ryc. 28, porównaj z Ryc. 40). Podobnie, wydłużony kształt nanocząstek Y_2O_3 , może wpływać na ich wolniejszą

biodystrybucję do tkanek zarodka i przez to ograniczać negatywny wpływ nanocząstek na rozwijający się organizm.

Po podaniu nanocząstek ZrO_2 i Y_2O_3 widoczne były istotne statystycznie zmiany związane ze stresem oksydacyjnym: w aktywności SOD, zawartości białek karbonylowanych i aktywności MDA, praktycznie we wszystkich dniach i dawkach (Ryciny 29 do 31 i 41 do 43). Dla ZrO_2 zmiany aktywności SOD istotnie rosną od dnia 5 do końca doświadczenia. Dnia 6 i 10 odnotowano istotnie wyższy wynik wyłącznie po zastosowaniu nanocząstek w niższej dawce (10 $\mu g/ml$). Wskazuje to na wzmożoną produkcję ROS w tkankach zarodka, która jest uzależniona od czasu ekspozycji na nanocząstki. Jeżeli zestawimy tę dynamikę zmian z pozostałymi markerami stresu oksydacyjnego, możliwe jest zaobserwowanie, że poziom białek karbonylowanych (Ryc. 30) pokrywa się z wynikami dla aktywności SOD w dniach 7, 8 oraz 9 (Ryc. 29). Co interesujące, jedyny wynik, który był istotnie niższy, miał miejsce dnia 4 po podaniu nanocząstek ZrO_2 w stężeniu 100 $\mu g/ml$. Jest to zmiana, która prawdopodobnie wynika z utrudnionej penetracji do tkanek zagregowanych nanocząstek. Jednocześnie, w 4 dniu widoczny był wysoki poziom peroksydacji lipidów (Ryc. 31), co może świadczyć o intensyfikacji procesów transportu komórkowego. Poziom MDA następnie wykazuje obniżający się trend aż do dnia 8. W 7 dniu obserwowany jest wyższy poziom MDA wywołany przez dawkę 10 $\mu g/ml$, podczas gdy wyższa dawka osiągnęła poziom CTRL. W zestawieniu z danymi z dystrybucji nanocząstek ZrO_2 w tkankach, widoczne było nagromadzenie nanocząstek w strukturach przypominających nerkę. Może to tłumaczyć niższy poziom MDA w tkankach ogólnie, spowodowany potencjalnym usuwaniem nanocząstek z zarodka. W przypadku dawki 10 $\mu g/ml$ możemy mieć do czynienia z wolniejszą dynamiką usuwania nanocząstek z organizmu. Jest to aspekt, który wymaga dalszych badań i którego nie można było potwierdzić eksperymentalnie, tak jak miało to miejsce w przypadku nanocząstek ZnO z zastosowaniem metody AAS.

Podanie nanocząstek Y_2O_3 prowadziło do istotnego statystycznie trendu wzrostowego już od 5 dnia dla aktywności SOD (Ryc. 41). Może to wskazywać na nasiloną aktywację mechanizmów ochronnych mających przeciwdziałać nadmiernie powstającym ROS. W przypadku białek karbonylowanych (Ryc. 42), widoczny jest istotny, wzrost ich

zawartości od 4 dnia. Podobnie jak aktywność SOD, stężenie białek karbonylowanych narasta i utrzymuje się na poziomach istotnie statystycznie wyższych od kontroli w kolejnych dniach. Poziom MDA (Ryc. 43) jest istotnie wyższy od kontroli w 4 dniu, następnie obniża się i ponownie narasta w dniach 8 i 9. Może to być efektem nasilonych procesów transportu transbłonowego nanocząstek i związanych z tym procesów generowania ROS i peroksydacji lipidów. Obserwowane w dniu 10 obniżenie poziomu MDA koreluje w czasie ze wzrostem aktywności SOD, jednego z kluczowych zmiataaczy wolnych rodników. Dane te pokrywają się też z obserwacjami dla biodystrybucji nanocząstek Y_2O_3 w tkankach zarodka (Ryc. 45).

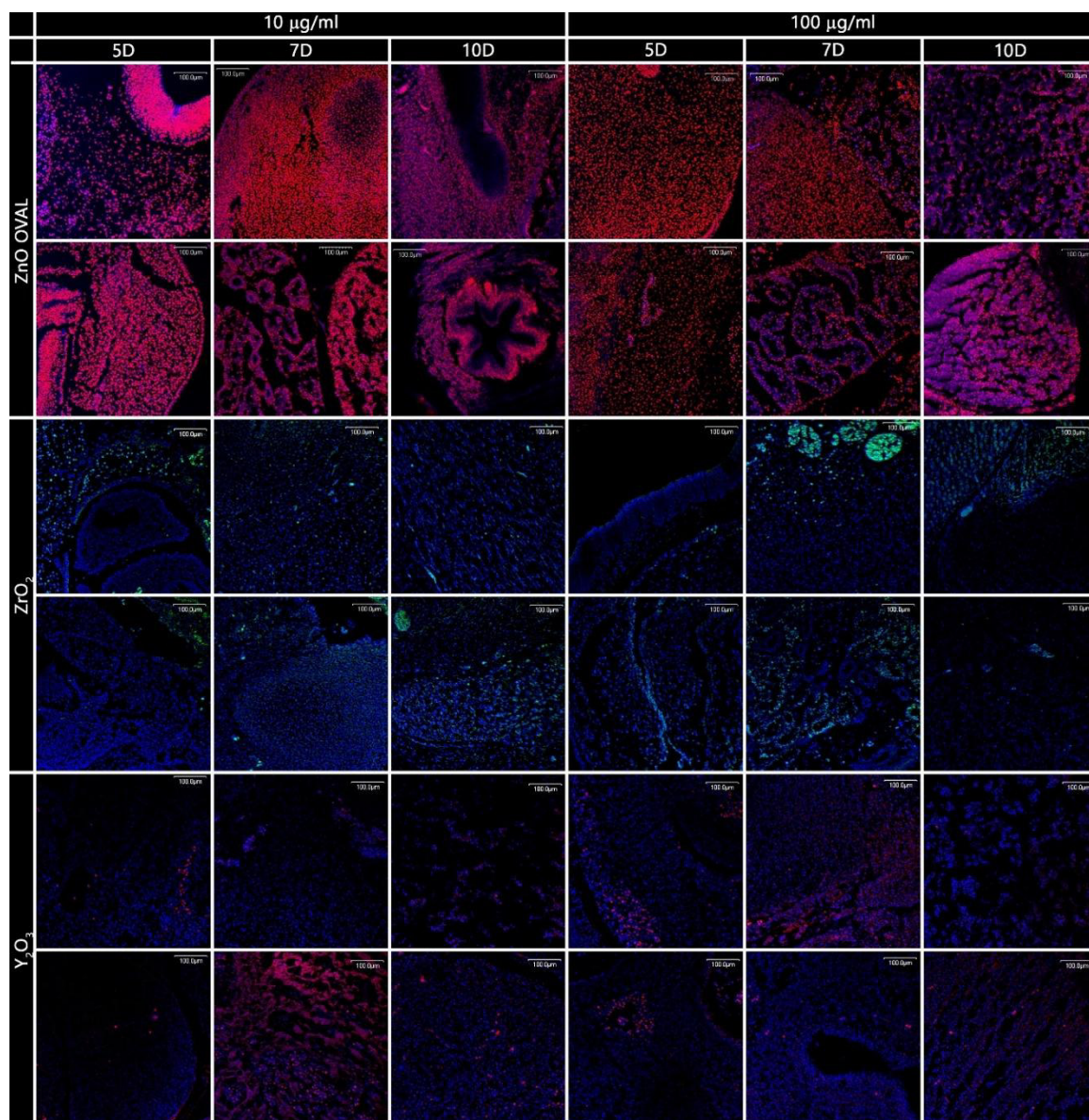
Porównując wyniki z oznaczeń immunohistochemicznych można zaobserwować znaczne zmiany w ilości białek powiązanych z apoptozą, zarówno po narażeniu na działanie nanocząstek ZrO_2 , jak i Y_2O_3 . Przy czym zmiany te wydają się być zbliżone dla obu nanocząstek sugerując, że ich wpływ na procesy programowanej śmierci komórki może być niezależny od kształtu. Z drugiej strony, może być on związany (w przypadku ZrO_2) z wysoką tendencją do agregacji nanocząstek, która powoduje zbliżenie ich rozmiarów do nanocząstek Y_2O_3 . Możliwe jest też, że obserwowane zmiany związane są z podobieństwem we właściwościach fizycznych matryc lub zależą od ich niebiodegradowalności. Poziom jednego z głównych białek proapoptotycznych – Bax jest wyższy względem CTRL w dniu 7 i 10 dla obu nanocząstek ZrO_2 i Y_2O_3 . W porównaniu do Bax, poziom antyapoptotycznego białka Bcl2 jest niższy względem CTRL, w 5 dniu oraz porównywalny w dniu 7. Dopiero w 10 dniu ilość Bcl2 jest wzrasta powyżej CTRL. Pomimo tego, że widoczna jest zwiększona ilość białka Bax zarówno w 5 jak i w 7 dniu, nie jest widoczna zwiększony poziom aktywnej kaspazy-3 (CPP32) w tych dniach. Dopiero w dniu 10 pojawiają się różnice zależne od użytych nanocząstek. Po zastosowaniu nanocząstek ZrO_2 (10 $\mu g/ml$) obserwowano całkowity brak CPP32 w tym dniu, w szczególności w porównaniu do CTRL (Porównaj Ryc. 33 do 35 z Ryc. 46 do 48). Co więcej, wyniki z panelu cytokin (Ryc. 44) wykazały, nieznaczny wzrost IL-2 obserwowany dla obu nanocząstek i niższy poziom czynnika wzrostu śródbłónki naczyniowego (VEGF) w dniu 5. To ostatnie koreluje z obserwowanym obniżeniem poziomu Bcl2 i narażeniem na apoptozę (Wang i in., 2024; Yang i in., 2023). Niezależnie od obserwacji mikroskopowych i Elisa, wyniki dotyczące poziomu białek w tkankach zarodka będą musiały zostać potwierdzone innymi metodami (np. Western Blot). Wyniki z oceny

histopatologicznej nie wykazały zmian w zarodkach niezależnie od użytych nanocząstek (Y_2O_3 , ZrO_2) jak również nie wykazały wpływu dawki (Ryc. 51 i 52).

5. Podsumowanie

Porównując właściwości fizyczne nanocząstek wykorzystanych w niniejszej pracy warto zwrócić uwagę, że udało się w niej sprawdzić potencjalną embriotoksyczność nanocząstek o dobrze scharakteryzowanych rozmiarach fizycznych oraz wartości potencjału zeta. Nanocząstki ZnO OVAL i Y_2O_3 charakteryzowały się również dobrą stabilnością w roztworze nie tworząc agregatów, co czyni je idealnymi do porównania wpływu składu matrycy oraz biodegradowalności nanocząstek na rozwój embrionalny. Natomiast porównując ZnO OVAL z ZnO LONG oraz ZrO_2 i Y_2O_3 , możliwe było sprawdzenie tego jak wpłynie kształt nanocząstek na ten proces. Porównując dystrybucję zastosowanych nanocząstek (ZnO OVAL ZrO_2 i Y_2O_3) w tkankach zarodka widać znaczące różnice w ogólnej penetracji tkanek (Ryc. 49). Nanocząstki ZnO OVAL jako jedyne równomiernie penetrują wszystkie tkanki zarodka, podczas gdy dla pozostałych nanocząstek widoczne są różnice w dystrybucji pomiędzy różnymi obszarami w preparatach. Dla wszystkich nanocząstek widoczne było ich nagromadzenie w nerkach. Obserwacje te potwierdzają pierwszą hipotezę pracy, że nanocząstki tlenków metali (ZnO , ZrO_2 i Y_2O_3) w zastosowanym modelu *in ovo*, skutecznie przedostają się do tkanek zarodka oraz, że dynamika zmian w dystrybucji zależy zarówno od kształtu jak i od dawki nanocząstek. Co więcej zwiększona lokalizacja sygnału fluorescencyjnego pochodzącego od nanocząstek obserwowana w nerkach (Ryc. 19 i 49) może świadczyć o kluczowej roli tego narządu w ich eliminacji u ptaków, lub że eliminacja nerkowa nanocząstek może być charakterystyczna dla rozwoju zarodkowego.

Porównując markery stresu oksydacyjnego między nanocząstkami biodegradowalnymi a niebiodegradowalnymi widoczne staje się, że rozpuszczalne nanocząstki ZnO generują mniejszy poziom stresu oksydacyjnego niż nierozpuszczalne nanocząstki ZrO_2 i Y_2O_3 (porównaj Ryc. 13-15 z Ryc. 29-31 i 41-43). Jednocześnie nanocząstki ZrO_2 oraz Y_2O_3 wykazywały istotny trend wzrostowy dla wszystkich zbadanych markerów stresu oksydacyjnego w kolejnych dniach doświadczenia sugerując kumulacyjne efekty działania zastosowanych nanocząstek.

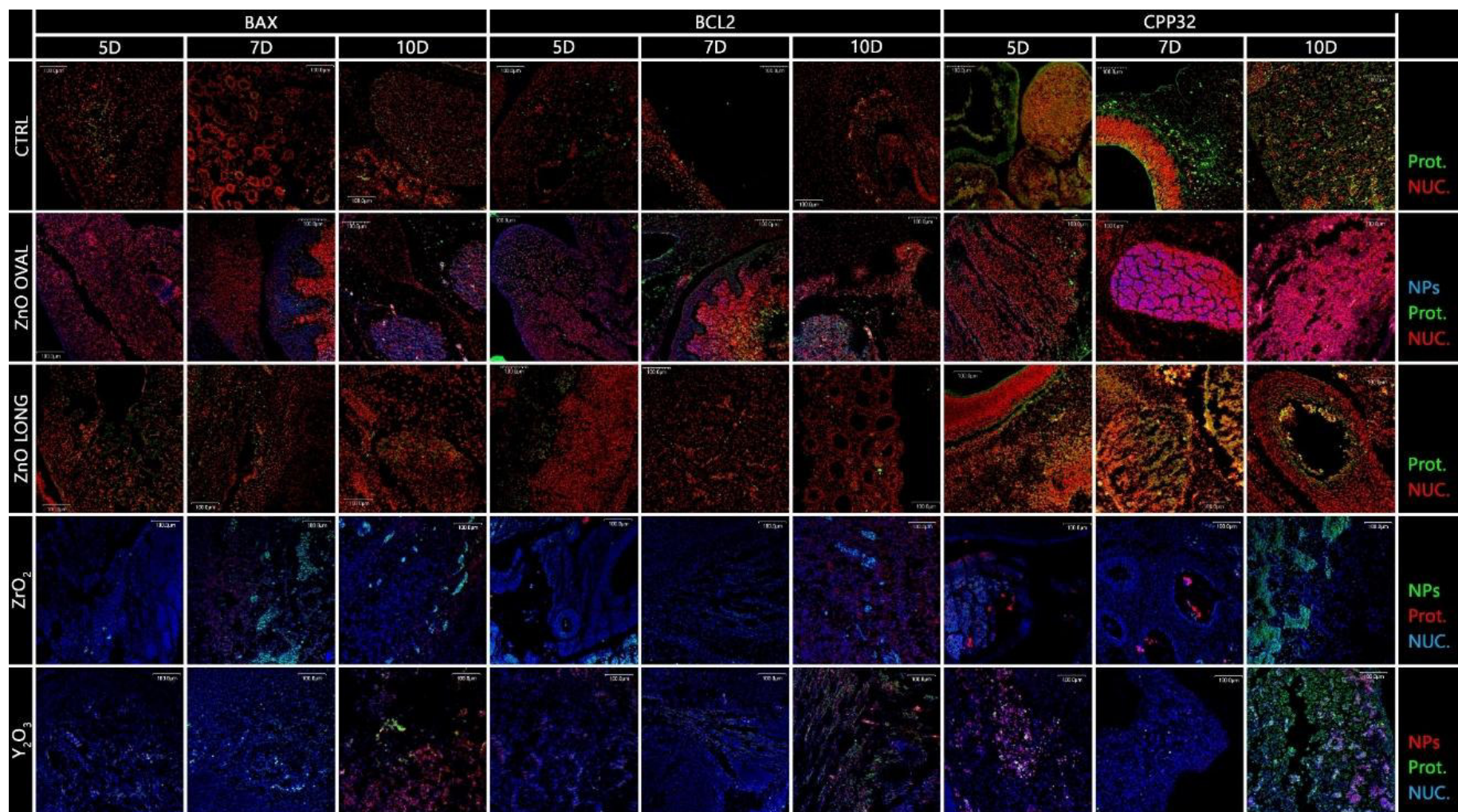


Ryc. 49. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek ZnO OVAL, ZrO₂ i Y₂O₃ w stężeniach 10 µg/ml i 100 µg/ml w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20×. Dla ZnO czerwona fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym 7-AAD, natomiast niebieska fluorescencja wskazuje nanocząstki ZnO OVAL. Dla ZrO₂ niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, natomiast zielona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek ZrO₂. Y₂O₃ niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y₂O₃. Skala 100 µm.

Porównując wyłącznie wpływ kształtu nanocząstek, po podaniu nanocząstek ZnO widoczne są większe zmiany dla nanocząstek ZnO OVAL niż po podaniu nanocząstek ZnO LONG. Wynika to prawdopodobnie z utrudnionej penetracji do tkanek długich nanocząstek ZnO LONG (Ryc. 12). Jest to widoczne zarówno w markerach stresu oksydacyjnego jak i na poziomie zmian genomowych. Odwrotnie wygląda to dla sferycznych nanocząstek ZrO₂

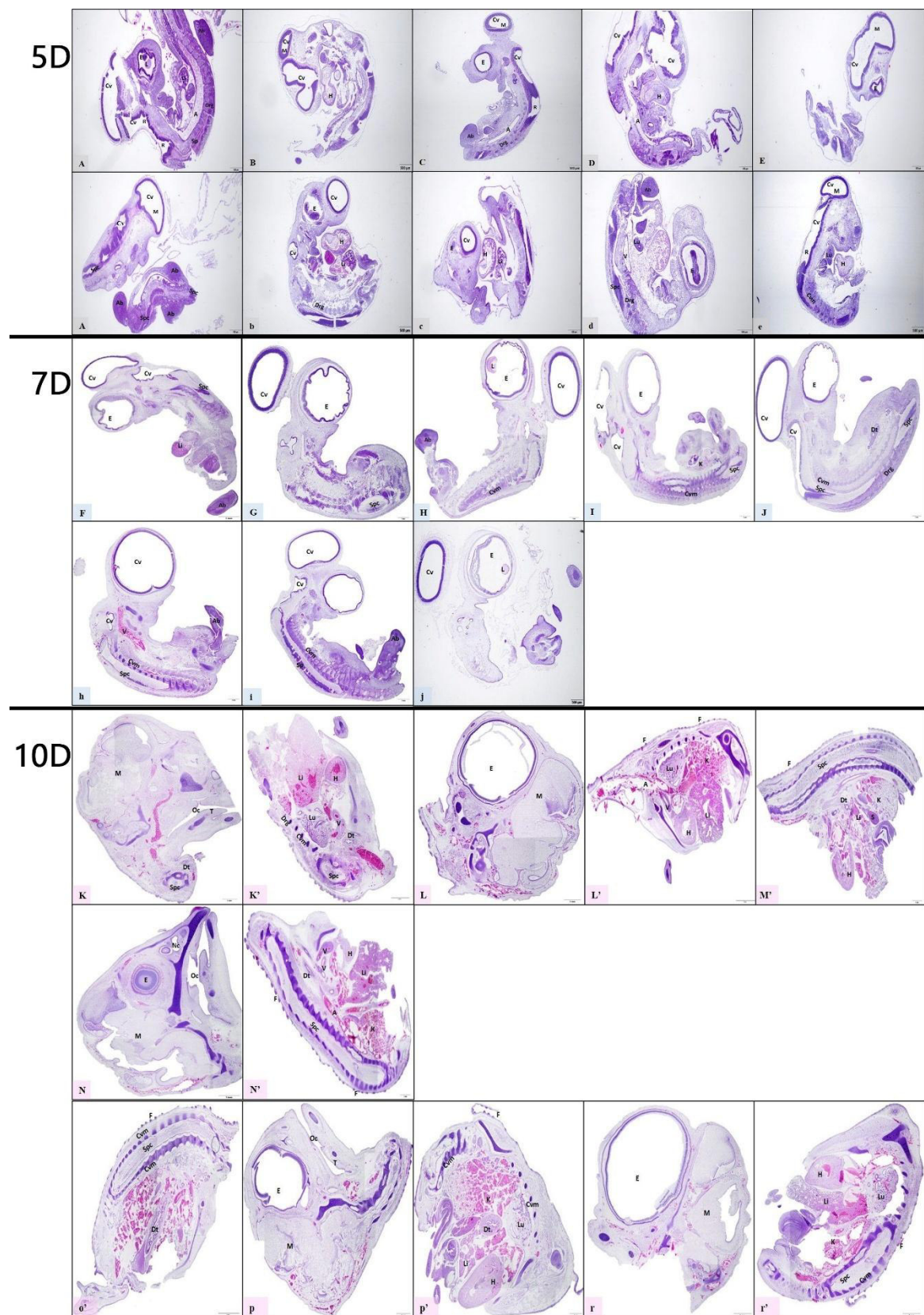
względem nanocząstek Y_2O_3 gdzie dochodzi do zwiększenia stresu oksydacyjnego w czasie. W reakcji na wszystkie nanocząstki było widoczne obniżenie poziomu VEGF w dniu 5 w porównaniu do CTRL. Jednakże, to właśnie nanocząstki ZnO LONG jako jedyne powodowały wyraźnie podwyższony poziom IL-2 w dniu 7. Natomiast ZnO OVAL przyczyniało się do spadku IL-2 w dniu 5 i 7. Porównując zawartość białek związanych z apoptozą (Ryc. 50) można zauważyć większą ilość białka Bax i aktywnej kaspazy-3 (CPP32), oraz niższą ilość Bcl2 po ekspozycji na nanocząstki niebiodegradowalne i ZnO LONG w porównaniu do ZnO OVAL. Największe zmiany sprzyjające apoptozie wywołane były przez podłużne, biodegradowalne nanocząstki ZnO. Jest to szczególnie interesujące, że nanocząstki te nie wykazały większych zmian w markerach oksydacyjnych oraz na poziomie genomowym. Pomimo tych obserwacji nie wykazano zmian w obrazie histologicznym po narażeniu na nanocząstki ZnO LONG, jak również w przypadku innych nanocząstek, niezależnie od zastosowanej dawki (Ryc. 51 i 52).

Dodatkowo zmiany obserwowane po zastosowaniu biodegradowalnych nanocząstek ZnO OVAL w markerach apoptozy, w porównaniu do innych nanocząstek i kontroli, wskazują, że nanocząstki te w zastosowanych dawkach, nie tylko nie powodują zwiększonego ryzyka programowanej śmierci komórki, ale wręcz przed nią chronią. Niezależnie od bardzo ciekawych obserwacji mikroskopowych, wyniki te będą musiały zostać potwierdzone innymi metodami (np. Western Blot).



Ryc. 50. Podpis dla ryciny na następnej stronie

Ryc. 50. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek: ZnO OVAL, ZnO LONG, ZrO₂ i Y₂O₃ w stężeniu 10 µg/ml w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20×. Obraz z mikroskopu konfokalnego tkanek zarodka kurzego po podaniu nanocząstek: ZnO OVAL, ZnO LONG, ZrO₂ i Y₂O₃ w stężeniu 10 µg/ml w 5, 7 i 10 dniu inkubacji. Powiększenie obiektywu 20×. Dla zdjęć CTRL: jądra komórkowe wykazują czerwoną fluorescencję. Natomiast białko Bax zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu Y₂O₃ - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bax, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y₂O₃. NPs – nanocząstki, Prot. – białko które zostało wyznakowane, NUC. – jądra komórkowe. Natomiast białko aktywnej kaspazy-3 (CPP32) zieloną. Natomiast białko Bcl2 zieloną. W przypadku zdjęć po podaniu Y₂O₃ - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja związana jest z obecnością białka Bcl2, natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y₂O₃. W przypadku zdjęć po podaniu Y₂O₃ - niebieska fluorescencja odpowiada jądom komórkowym wybarwionym Hoechst 33342, zielona fluorescencja związana jest z obecnością białka aktywnej kaspazy-3 (CPP32), natomiast czerwona fluorescencja wskazuje obecność nanocząstek Y₂O₃. Skala 100 µm.



Ryc. 51. Podpis dla ryciny na następnej stronie.

Ryc. 51. Przekroje zarodków kurzych w **5. dniu inkubacji** (A – e, Bar=500 µm), **7. dniu inkubacji** (F – j, Bar=1 mm, Bar=500 µm) oraz w **10. dniu inkubacji** (K – r', Bar=1 mm, Bar= 2 mm) po podaniu nanocząstek w stężeniu 10 µg/ml i 100 µg/ml. Barwienie H-E.

(dwie fotografie) A) Grupa kontrolna w 5. dniu inkubacji

- B) ZnO OVAL, 10 µg/ml,
- b) ZnO OVAL, 100 µg/ml,
- C) ZnO LONG, 10 µg/ml,
- c) ZnO LONG, 100 µg/ml,
- D) Y₂O₃, 10 µg/ml,
- d) Y₂O₃, 100 µg/ml,
- E) ZrO₂, 10 µg/ml,
- e) ZrO₂, 100 µg/ml,

F) Grupa kontrolna w 7. dniu inkubacji,

- G) ZnO OVAL, 10 µg/ml,
- H) ZnO LONG, 10 µg/ml,
- h) ZnO LONG, 100 µg/ml,
- I) Y₂O₃, 10 µg/ml,
- i) Y₂O₃, 100 µg/ml,
- J) ZrO₂, 10 µg/ml,
- j) ZrO₂, 100 µg/ml,

K) i K') Grupa kontrolna w 10. dniu inkubacji,

- L) i L') ZnO OVAL, 10 µg/ml,
- M) i M') ZnO LONG, 10 µg/ml,
- N) i N') ZrO₂, 10 µg/ml,
- o') ZnO OVAL, 100 µg/ml,
- p) i p') ZnO LONG, 100 µg/ml,
- r) i r') ZrO₂, 100 µg/ml,

‘) tułów.

Narządy, struktury we wczesnej fazie rozwoju zostały oznaczone na rycinach skrótami:

A – aorta (łac. *aorta*),

Ab – zawiązek odnoża (appendage bud, łac. *gemma appendicis*),

Cv – pęcherzyk mózgowy (cerebral vesicle, łac. *vesicula encephalica*),

Cvm – zawiązki chrząstkowe kręgów (**cartilaginous vertebral models**, łac. *modeli cartilaginei vertebrarum*),

Drg – zwój korzenia grzbietowego (dorsal root ganglion, łac. *ganglion radialis dorsalis*),

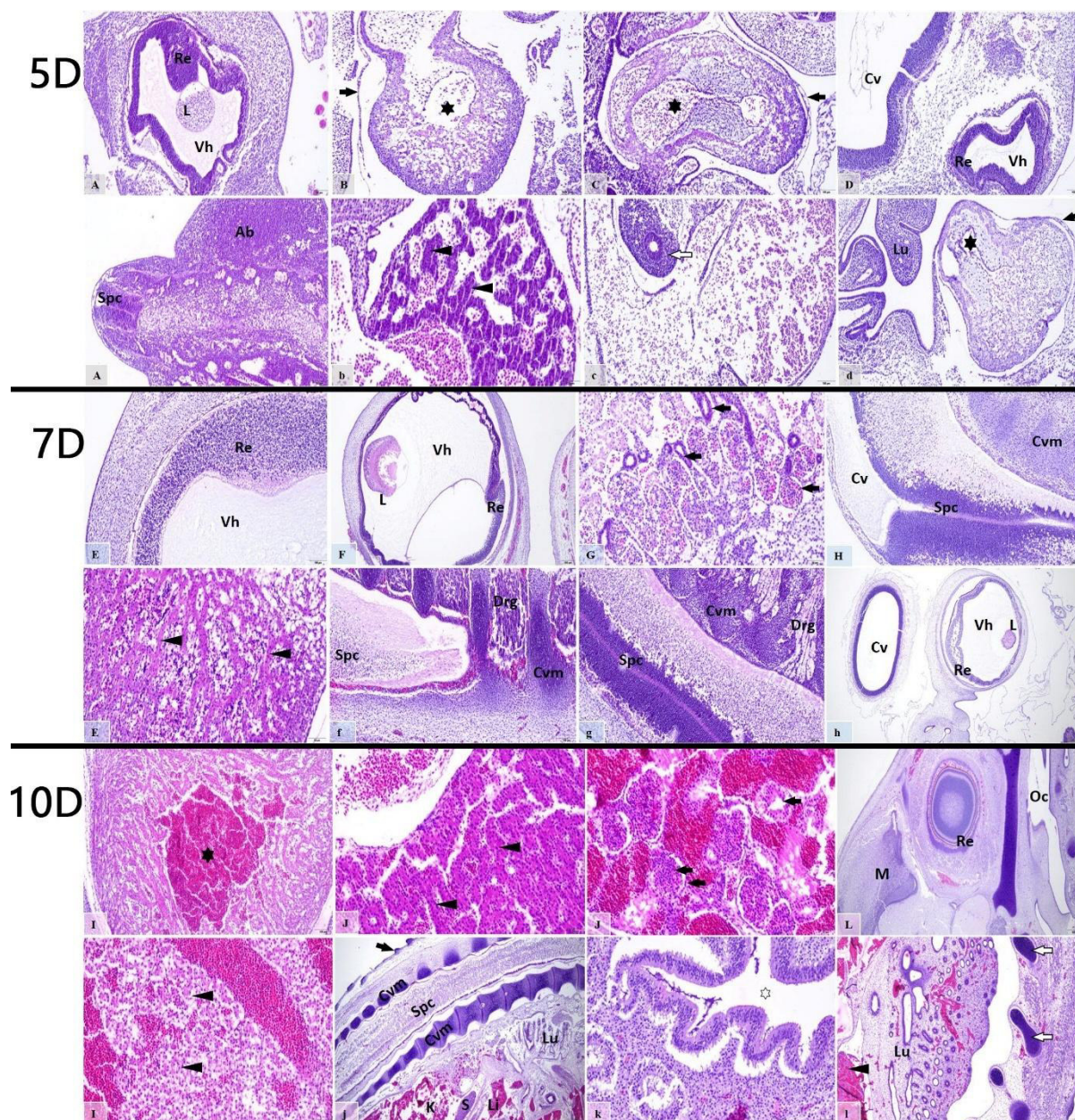
Dt – przewód pokarmowy (digestive tract, łac. *tractus digestorius*),

E – oko (eye, łac. *oculus*),

F – zawiązek pióra (feather bud, łac. *papilla pennae*),

H – serce (heart, łac. *cor*),

K – nerka (kidney, łac. *ren*),
L – soczewka (łac. *lens*),
Li – wątroba (liver, łac. *hepar*),
Lu – płuco (lung, łac. *pulmo*),
M – śródmózgowie (łac. *mesencephalon*),
Nc – jama nosowa (nasal cavity, łac. *cavum nasi*),
Oc – jama gębowa (oral cavity, łac. *cavum oris*),
R – tyłomózgowie (hind brain, łac. *rhombencephalon*),
Re – siatkówka (łac. *retina*),
S – śledziona (spleen, łac. *lien*),
Spc – rdzeń kręgowy (spinal cord, łac. *medulla spinalis*),
T – język (tongue, łac. *lingua*),
V – naczynie krwionośne (vessel, łac. *vas sanguineum*),
Vh – ciało szkliste (vitreous humor, łac. ***corpus vitreum***).



Ryc. 52. Obraz mikroskopowy narządów i struktur we wczesnej fazie rozwoju zarodków kurzych w 5. dniu inkubacji (A – D), 7. dniu inkubacji (E – h) oraz w 10. dniu inkubacji (K –l) po podaniu nanocząstek w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ i 100 $\mu\text{g/ml}$. Barwienie H-E.

A) (dwie fotografie) Oko. Siatkówka (Re), soczewka (L), ciało szkliste (Vh) oraz na rycinie poniżej rdzeń kręgowy (Spc), zawiązek kończyny (Ab). Grupa kontrolna w 5. dniu inkubacji, Bar=100 μm .

B) Serce. Światło komory serca (czarna gwiazdka), worek osierdziowy (czarna strzałka). ZnO:Eu, 10 $\mu\text{g/ml}$, Bar=100 μm .

b) Wątroba. Hepatocyty (czarne groty). ZnO:Eu, 100 $\mu\text{g/ml}$, Bar=50 μm .

C) Serce. Światło komory serca (czarna gwiazdka), worek osierdziowy (czarna strzałka). Y_2O_3 , 10 $\mu g/ml$, **Bar=100 μm** .
c) Płuco (biała strzałka). Y_2O_3 , 100 $\mu g/ml$, **Bar=100 μm** .

D) Oko. Siatkówka (Re), ciało szkliste (Vh) **oraz** po lewej stronie widoczne światło pęcherzyka mózgowego (Cv). ZrO_2 , 10 $\mu g/ml$, **Bar=100 μm** .

d) Serce. Światło komory serca (czarna gwiazdka), worek osierdziowy (czarna strzałka). Płuco (Lu). ZrO_2 , 100 $\mu g/ml$, **Bar=100 μm** .

E) (**dwie fotografie**) Oko. Siatkówka (Re), ciało szkliste (Vh), **Bar=100 μm oraz na rycinie poniżej** wątroba. Czarne groty wskazują na hepatocyty, **Bar=50 μm , Grupa kontrolna w 7. dniu inkubacji.**

F) Oko. Siatkówka (Re), soczewka (L), ciało szkliste (Vh). $ZnO:PD$, 10 $\mu g/ml$, **Bar=200 μm** .

f) **Rdzeń kręgowy (Spc)**, zawiązki chrząstkowe kręgów (Cvm), zwoje korzeni grzbietowych (Drg). $ZnO:PD$, 100 $\mu g/ml$, **Bar=100 μm** .

G) Nerka. Czarne strzałki wskazują na kłębuszki nerkowe i kanaliki nerkowe. Y_2O_3 , 10 $\mu g/ml$, **Bar=50 μm** .

g) **Rdzeń kręgowy (Spc)**, zawiązki chrząstkowe kręgów (Cvm), zwoje korzeni grzbietowych (Drg). Y_2O_3 , 100 $\mu g/ml$, **Bar=100 μm** .

H) Światło pęcherzyka mózgowego (Cv), **rdzeń kręgowy (Spc)**, zawiązki chrząstkowe kręgów (Cvm). ZrO_2 , 10 $\mu g/ml$, **Bar=100 μm** .

h) Po lewej stronie widoczne światło pęcherzyka mózgowego (Cv), a po prawej oko: siatkówka (Re), soczewka (L), ciało szkliste (Vh). ZrO_2 , 100 $\mu g/ml$, **Bar=500 μm** .

I) (**dwie fotografie**) Serce. Światło komory serca (czarna gwiazdka), **Bar=100 μm , na rycinie poniżej** wątroba. Czarne groty wskazują na hepatocyty, **Bar=50 μm , Grupa kontrolna w 10. dniu inkubacji.**

J) (**dwie fotografie**) Wątroba. Hepatocyty (czarne groty), na fotografii obok po prawej stronie widoczna nerka: kłębuszki i kanaliki nerkowe (czarne strzałki). $ZnO:Eu$, 10 $\mu g/ml$, **Bar=50 μm** .

j) **Rdzeń kręgowy (Spc)**, zawiązki chrząstkowe kręgów (Cvm), fragment płuc (Lu), nerki (K), śledziony (S) oraz wątroby (Li). $ZnO:Eu$, 100 $\mu g/ml$, **Bar=500 μm** .

k) Światło przewodu pokarmowego (biała gwiazdka). $ZnO:PD$, 100 $\mu g/ml$, **Bar=50 μm** .

L) Po lewej stronie widoczne śródmózgowie (M), po prawej oko: siatkówka (Re) oraz jama gębowa (Oc). ZrO_2 , 10 $\mu g/ml$, **Bar=500 μm** .

l) Płuco (Lu). Białe strzałki wskazują na zawiązki żeber. Czarny grot wskazuje na hepatocyty. ZrO_2 , 100 $\mu g/ml$, **Bar=200 μm** .

6. Wnioski

W niniejszej pracy, na modelu *in-ovo*, porównano potencjalną embriotoksyczność nanocząstek biodegradowalnych (ZnO) oraz niebiodegradowalnych (ZrO₂ i Y₂O₃) różniących się między sobą kształtem i matrycą.

Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnięto następujące wnioski:

1. Wszystkie badane nanocząstki penetrowały do tkanek zarodka, jednakże obserwowano różnice w ich biodystrybucji zależne od kształtu, zastosowanej macierzy i stopnia agregacji.
2. Nanocząstki biodegradowalne ZnO o kształcie owalnym penetrowały równomiernie tkanki zarodka, wywoływały najmniejsze zmiany w markerach stresu oksydacyjnego i wykazały znaczny potencjał antyapoptotyczny, jednakże ich podanie spowodowało bardzo znaczące zmiany ekspresji genów, głównie szlaków homeostazy energetycznej i systemów sygnalizacji wewnątrzkomórkowej.
3. Nanocząstki niebiodegradowalne (ZrO₂ i Y₂O₃) wywoływały znacznie silniejsze zmiany w markerach stresu oksydacyjnego i markerach apoptozy niż biodegradowalne nanocząstki ZnO.

Cel niniejszej pracy, którym było porównanie potencjalnej embriotoksyczności nanocząstek na modelu zarodka kurzego, różniących się między sobą modalnościami biodegradowalności oraz kształtu został zrealizowany.

Hipoteza pierwsza (Nanocząstki tlenków metali (ZnO, ZrO₂ i Y₂O₃) przenikają do tkanek zarodka kurzego, a ich dystrybucja zależy od kształtu i dawki) została potwierdzona, jednakże zaobserwowano różnice w penetracji do tkanek zarodka w przypadku nanocząstek niebiodegradowalnych (ZrO₂ i Y₂O₃). W przypadku nanocząstek ZnO OVAL dystrybucja do tkanek była równomierna, a jej tempo zależało wyłącznie od dawki i stopnia agregacji nanocząstek.

Hipoteza druga (Nanocząstki tlenków metali o różnym kształcie (owalne vs. podłużne) nie wpływają na rozwój zarodka i nie indukują niekorzystnych zmian w jego tkankach) nie została potwierdzona. Jakkolwiek w obrazach histopatologicznych nie stwierdzono różnic względem kontroli, jak i nie stwierdzono różnic w zamieralności zarodków, zaobserwowano znaczące zmiany dotyczące markerów stresu oksydacyjnego i programowanej śmierci komórki. Z tych analiz wynika, że najbezpieczniejsze do potencjalnego zastosowania są nanocząstki biodegradowalne oparte o owalną macierz ZnO, jednakże powodowały one bardzo intensywne zmiany w ekspresji genów.

7. Bibliografia

- Aghazadeh, M., Malek Barmi, A.-A., Mohammad Shiri, H., Sedaghat, S. (2013). Cathodic electrodeposition of $Y(OH)_3$ and Y_2O_3 nanostructures from chloride bath. Part II: Effect of the bath temperature on the crystal structure, composition and morphology. *Ceramics International*, 39(2), 1045–1055. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.07.026>.
- Akbar, A. N., Borthwick, N. J., Wickremasinghe, R. G., Panayotidis, P., Pilling, D., Bofill, M., . . . Salmon, M. (1996). Interleukin-2 receptor common gamma-chain signaling cytokines regulate activated T cell apoptosis in response to growth factor withdrawal: selective induction of anti-apoptotic (bcl-2, bcl-xL) but not pro-apoptotic (bax, bcl-xS) gene expression. *European journal of immunology*, 26(2), 294–299. DOI: <https://doi.org/10.1002/eji.1830260204>.
- Alam, A., Kataria, P., V., N. (2021). ASSESSMENT OF SUPEROXIDE DISMUTASE, CATALASE, AND PEROXIDASE ACTIVITIES IN ASPERGILLUS SP. AND CLADOSPORIUM SP. *Journal of Advanced Scientific Research*, 12(03), 249–254. DOI: <https://doi.org/10.55218/JASR.202112334>.
- Ali, S., Champagne, D. L., Spaink, H. P., Richardson, M. K. (2011). Zebrafish embryos and larvae: a new generation of disease models and drug screens. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 93(2), 115–133. DOI: <https://doi.org/10.1002/bdrc.20206>.
- Alshammari, B. H., Lashin, M. M. A., Mahmood, M. A., Al-Mubaddel, F. S., Ilyas, N., Rahman, N., . . . Khan, R. (2023). Organic and inorganic nanomaterials: fabrication, properties and applications. *RSC advances*, 13(20), 13735–13785. DOI: <https://doi.org/10.1039/d3ra01421e>.
- Amin, N., Zulkifli, S. Z., Azmai, M. N. A., Ismail, A. (2021). Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles on the Embryo of Javanese Medaka (*Oryzias javanicus* Bleeker, 1854): A Comparative Study. *Animals*, 11(8), 2170. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11082170>.
- Andelman, T., Gordonov, S., Busto, G., Moghe, P. V., Riman, R. E. (2009). Synthesis and Cytotoxicity of Y_2O_3 Nanoparticles of Various Morphologies. *Nanoscale Research Letters*, 5(2), 263–273. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11671-009-9445-0>.
- Araki, S. M., Baby, A. R. (2025). New Perspectives on Titanium Dioxide and Zinc Oxide as Inorganic UV Filters: Advances, Safety, Challenges, and Environmental Considerations. *Cosmetics*, 12(2), 77. DOI: <https://doi.org/10.3390/cosmetics12020077>.

- Bacchetta, R., Santo, N., Fascio, U., Moschini, E., Freddi, S., Chirico, G., . . . Mantecca, P. (2012). Nano-sized CuO, TiO₂ and ZnO affect *Xenopus laevis* development. *Nanotoxicology*, 6(4), 381–398. DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.579634>.
- Bacchetta, R., Moschini, E., Santo, N., Fascio, U., Del Giacco, L., Freddi, S., . . . Mantecca, P. (2014). Evidence and uptake routes for Zinc oxide nanoparticles through the gastrointestinal barrier in *Xenopus laevis*. *Nanotoxicology*, 8(7), 728–744. DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.824128>.
- Bai, W., Zhang, Z., Tian, W., He, X., Ma, Y., Zhao, Y., Chai, Z. (2010). Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1645–1654. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9740-9>.
- Bara, N., Eshwarmoorthy, M., Subaharan, K., Kaul, G. (2018). Mesoporous silica nanoparticle is comparatively safer than zinc oxide nanoparticle which can cause profound steroidogenic effects on pregnant mice and male offspring exposed in utero. *Toxicology and industrial health*, 34(8), 507–524. DOI: <https://doi.org/10.1177/0748233718757641>.
- Bardella, C., Pollard, P. J., Tomlinson, I. (2011). SDH mutations in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1807(11), 1432–1443. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbabo.2011.07.003>.
- Basler, M., Groettrup, M. (2021). On the Role of the Immunoproteasome in Protein Homeostasis. *Cells*, 10(11). DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10113216>.
- Bloise, E., Bhuiyan, M., Audette, M. C., Petropoulos, S., Javam, M., Gibb, W., Matthews, S. G. (2013). Prenatal endotoxemia and placental drug transport in the mouse: placental size-specific effects. *PloS one*, 8(6), e65728. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065728>.
- Bonfanti, P., Moschini, E., Saibene, M., Bacchetta, R., Rettighieri, L., Calabri, L., . . . Mantecca, P. (2015). Do Nanoparticle Physico-Chemical Properties and Developmental Exposure Window Influence Nano ZnO Embryotoxicity in *Xenopus laevis*? *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(8), 8828–8848. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph120808828>.
- Brun, N. R., Lenz, M., Wehrli, B., Fent, K. (2014). Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos:

- importance of zinc ions. *The Science of the total environment*, 476-477, 657–666. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.01.053>.
- Bugel, S. M., Tanguay, R. L., Planchart, A. (2014). Zebrafish: A marvel of high-throughput biology for 21st century toxicology. *Current environmental health reports*, 1(4), 341–352. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40572-014-0029-5>.
- Celá, P., Veselá, B., Matalová, E., Večeřa, Z., Buchtová, M. (2014). Embryonic toxicity of nanoparticles. *Cells, tissues, organs*, 199(1), 1–23. DOI: <https://doi.org/10.1159/000362163>.
- Cescon, M., Chen, P., Castagnaro, S., Gregorio, I., Bonaldo, P. (2016). Lack of collagen VI promotes neurodegeneration by impairing autophagy and inducing apoptosis during aging. *Aging*, 8(5), 1083–1101. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.100924>.
- Chandra, A., C, N. (2021). Review on nanoparticles technology and applications based on drug delivery. *IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology*, 6(3), 117–120. DOI: <https://doi.org/10.18231/j.ijcaap.2021.021>.
- Chen, T.-H., Lin, C.-C., Meng, P.-J. (2014). Zinc oxide nanoparticles alter hatching and larval locomotor activity in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of hazardous materials*, 277, 134–140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.12.030>.
- Chen, L., Wu, H., Hong, W., Aguilar, Z. P., Fu, F., Xu, H. (2021). The effect of reproductive toxicity induced by ZnO NPs in mice during early pregnancy through mitochondrial apoptotic pathway. *Environmental toxicology*, 36(6), 1143–1151. DOI: <https://doi.org/10.1002/tox.23113>.
- Chiechio, R. M., Caponnetto, A., Battaglia, R., Ferrara, C., Butera, E., Musumeci, P., . . . Contino, A. (2023). Internalization of Pegylated Er:Y2O3 Nanoparticles inside HCT-116 Cancer Cells: Implications for Imaging and Drug Delivery. *ACS applied nano materials*, 6(20), 19126–19135. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsanm.3c03609>.
- Choi, J. S., Kim, R.-O., Yoon, S., Kim, W.-K. (2016). Developmental Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles to Zebrafish (*Danio rerio*): A Transcriptomic Analysis. *PloS one*, 11(8), e0160763. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160763>.
- Çolakoglu, F., Selçuk, M. L. (2020). Morphohistometric Evaluation of Embryonic Development of Spleen in Chicken. *Kocatepe Veterinary Journal*. Artykuł w czasopiśmie internetowym. DOI: <https://doi.org/10.30607/kvj.765775>.

- d'Amora, M., Giordani, S. (2018). The Utility of Zebrafish as a Model for Screening Developmental Neurotoxicity. *Frontiers in neuroscience*, 12, 976. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00976>.
- D'Mello, S. R., Cruz, C. N., Chen, M.-L., Kapoor, M., Lee, S. L., Tyner, K. M. (2017). The evolving landscape of drug products containing nanomaterials in the United States. *Nature Nanotechnology*, 12(6), 523–529. DOI: <https://doi.org/10.1038/nnano.2017.67>.
- Du, J., Cai, J., Wang, S., You, H. (2017). Oxidative stress and apoptosis to zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS) and ZnO nanoparticles. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 30(2), 213–229. DOI: <https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.00669>.
- Du, J., Tang, J., Xu, S., Ge, J., Dong, Y., Li, H., Jin, M. (2018). Parental transfer of perfluorooctane sulfonate and ZnO nanoparticles chronic co-exposure and inhibition of growth in F1 offspring. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP*, 98, 41–49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.07.005>.
- Dwivedi, R., Maurya, A., Verma, A., Prasad, R., Bartwal, K. S. (2011). Microwave assisted sol–gel synthesis of tetragonal zirconia nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 509(24), 6848–6851. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2011.03.138>.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K. H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in enzymology*, 186, 407–421. DOI: [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-h](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-h).
- European Commission. (2016). Commission Implementing Regulation (EU) 2016/1095 of 6 July 2016 concerning the authorisation of Zinc acetate dihydrate, Zinc chloride anhydrous, Zinc oxide, Zinc sulphate heptahydrate, Zinc sulphate monohydrate, Zinc chelate of amino acids hydrate, Zinc chelate of protein hydrolysates, Zinc chelate of glycine hydrate (solid) and Zinc chelate of glycine hydrate (liquid) as feed additives for all animal species and amending Regulations (EC) No 1334/2003, (EC) No 479/2006, (EU) No 335/2010 and Implementing Regulations (EU) No 991/2012 and (EU) No 636/2013 (Text with EEA relevance) *Official Journal of the European Union* (European Commission 2016).
- European Commission. (2022). Commission Recommendation of 10 June 2022 on the definition of nanomaterial (Text with EEA relevance) 2022/C 229/01. *Official Journal of the European Union*.

- European Medicines Agency. (2020). ICH S5 (R3) Guideline on detection of reproductive and developmental toxicity for human pharmaceuticals.
- Fidan, P. A., Efe, E., Toprak, U., Aynur, J., Hamsici, Y., Coban, B. N., . . . Ozer, R. S. (2023). Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Neural Tube Development in Early Chicken Embryos. *Turkish neurosurgery*, 33(6), 1012–1016. DOI: <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.42897-22.2>.
- Food and Drug Administration (FDA). (2022). *Drug Products, Including Biological Products, that Contain Nanomaterials - Guidance for Industry*. Pobrane z strony internetowej od Food and Drug Administration (FDA): <https://www.fda.gov/files/drugs/published/Drug-Products--Including-Biological-Products--that-Contain-Nanomaterials---Guidance-for-Industry.pdf>
- Freeman, B. M., Vince, M. A. (1974). *Development of the Avian Embryo*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- George, S., Xia, T., Rallo, R., Zhao, Y., Ji, Z., Lin, S., . . . Nel, A. E. (2011). Use of a high-throughput screening approach coupled with in vivo zebrafish embryo screening to develop hazard ranking for engineered nanomaterials. *ACS nano*, 5(3), 1805–1817. DOI: <https://doi.org/10.1021/nn102734s>.
- Ghimire, S., Zhang, X., Zhang, J., Wu, C. (2022). Use of Chicken Embryo Model in Toxicity Studies of Endocrine-Disrupting Chemicals and Nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*, 35(4), 550–568. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.1c00399>.
- Giordo, R., Nasrallah, G. K., Al-Jamal, O., Paliogiannis, P., Pintus, G. (2020). Resveratrol Inhibits Oxidative Stress and Prevents Mitochondrial Damage Induced by Zinc Oxide Nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 3838. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21113838>.
- Girigoswami, K., Viswanathan, M., Murugesan, R., Girigoswami, A. (2015). Studies on polymer-coated zinc oxide nanoparticles: UV-blocking efficacy and in vivo toxicity. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 56, 501–510. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.017>.
- Gleiter, H. (1995). Nanostructured materials: state of the art and perspectives. *Nanostructured Materials*, 6(1-4), 3–14. DOI: [https://doi.org/10.1016/0965-9773\(95\)00025-9](https://doi.org/10.1016/0965-9773(95)00025-9).

- Govindasamy, R., Govindarasu, M., Alharthi, S. S., Mani, P., Bernaurdshaw, N., Gomathi, T., . . . Thiruvengadam, M. (2022). Sustainable Green Synthesis of Yttrium Oxide (Y_2O_3) Nanoparticles Using Lantana camara Leaf Extracts: Physicochemical Characterization, Photocatalytic Degradation, Antibacterial, and Anticancer Potency. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 12(14). DOI: <https://doi.org/10.3390/nano12142393>.
- Gregorio, I., Braghetta, P., Bonaldo, P., Cescon, M. (2018). Collagen VI in healthy and diseased nervous system. *Disease models & mechanisms*, 11(6). DOI: <https://doi.org/10.1242/dmm.032946>.
- Guo, D., Bi, H., Liu, B., Wu, Q., Wang, D., Cui, Y. (2013). Reactive oxygen species-induced cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles in rat retinal ganglion cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 27(2), 731–738. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.12.001>.
- Hadrava Vanova, K., Kraus, M., Neuzil, J., Rohlena, J. (2020). Mitochondrial complex II and reactive oxygen species in disease and therapy. *Redox report : communications in free radical research*, 25(1), 26–32. DOI: <https://doi.org/10.1080/13510002.2020.1752002>.
- Hao, Y., Liu, J., Feng, Y., Yu, S., Zhang, W., Li, L., . . . Zhao, Y. (2017). Molecular evidence of offspring liver dysfunction after maternal exposure to zinc oxide nanoparticles. *Toxicology and applied pharmacology*, 329, 318–325. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.06.021>.
- He, Y., Liu, J.-C., Luo, L., Wang, Y.-G., Zhu, J., Du, Y., . . . Wang, C. (2018). Size-dependent dynamic structures of supported gold nanoparticles in CO oxidation reaction condition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(30), 7700–7705. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.1800262115>.
- Hernandez, R., Brown, D. T. (2010). Growth and maintenance of chick embryo fibroblasts (CEF). *Current protocols in microbiology*, Appendix 4, 4I. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca04is17>.
- Hoetelmans, R., van Slooten, H. J., Keijzer, R., Erkeland, S., van de Velde, C. J., Dierendonck, J. H. (2000). Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell death and differentiation*, 7(4), 384–392. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400664>.

- Hong, J.-S., Park, M.-K., Kim, M.-S., Lim, J.-H., Park, G.-J., Maeng, E.-H., . . . Shin, H.-C. (2014). Prenatal development toxicity study of zinc oxide nanoparticles in rats. *International journal of nanomedicine*, 9 Suppl 2, 159–171. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S57932>.
- Hua, J., Vijver, M. G., Richardson, M. K., Ahmad, F., Peijnenburg, W. J. G. M. (2014). Particle-specific toxic effects of differently shaped zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryos (*Danio rerio*). *Environmental toxicology and chemistry*, 33(12), 2859–2868. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.2758>.
- Jo, E., Seo, G., Kwon, J.-T., Lee, M., Lee, B. c., Eom, I., . . . Choi, K. (2013). Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats. *The Journal of toxicological sciences*, 38(4), 525–530. DOI: <https://doi.org/10.2131/jts.38.525>.
- Jong, W. H. de, Borm, P. J. A. (2008). Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *International journal of nanomedicine*, 3(2), 133–149. DOI: <https://doi.org/10.2147/ijn.s596>.
- Kannan, S. K., Sundrarajan, M. (2015). Biosynthesis of Yttrium oxide nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extract. *Bulletin of Materials Science*, 38(4), 945–950. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12034-015-0927-7>.
- Karthiga P., Ponnaniakajamdeen M., Samuel Rajendran, R., Annadurai, G., Rajeshkumar, S. (2018). Characterization and toxicology evaluation of zirconium oxide nanoparticles on the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Drug and chemical toxicology*, 42(1), 104–111. DOI: <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1523186>.
- Kaszewski, J., Godlewski, M. M., Witkowski, B. S., Słowska, A., Wolska-Kornio, E., Wachnicki, Ł., . . . Godlewski, M. (2016). Y₂O₃:Eu nanocrystals as biomarkers prepared by a microwave hydrothermal method. *Optical Materials*, 59, 157–164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2015.12.007>.
- Kaszewski, J., Borgstrom, E., Witkowski, B. S., Wachnicki, Ł., Kiełbik, P., Slonska, A., . . . Godlewski, M. (2017). Terbium content affects the luminescence properties of ZrO₂:Tb nanoparticles for mammary cancer imaging in mice. *Optical Materials*, 74, 16–26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2017.04.044>.
- Khajelakzay, M., Shoja Razavi, R., Barekat, M., Naderi, M., Milani, M. (2016). Synthesis of Ytria Nanopowders by Two Precipitation Methods and Investigation of Synthesis

- Conditions. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 13(1), 209–218. DOI: <https://doi.org/10.1111/ijac.12430>.
- Kielbik, P., Kaszewski, J., Rosowska, J., Wolska, E., Witkowski, B. S., Gralak, M. A., . . . Godlewski, M. M. (2017a). Biodegradation of the ZnO:Eu nanoparticles in the tissues of adult mouse after alimentary application. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 13(3), 843–852. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.11.002>.
- Kiełbik P., Kaszewski J., Witkowski B. S., Gajewski Z., Gralak M. A., Godlewski M., Godlewski M. M.. (2017b). *Cytometric analysis of Zn-based nanoparticles for biomedical applications*. W: *Microscopy and imaging science: practical approaches to applied research and education, Microscopy Book Series #7*, Ed: A. Méndez-Vilas. 7, Spain, 2017: 89–96, ISBN-13: 978-84-942134-9-6.
- Kielbik, P., Kaszewski, J., Dominiak, B., Damentko, M., Serafińska, I., Rosowska, J., . . . Godlewski, M. M. (2019a). Preliminary Studies on Biodegradable Zinc Oxide Nanoparticles Doped with Fe as a Potential Form of Iron Delivery to the Living Organism. *Nanoscale Research Letters*, 14(1), 373. DOI: <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3217-2>.
- Kielbik, P., Kaszewski, J., Dabrowski, S., Faundez, R., Witkowski, B. S., Wachnicki, L., . . . Godlewski, M. M. (2019b). Transfer of orally administered ZnO:Eu nanoparticles through the blood-testis barrier: the effect on kinetic sperm parameters and apoptosis in mice testes. *Nanotechnology*, 30(45), 455101. DOI: <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab36f4>.
- Kim, R.-O., Choi, J. S., Kim, B.-C., Kim, W.-K. (2017). Comparative Analysis of Transcriptional Profile Changes in Larval Zebrafish Exposed to Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Sulfate. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 98(2), 183–189. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1995-0>.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., Schilling, T. F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203(3), 253–310. DOI: <https://doi.org/10.1002/aja.1002030302>.
- Kteeba, S. M., El-Adawi, H. I., El-Rayis, O. A., El-Ghobashy, A. E., Schuld, J. L., Svoboda, K. R., Guo, L. (2017). Zinc oxide nanoparticle toxicity in embryonic zebrafish: Mitigation with different natural organic matter. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 230, 1125–1140. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.042>.

- Kteeba, S. M., El-Ghobashy, A. E., El-Adawi, H. I., El-Rayis, O. A., Sreevidya, V. S., Guo, L., Svoboda, K. R. (2018). Exposure to ZnO nanoparticles alters neuronal and vascular development in zebrafish: Acute and transgenerational effects mitigated with dissolved organic matter. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 242(Pt A), 433–448. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.030>.
- Lacave, J. M., Retuerto, A., Vicario-Parés, U., Gilliland, D., Oron, M., Cajaraville, M. P., Orbea, A. (2016). Effects of metal-bearing nanoparticles (Ag, Au, CdS, ZnO, SiO₂) on developing zebrafish embryos. *Nanotechnology*, 27(32), 325102. DOI: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/32/325102>.
- Lee, J., Yu, W.-J., Song, J., Sung, C., Jeong, E. J., Han, J.-S., . . . Park, K. (2016). Developmental toxicity of intravenously injected zinc oxide nanoparticles in rats. *Archives of pharmacal research*, 39(12), 1682–1692. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0767-z>.
- Li, J., Chen, Z., Huang, R., Miao, Z., Cai, L., Du, Q. (2018). Toxicity assessment and histopathological analysis of nano-ZnO against marine fish (*Mugilogobius chulae*) embryos. *Journal of environmental sciences (China)*, 73, 78–88. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jes.2018.01.015>.
- Liu, J., Zhao, Y., Ge, W., Zhang, P., Liu, X., Zhang, W., . . . Shen, W. (2017). Oocyte exposure to ZnO nanoparticles inhibits early embryonic development through the γ -H2AX and NF- κ B signaling pathways. *Oncotarget*, 8(26), 42673–42692. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17349>.
- Liu, L., Wang, S., Zhang, B., Jiang, G., Yang, J. (2022). Supercritical hydrothermal synthesis of nano-ZrO₂: Influence of technological parameters and mechanism. *Journal of Alloys and Compounds*, 898, 162878. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.162878>.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402–408. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Lyashenko, E. N., Uzbekova, L. D., Polovinkina, V. V., Dorofeeva, A. K., Ibragimov, S.-U. S.-U., Tatamov, A. A., . . . Maslova, A. Y. (2023). Study of the Embryonic Toxicity of TiO₂ and ZrO₂ Nanoparticles. *Micromachines*, 14(2). DOI: <https://doi.org/10.3390/mi14020363>.

- Mantecca, P., Moschini, E., Bonfanti, P., Fascio, U., Perelshtein, I., Lipovsky, A., . . . Gedanken, A. (2015). Toxicity Evaluation of a New Zn-Doped CuO Nanocomposite With Highly Effective Antibacterial Properties. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 146(1), 16–30. DOI: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv067>.
- Mesquita, C. S., Oliveira, R., Bento, F., Geraldo, D., Rodrigues, J. V., Marcos, J. C. (2014). Simplified 2,4-dinitrophenylhydrazine spectrophotometric assay for quantification of carbonyls in oxidized proteins. *Analytical biochemistry*, 458, 69–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.034>.
- Mosavari, M., Khajehhaghverdi, A., Mehdinavaz Aghdam, R. (2023). Nano-ZrO₂: A review on synthesis methodologies. *Inorganic Chemistry Communications*, 157, 111293. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111293>.
- Müller, E. K., Gräfe, C., Wiekhorst, F., Bergemann, C., Weidner, A., Dutz, S., Clement, J. H. (2018). Magnetic Nanoparticles Interact and Pass an In Vitro Co-Culture Blood-Placenta Barrier Model. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 8(2). DOI: <https://doi.org/10.3390/nano8020108>.
- Nawaji, T., Mizoguchi, N., Adachi, R., Teraoka, H. (2024). Toxicokinetics of a developmental toxicity test in zebrafish embryos and larvae: Relationship with drug exposure in humans and other mammals. *Current research in toxicology*, 7, 100187. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crttox.2024.100187>.
- Nubian, K., Saruhan, B., Kanka, B., Schmücker, M., Schneider, H., Wahl, G. (2000). Chemical vapor deposition of ZrO₂ and C/ZrO₂ on mullite fibers for interfaces in mullite/aluminosilicate fiber-reinforced composites. *Journal of the European Ceramic Society*, 20(5), 537–544. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0955-2219\(99\)00251-4](https://doi.org/10.1016/S0955-2219(99)00251-4).
- Oro-Carretero, P. de, Sanz-Landaluze, J. (2023). Bioaccumulation and Biotransformation of BDE-47 Using Zebrafish Eleutheroembryos (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 42(4), 835–845. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5569>.
- Osmond, M. J., McCall, M. J. (2010). Zinc oxide nanoparticles in modern sunscreens: an analysis of potential exposure and hazard. *Nanotoxicology*, 4(1), 15–41. DOI: <https://doi.org/10.3109/17435390903502028>.

- Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B. (2012). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9). DOI: <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>.
- Puspasari, V., Ridhova, A., Hermawan, A., Amal, M. I., Khan, M. M. (2022). ZnO-based antimicrobial coatings for biomedical applications. *Bioprocess and biosystems engineering*, 45(9), 1421–1445. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00449-022-02733-9>.
- Reif, D. M., Truong, L., Mandrell, D., Marvel, S., Zhang, G., Tanguay, R. L. (2016). High-throughput characterization of chemical-associated embryonic behavioral changes predicts teratogenic outcomes. *Archives of toxicology*, 90(6), 1459–1470. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1554-1>.
- Rodriguez, J. A., Liu, G., Jirsak, T., Hrbek, J., Chang, Z., Dvorak, J., Maiti, A. (2002). Activation of gold on titania: adsorption and reaction of SO₂ on Au/TiO₂(110). *Journal of the American Chemical Society*, 124(18), 5242–5250. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja020115y>.
- Rozporządzenie Ministra Gospodarki Morskiej i Żeglugi Śródlądowej z dnia 12 lipca 2019 r. w sprawie substancji szczególnie szkodliwych dla środowiska wodnego oraz warunków, jakie należy spełnić przy wprowadzaniu do wód lub do ziemi ścieków, a także przy odprowadzaniu wód opadowych lub roztopowych do wód lub do urządzeń wodnych (Rozporządzenie Ministra Dz.U. 2019 poz. 1311 2019).
- Ruttkay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., . . . Kizek, R. (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 6044–6066. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>.
- Sajtos, Z., Fehér, M., Molnár, Á., Stündl, L., Nagy, L. N., Martins, J. C., . . . Baranyai, E. (2021). The retention of Zr from potential therapeutic silica-zirconia core-shell nanoparticles in aquatic organisms. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 16, 100572. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100572>.
- Sarnella, A., Ferrara, Y., Terlizzi, C., Albanese, S., Monti, S., Licenziato, L., Mancini, M. (2024). The Chicken Embryo: An Old but Promising Model for In Vivo Preclinical Research. *Biomedicines*, 12(12). DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines12122835>.
- Schaur, R. J., Siems, W., Bresgen, N., Eckl, P. M. (2015). 4-Hydroxy-nonenal-A Bioactive Lipid Peroxidation Product. *Biomolecules*, 5(4), 2247–2337. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom5042247>.

- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health (SCENIHR). (2010). *Scientific Basis for the Definition of the Term “nanomaterial”*. Pobrane z strony internetowej od Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/emerging/docs/scenih_r_o_032.pdf
- Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) modified Opinion on: The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies (European Commission 2006).
- Silva, F. F. V. E., Padín-Iruegas, M. E., Caponio, V. C. A., Lorenzo-Pouso, A. I., Saavedra-Nieves, P., Chamorro-Petronacci, C. M., . . . Pérez-Sayáns, M. (2022). Caspase 3 and Cleaved Caspase 3 Expression in Tumorigenesis and Its Correlations with Prognosis in Head and Neck Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International journal of molecular sciences*, 23(19). DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms231911937>.
- Singh, K., Raghav, A., Jha, P. K., Satapathi, S. (2019). Effect of size and charge asymmetry on aggregation kinetics of oppositely charged nanoparticles. *Scientific Reports*, 9(1), 3762. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40379-y>.
- Song, X., Shang, P., Sun, Z., Lu, M., You, G., Yan, S., . . . Zhou, H. (2019). Therapeutic effect of yttrium oxide nanoparticles for the treatment of fulminant hepatic failure. *Nanomedicine*, 14(19), 2519–2533. DOI: <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0154>.
- Spence, A. R., Hopkins, G. R., Neuman-Lee, L. A., Smith, G. D. S., Brodie, E. D., French, S. S. (2016). Detrimental Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Amphibian Life Stages. *Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology*, 325(7), 415–424. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.2026>.
- Surai, P. F., Kochish, I. I., Fisinin, V. I., Kidd, M. T. (2019). Antioxidant Defence Systems and Oxidative Stress in Poultry Biology: An Update. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(7). DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox8070235>.
- Taft, R. A. (2008). Virtues and limitations of the preimplantation mouse embryo as a model system. *Theriogenology*, 69(1), 10–16. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.032>.
- Teng, C., Jia, J., Wang, Z., Sharma, V. K., Yan, B. (2019). Size-dependent maternal-fetal transfer and fetal developmental toxicity of ZnO nanoparticles after oral exposures in

- pregnant mice. *Ecotoxicology and environmental safety*, 182, 109439. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109439>.
- Vance, M. E., Kuiken, T., Vejerano, E. P., McGinnis, S. P., Hochella, M. F., Rejeski, D., Hull, M. S. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein journal of nanotechnology*, 6, 1769–1780. DOI: <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>.
- Verma, S. K., Panda, P. K., Jha, E., Suar, M., Parashar, S. K. S. (2017). Altered physiochemical properties in industrially synthesized ZnO nanoparticles regulate oxidative stress; induce in vivo cytotoxicity in embryonic zebrafish by apoptosis. *Scientific reports*, 7(1), 13909. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14039-y>.
- Wang, J., Zhu, X., Chen, Y., Chang, Y. (2012). Application of Embryonic and Adult Zebrafish for Nanotoxicity Assessment. W: J. Reineke (red.), *Methods in Molecular Biology: nr. 926. Nanotoxicity* (nr. 926, s. 317–329). Totowa, NJ: Humana Press. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_20.
- Wang, J., Wu, X., Fang, J., Li, Q. (2024). Intervention of exogenous VEGF protect brain microvascular endothelial cells from hypoxia-induced injury by regulating PLC γ /RAS/ERK and PI3K/AKT pathways. *Experimental gerontology*, 192, 112452. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2024.112452>.
- Wehmas, L. C., Anders, C., Chess, J., Punnoose, A., Pereira, C. B., Greenwood, J. A., Tanguay, R. L. (2015). Comparative Metal Oxide Nanoparticle Toxicity Using Embryonic Zebrafish. *Toxicology reports*, 2, 702–715. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.03.015>.
- Yan, Y., Wang, G., Huang, J., Zhang, Y., Cheng, X., Chuai, M., . . . Yang, X. (2020). Zinc oxide nanoparticles exposure-induced oxidative stress restricts cranial neural crest development during chicken embryogenesis. *Ecotoxicology and environmental safety*, 194, 110415. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110415>.
- Yang, H.-B., Kim, H.-Y., Kim, S.-H., Kim, S.-Y. (2023). Suppressive role of vascular endothelial growth factor on intestinal apoptosis in induced necrotizing enterocolitis in rats. *Annals of surgical treatment and research*, 105(3), 157–164. DOI: <https://doi.org/10.4174/astr.2023.105.3.157>.

- Yao, H., Xu, X., Zhou, Y., Xu, C. (2018). Impacts of isopyrazam exposure on the development of early-life zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Pollution Research*, 25(24), 23799–23808. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2449-5>.
- Zhao, X., Wang, S., Wu, Y., You, H., Lv, L. (2013). Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo-larval zebrafish. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 136-137, 49–59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.03.019>.
- Zhao, X., Ren, X., Zhu, R., Luo, Z., Ren, B. (2016). Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria-mediated apoptosis in zebrafish embryos. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 180, 56–70. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.013>.
- Zhou, Z., Son, J., Harper, B., Zhou, Z., Harper, S. (2015). Influence of surface chemical properties on the toxicity of engineered zinc oxide nanoparticles to embryonic zebrafish. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 6, 1568–1579. DOI: <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.160>.
- Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y., Lang, Y. (2008). Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 43(3), 278–284. DOI: <https://doi.org/10.1080/10934520701792779>.
- Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y., Chen, Y. (2009). The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Nanotechnology*, 20(19), 195103. DOI: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/19/195103>.