

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

w Warszawie

Instytut Nauk o Zwierzętach

Hubert Szudrowicz

Wpływ nanocząstek srebra na danio
pręgowane (*Danio rerio*) podczas
długoterminowej ekspozycji.

Effects of silver nanoparticles on zebrafish (*Danio rerio*) during
long-term exposure.

Praca doktorska

Doctoral thesis

Praca wykonana pod kierunkiem

Promotora: dr hab. Macieja Kamaszewskiego prof. uczelni

Promotora pomocniczego: dr inż. Roberta Kasprzaka

Samodzielny Zakład Ichtiologii i Biotechnologii w
Akwakulturze, Instytut Nauk o Zwierzętach

Warszawa, rok 2023

Oświadczenie promotora pracy

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data

Podpis promotora pracy

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza praca doktorska została napisana przez mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego w wyższej uczelni.

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

Data

Podpis autora pracy

Streszczenie

Wpływ nanocząstek srebra na danio pręgowane (*Danio rerio*) podczas długoterminowej ekspozycji.

Rozwój procesów umożliwiających produkcję oraz wykorzystanie nanocząstek srebra spopularyzował ich użycie w różnych produktach konsumenckich, a tym samym zwiększył prawdopodobieństwo ich emisji do środowiska. Analizy naukowe sugerują, że nadal istnieją luki w ocenie ryzyka związanego z długoterminowym charakterem ekspozycji dla organizmów wodnych. Celem pracy była analiza wpływu nanocząstek srebra na przeżywalność, rozwój i homeostazę danio pręgowanego, zaczynając od stadium larwalnego, a kończąc na okresie uzyskania dojrzałości płciowej. Ryby eksponowane były na działanie ksenobiotyków przez sto dni, a w toku badań laboratoryjnych posłużono się biomarkerami histologicznymi, biochemicznymi oraz genetycznymi. Wyniki wskazują na toksyczny wpływ nanocząstek srebra na skutek wywoływania stresu oksydacyjnego, pobudzenia układu immunologicznego, zaburzeń w rozwoju i dojrzewaniu płciowym oraz wskazano nieliniowy charakter toksyczności względem stężenia tego ksenobiotyku.

Słowa kluczowe – danio pręgowane; nanocząstki srebra; ekotoksykologia; długoterminowa ekspozycja.

Summary

Effects of silver nanoparticles on zebrafish (*Danio rerio*) during long-term exposure.

The development of processes enabling the production and use of silver nanoparticles has popularized their use in a variety of consumer products and thus increased the likelihood of their emission into the environment. Scientific analyses suggest that there are still gaps in assessing the risks associated with the long-term nature of exposure to aquatic organisms. The aim of this study was to analyze the effects of nanoparticles on the survival, development and homeostasis of the zebrafish at different stages of life, beginning at the larval stage and ending at sexual maturity. Fish were exposed to xenobiotics for one hundred days. Various biomarkers were used in the course of laboratory studies. The results indicate the toxic effects of silver nanoparticles through the induction of oxidative stress, stimulation of the immune system, disruption of development and sexual maturation, and the non-linear nature of toxicity relative to the concentration of this xenobiotic is demonstrated.

Keywords - zebrafish; silver nanoparticles; ecotoxicology; long-term exposure.

Spis treści

1.	Wprowadzenie i cel pracy	6
2.	Przegląd literatury	8
2.1.	Srebro i jego właściwości.....	8
2.2.	Toksyczność srebra	9
2.3.	Nanocząstki srebra.....	12
2.4.	Obszary zastosowań nanocząstek srebra	13
2.5.	Parametry nanocząstek i sposoby ich ewaluacji.....	14
2.6.	Sposoby wytwarzania nanocząstek	15
2.7.	Zagrożenia wywoływane przez nanocząstki srebra.....	18
2.8.	Toksyczny potencjał nanocząstek srebra.....	19
2.9.	Ocena ryzyka ekologicznego lub środowiskowego	22
2.10.	Uzasadnienie obranej metodyki.....	24
3.	Materiał i metody	27
3.1.	Materiały i schemat doświadczenia.....	27
3.2.	Analizy histologiczne	31
3.3.	Analizy biochemiczne	32
3.4.	Analiza ekspresji genów	36
3.5.	Analiza statystyczna	37
4.	Wyniki	38
4.1.	Przeżywalność i śmiertelność ryb podczas doświadczenia	39
4.2.	Tempo wzrostu ryb i rozkład płci w populacji	39
4.3.	Analizy histologiczne	43
4.4.	Analizy biochemiczne	47
4.5.	Wyniki analiz genetycznych.....	47
5.	Dyskusja	50
5.1.	Parametry ciała	51
5.2.	Rozkład fenotypu płci.....	52
5.3.	Biomarkery histologiczne.....	54
5.4.	Niespecyficzne biomarkery biochemiczne	57
5.5.	Niespecyficzne biomarkery genetyczne	59
5.6.	Biomarkery stresu oksydacyjnego	59
5.7.	Jony srebra a nanocząstki srebra	61
5.8.	Potencjalne przyczyny nieliniowości toksyczności nanocząstek srebra.....	62
6.	Stwierdzenia i wnioski	65
7.	Bibliografia.....	66

1. Wprowadzenie i cel pracy

Rozwój technologii w zakresie produkcji i wykorzystania materiałów, tym możliwość ich miniaturyzacji, zaowocował powstaniem produktów nowej generacji - nanomateriałów. Nanomateriały są strukturami charakteryzującymi się stosunkowo małymi rozmiarami w odniesieniu do swoich makrocząsteczkowych odpowiedników, definiowane są jako cząstki o przynajmniej jednym wymiarze (długości, szerokości czy wysokości) mniejszym niż 100 nm. Następstwem tak małych rozmiarów jest powiększenie się stosunku powierzchni do objętości nanocząstki, a tym samym zmiana części jego właściwości fizykochemicznych (Kreuter, 2007). Rosnące zastosowanie nanomateriałów, zarówno w kontekście ilościowego wykorzystania, jak i pod względem różnorodności produktów, prowadzi do zróżnicowania źródeł emisji zanieczyszczeń środowiska. Do kluczowych produktów zawierających nanocząstki zaliczyć można powłoki, farby i pigmenty, dodatki katalityczne oraz kosmetyki. Uwalniają się one do środowiska w długim cyklu na poprzez jedną z trzech dróg: a) podczas produkcji surowców i produktów je zawierających; b) podczas użytkowania; oraz c) podczas utylizacji odpadów (Bundschuh i wsp., 2018). Nanocząstki srebra znalazły szerokie zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu, przede wszystkim w produkcji elektroniki, ale ze względu na swoje bakterioobójcze właściwości stosowane są również w biobójczych tworzywach i tekstyliach, szczególnie materiałach medycznych (Fabrega i wsp., 2011). Od początku XXI wieku przeprowadzono wiele badań naukowych, w których dokonano ewaluacji przypadków zanieczyszczenia środowiska różnymi nanocząstkami (w tym srebra), lecz mimo to nadal istnieje znaczący deficyt wiedzy w tym zakresie, co utrudnia prawidłowe modelowanie zagrożeń ze strony tych substancji. Większość publikacji naukowych opiera się bowiem na testach toksyczności ostrej, a więc krótkoterminowej (od trzech godzin do siedmiu dni ekspozycji). Czynnikiem czasu nie jest zaś przeważnie uwzględniany w analizach dotyczących zdolności nanocząstek do akumulacji w organizmach i do wywoływania przez nie efektu toksycznego wskutek chronicznego narażenia. Takie uproszczenie jest ograniczonym odwzorowaniem rzeczywistości, gdyż w kontekście wszechobecnych odpadów pochodzących od materiałów codziennego użytku można wręcz mówić o stałym zanieczyszczeniu środowiska, wywierającym wpływ przez całą długość życia organizmów w nim przebywających, niezależnie od ich stadiów rozwojowych (Banu i wsp., 2021; Cambier i wsp., 2018; Chakraborty i wsp., 2016; Samim i wsp., 2022).

W związku z powyższym celem niniejszej pracy doktorskiej jest analiza wpływu nanocząstek i jonów srebra na przeżywalność, rozwój i homeostazę danio pręgowanego podczas długoterminowej ekspozycji.

Przyjęta została hipoteza badawcza mówiąca, że długoterminowa ekspozycja na niskie, nawiązujące do obserwowanych w środowisku stężenia nanocząstek srebra zaburza homeostazę organizmów wodnych oraz wywołuje odpowiedź fizjologiczną organizmu.

2. Przegląd literatury

2.1. Srebro i jego właściwości

Srebro jest jednowartościowym pierwiastkiem z grupy jedenastej metali przejściowych. Charakteryzuje się między innymi: wysokim połyskiem, srebrzystobiałym kolorem, wysoką przewodnością elektryczną i termiczną. Swoimi właściwościami srebro jest zbliżone do złota i miedzi. Ze względu na swoją względnie niską reaktywność, wysoką ciągliwość oraz kowalność, srebro zaliczane jest do grupy metali szlachetnych, dlatego też już od wieków stosowane było powszechnie w złotnictwie, do wytwarzania takich artykułów luksusowych jak np. biżuteria czy zastawy stołowe. Ponadto, metal ten wykazuje silne właściwości bakterio- i grzybobójcze, dzięki czemu współcześnie używany jest w medycynie, przemyśle spożywczym i tekstylnym (Melaiye i Youngs, 2005). Historię jego zagospodarowania przez ludzkość można podzielić na pięć głównych etapów: a) historii starożytnej; b) teorii zakaźnej chorób; c) srebrnego renesansu lat sześćdziesiątych dwudziestego wieku; d) drugiej generacji produktów pokrytych srebrem pod koniec dwudziestego wieku; oraz e) obecnych zastosowań (Barillo i Marx, 2014). Każdy z tych okresów charakteryzował się wprawdzie innym stopniem zaawansowania technologicznego wykorzystania srebra, ale zawsze głównym celem była redukcja rozprzestrzeniania się drobnoustrojów. Jednym z najstarszych sposobów wykorzystania tych właściwości srebra była dezynfekcja oraz przechowywanie wody pitnej. Starożytni Grecy oraz Rzymianie przetrzymywali ją w srebrnych naczyniach celem zachowania jej świeżości. W czasach Aleksandra Wielkiego podczas wypraw wojennych nie tylko spożywano wodę z podobnych naczyń, ale też praktykowano dodawanie srebrnych monet do zbiorników magazynujących o większych objętościach (Barillo i Marx, 2014; Melaiye i Youngs, 2005). We wczesnym okresie nowożytnym skupiono się już na rozwoju sposobów wykorzystywania srebra do zwiększania poziomu higieny osobistej oraz przyspieszania procesu gojenia ran. Zarówno w XIX jak i XX wieku głównym produktem wykorzystywanym w medycynie były wodne roztwory azotanu srebra. Zapobiegały one infekcjom oczu (zwłaszcza u noworodków), podawane były też bezpośrednio na rany cięte, poparzenia i obtarcia. Srebro zostało zintegrowane również z innymi materiałami, np. foliami nylonowymi, umożliwiając wytwarzanie długoterminowych, aseptycznych opatrunków, które miały szczególnie istotne znaczenie w obfitujących w konflikty zbrojne czasach przed opracowaniem i upowszechnieniem szerokiej gamy antybiotyków, co nastąpiło dopiero po zakończeniu II wojny światowej (Barillo i wsp., 2014; Silver i wsp., 2006).

Współcześnie, raptownie postępujący rozwój technologiczny pozwolił na wykroczenie poza opisane powyżej, względnie nieskomplikowane metody wykorzystania srebra, poprzez opracowanie licznych i odmiennych w swej charakterystyce polimerów, używanych w przemyśle tekstylnym i medycznym do produkcji kremów czy filtrów do wody. Ponadto, ze względu na swoje podstawowe parametry fizykochemiczne srebro stosowane jest też w wielu zaawansowanych urządzeniach, wymagających doskonałej zdolności odbijania światła (np. w teleskopach), a także elementach elektronicznych charakteryzujących się dobrą przewodnością cieplną (np. w pastach termoprzewodzących) czy w fotografii (Lakshmanan i wsp., 2019).

2.2. Toksyczność srebra

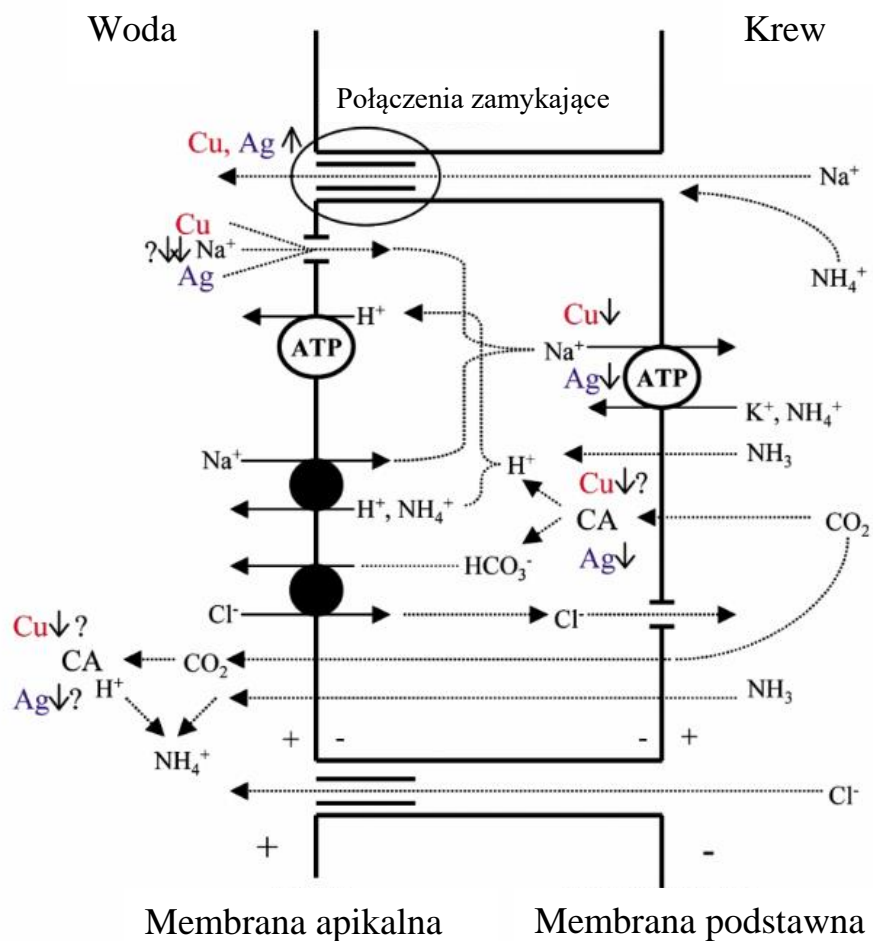
Srebro, niezależnie od swojej formy, zarówno dla organizmów lądowych, jak i wodnych, jest ksenobiotykiem, a więc pierwiastkiem zupełnie obcym. Oznacza to, że nie zalicza się ono do tzw. makro- i mikroelementów, a nawet wymyka się z klasycznego podziału mikroelementów na trzy podgrupy: istotnych, potencjalnie istotnych i szkodliwych (Mehri, 2020). W przypadku organizmów lądowych jedynie sporadycznie zdarzają się przypadki śmiertelnych zatruc. Medycyna ludzka obserwuje jednak zjawisko chorobowe zwane agyrią- są to nieodwracalne zmiany koloru skóry na skutek depozycji srebra w komórkach pigmentowych - melanoforach, na skutek powinowactwa jonów srebra do białek, a zwłaszcza do melaniny (Mota i Dinis-Oliveira, 2021). Powyższe informacje wydają się jednak mało istotne w zestawieniu z ekotoksykologicznym kontekstem infiltracji środowiska wodnego tym pierwiastkiem, dla którego to środowiska stanowi on potencjalnie duże, znane zagrożenie. Z tego względu srebro klasyfikowane jest jako zanieczyszczenie specyficzne, wymagające wyjątkowego traktowania celem monitorowania jego stężenia w zbiornikach wodnych (McGillicuddy i wsp., 2017; Ranjan i wsp., 2019). Występuje ono zarówno w toni wodnej, jak i w osadach dennych zbiorników, w dotychczas opisywanych (z wyłączeniem nanocząstek srebra) trzech głównych formach: jonowej, chlorków i tiosulfatów, przy czym forma jonowa jest najgroźniejsza dla organizmów wodnych (Hogstrand i Wood, 1998).

Dróg penetracji tego pierwiastka w głąb organizmu przyjmuje się kilka: przez skórę, układ pokarmowy i przede wszystkim skrzela (Ratte, 1999). Ponadto, parametry fizykochemiczne takie jak twardość wody, odczyn (pH), temperatura czy naświetlenie modulują toksyczny wpływ srebra na organizmy wodne. Badania naukowe skupiające się wokół toksyczności różnych form srebra wskazują, że trzema najważniejszymi czynnikami

mogącymi wpływać na jej poziom są stężenia: a) chloru, b) wapnia oraz c) organicznych form węgla zawieszonych w toni wody. Badania przeprowadzone na strzeblach grubogłowych (*Pimephales promelas*) oraz pstrągach tęczowych (*Oncorhynchus mykiss*) potwierdziły zdecydowane obniżenie toksyczności z jednoczesnym wzrostem stężenia jonów chloru w wodzie. Zjawisko to uzasadnione zostało zdolnością do wylapywania toksycznych jonów srebra przez aniony chlorkowe i strącanie ich do bardzo słabo rozpuszczalnej w wodzie soli, bezpieczniejszych dla organizmów. Obecność jonów wapnia wykazuje natomiast pomniejszy efekt chroniący ryby wskutek ich stabilizującego wpływu na pracę nabłonka skrzeli wobec ekspozycji na działanie czynnika toksycznego. Wolne organiczne formy węgla stanowią zaś osobny przykład mechanizmów stabilizujących i przeciwdziałających toksyczności srebra. Niezależnie od przybranej formy, metal ten tworzy kompleksy z węglowodorami, które nie są absorbowane przez nabłonki narządów ryb, co jednocześnie zapobiega jego penetracji w głąb organizmu (Bury i wsp., 1999; Erickson i wsp., 1998; Wood i wsp., 1999). W innym badaniu wykazano natomiast zdecydowane obniżenie toksyczności jonowych form srebra dla ryb żyjących w środowisku morskim (LC 50 ang. *lethal concentration* 50, czyli dawka substancji, w której umiera 50% badanej populacji: 330-2700 µg Ag/L), w porównaniu do wód słodkich (LC 50: 5-70 µg Ag/L), ze względu na zwiększone stężenie jonów chloru (Hogstrand i Wood, 1998).

Mechanizm toksycznego działania srebra (przede wszystkim jonów) na organizmy żywe jest wielotorowy, a w związku z tym wysoce skomplikowany do scharakteryzowania. Do najważniejszych składowych tego procesu zalicza się zjawiska: bioakumulacji oraz wywoływania zaburzeń homeostazy pomp jonowych w obrębie całego organizmu (Ratte, 1999). Bioakumulacja może być definiowana jako całkowita akumulacja danej substancji lub pierwiastków w badanym organizmie, jego narządach czy tkankach, przy spełnieniu założenia, że stężenie substancji badanej jest wyższe niż w danym biotopie. Zjawisko to zachodzi po wystawieniu organizmu na działanie danego ksenobiotyku, a jego intensywność jest wysoce zależna nie tylko od warunków środowiskowych, ale również od predyspozycji danych gatunków do jego poboru, tempa metabolizmu czy zdolności wydalania. Warto wspomnieć, że nie wszystkie substancje mają jednakową zdolność do bioakumulacji w obrębie tego samego gatunku, a substancje zakumulowane w osobnikach w potencjalnie szkodliwych stężeniach wywołują efekt toksyczny nawet dekady po ustaniu zanieczyszczenia środowiska (McGeer i wsp., 2004; Szykowska i wsp., 2017). Zjawisko

bioakumulacji w środowisku naturalnym dodatkowo potęgowane jest przez biomagnifikację, czyli proces rosnącego stężenia ksenobiotyku wraz ze wzrastającym poziomem troficznym organizmu. Innymi słowy, konsumenci wyższych rzędów będą wykazywali więcej zakumulowanych toksyn w swoich tkankach na skutek ich przyjmowania wraz z materią spożywanych organizmów niższych rzędów. U zwierząt wodnych, srebro akumuluje w największych stężeniach w czterech głównych lokalizacjach: a) w skrzelach - narządzie, który ma najwięcej styczności z wodą; b) w wątrobie - centrum metabolicznym organizmu, gdzie zachodzi detoksykacja ksenobiotyków; c) w jelicie - szczególnie u ryb słonowodnych, dla których połykanie wody jest naturalnym procesem fizjologicznym, ale również poprzez absorpcję z pokarmem; oraz d) w mięśniach - wskutek drugorzędowej depozycji po transporcie układem krwionośnym (Tokatli i wsp., 2013; Webb i Wood, 2000). Toksycznym wpływem srebra jest też jego oddziaływanie na cały organizm ryb, w dużej mierze prowadząc do jego zakwaszenia. Mechanizm ten ma swoje podstawy na poziomie molekularnym, gdzie literatura naukowa wskazuje przede wszystkim na zaburzenia pracy pompy sodowo-potasowej oraz anhidrazy węglanowej na drodze niekompetytywnej inhibicji. Jony srebra zastępują zarówno jony sodu, jak i protony podczas transportu przez nabłonki narządów, a przede wszystkim skrzeli ryb (ryc. 1). Bezpośrednim tego następstwem jest zaburzenie metabolizmu związków azotowych poprzez utrzymywanie wewnątrz organizmu nadmiaru protonów w formie jonów amonowych, co zakłóca proces oddychania tlenowego na drodze nadmiernej depozycję jonów węglanowych oraz blokadę poboru jonów sodu ze środowiska, które niezbędne są do wymiany ładunku elektrycznego organizmu. Efektem nadmiernego nagromadzenia się protonów w organizmie, a przede wszystkim w krwioobiegu, jest zmiana jego ładunku elektrycznego, obniżenie odczynu pH, a tym samym zakwaszenie organizmu, mające negatywny wpływ na pracę wielu białek utrzymujących stan homeostazy (Grosell i wsp., 2002; Perry i wsp., 2003).



Rycina 1. Schemat ogólnego modelu transportu sodu, chloru i amoniaku przez komórki nabłonka skrzelu organizmów słodkowodnych. Znaki "←" i "→" wskazują kierunek potencjałów membranowych i nabłonkowych. Linie kropkowane reprezentują transport na zasadzie dyfuzji prostej, podczas gdy linie ciągłe przedstawiają inne sposoby transportu. Nośniki oznaczone symbolem "ATP" realizują transport aktywny zależny od defosforylacji adenozynotryfosforanu (ATP). Anhidraza węglanowa jest oznaczona skrótem CA. Symbole "↑" i "↓" oznaczają, że srebro (Ag) lub mająca podobne właściwości miedź (Cu) wpływają przyspieszająco lub spowalniająco na odpowiedni proces. Schemat przygotowano na podstawie Grosell i wsp., (2002).

2.3. Nanocząstki srebra

Rozwój technologii dających coraz to szersze możliwości analityczne, takich jak zwiększanie rozdzielczości prowadzonych obserwacji, miniaturyzacji uzyskiwanych substancji oraz innowacji w zakresie zastosowań badanych struktur przyczyniły się do powstania materiałów nowej generacji - nanomateriałów. Nanomateriały charakteryzowane są jako struktury, które w przynajmniej jednym wymiarze (długości, szerokości czy wysokości) mają mniej niż 100 nm. Jednocześnie redukcja długości w jednym lub kilku wymienionych wymiarach warunkuje wytworzenie małych cząstek o niezwykle dużym stosunku powierzchni do objętości. Ta zależność pozwala nanocząstkom na uzyskanie nowych właściwości fizykochemicznych czy biologicznych, niedostępnych dla ich makroskopowych odpowiedników (Albrecht i wsp., 2006). Podobnie jak w przypadku innych metali oraz ich związków chemicznych, wykorzystanie srebra w różnych gałęziach przemysłu również przeszło intensywny rozwój technologiczny, których efektem są nanocząstki srebra. Najczęściej wymieniane zalety i właściwości są bardzo podobne do jego klasycznych odpowiedników, gdzie za najważniejsze uznaje się właściwości bakteriobójcze oraz mykostatyczne, z tą jednak różnicą, że w formie nanomateriału srebro może znaleźć zastosowanie w szerszej gamie produktów (Rai i wsp., 2009).

2.4. Obszary zastosowań nanocząstek srebra

Nanocząstki srebra, ze względu na ich niewielkie rozmiary oraz wysoki stosunek powierzchni do objętości, wykazują zdolność do adhezji i wnikania do wnętrza mikroorganizmów. Następnie, poprzez tworzenie kompleksów z cząstkami organicznymi zawierającymi atomy siarki oraz fosforu (białkami lub DNA), zakłócają działanie łańcucha oddechowego oraz cyklu komórkowego (obejmującego podziały), a w efekcie prowadzą do śmierci komórki. Ponadto, aglomerowane nanocząstki srebra na skutek procesów utleniania i redukcji zachodzących na ich powierzchni, uwalniają do środowiska życia komórki toksyczne jony srebra (Morones i wsp., 2005). Mechanizm ten wykorzystywany jest do wytwarzania produktów aktywowanych powierzchniowo, szczególnie w branżach medycznych oraz tekstylnych. Przede wszystkim są to materiały o działaniu odkażającym, czyli: specjalistyczne opatrunki (stosowane w leczeniu skaleczeń, ran, poparzeń czy odleżyn); ubrania (zwłaszcza bielizna antybakteryjna) wykorzystywane w prewencji rozwoju infekcji u osób o osłabionym układzie immunologicznym; spreje, płyny i aerozole wytwarzające na różnych powierzchniach powłokę antybakteryjną (Lem i wsp., 2011). Podobnie jak w przypadku produktów dla ludzi, efekt bakteriobójczy nanocząstek srebra

wykorzystywany jest w trakcie hodowli zwierząt oraz produkcji surowców pochodzenia zwierzęcego. W szczególności używane są one jako środek do dezynfekcji kojców, transporterów czy innego sprzętu mającego bezpośredni kontakt z organizmami żywymi bądź ich produktami pochodnymi. Ponadto dowiedziono, że użycie nanocząstek srebra w miejscach bytowania zwierząt redukuje emisję amoniaku, a tym samym zmniejsza prawdopodobieństwo jego zatruciem (Pulit i wsp., 2011). Nanocząstki srebra charakteryzują się też doskonałymi właściwościami optoelektronicznymi. Na przykład, dzięki wykorzystaniu technik określania i wykorzystania parametrów powierzchniowego rezonansu plazmonowego, nanocząstki srebra biorą udział w: a) opracowywaniu nowych technik diagnostycznych oraz farmaceutyków; b) badaniach przesiewowych; c) kontroli jakości przeprowadzanych procesów biotechnologicznych; d) charakteryzowaniu nowych białek; e) czy w śledzeniu i poznawaniu procesów chorobowych (Ravindran i wsp., 2013). Na dodatek, w zakresie szeroko pojętego rozwoju technologicznego, nanocząstki srebra są odpowiedzią na potrzebę miniaturyzacji urządzeń elektronicznych oraz sensorów. Stanowią one, na przykład, wysoce termostabilny dodatek do produkcji układów elektronicznych w których temperatura dochodzić może do 300°C, gdzie klasyczne stopy metali ulegają już upłynnieniu (Qian i wsp., 2020).

2.5. Parametry nanocząstek i sposoby ich ewaluacji

Badania dowodzą, że właściwości optyczne, katalityczne, potencjał chemiczny i biologiczny, temperatura topnienia, przewodność elektryczna i termiczna nanocząstek srebra są silnie związane z ich parametrami fizycznymi, takimi jak ładunek elektryczny, rozmiar, wielkość czy rozkład wielkości w danej partii materiału. Jest to głównie związane ze zmianą stosunku i tak niezwykle dużej powierzchni do małej objętości nanocząstki (Lin i wsp., 2014; Shenashen i wsp., 2013). Dlatego też w literaturze naukowej wyróżnić można zestaw technik wysoce istotnych z punktu widzenia tego doktoratu, które pozwalają na określenie najważniejszych parametrów nanocząstek: a) TEM (ang. *transmission electron microscopy* - transmisyjna mikroskopia elektronowa), a więc technika umożliwiająca wizualizację materiału z rozdzielczością do około 1 nm (przy czym wartość ta może ulegać zmianom przy różnej adaptacji techniki), pozwalająca określić morfologię nanocząstek, ich wielkość (z uwzględnieniem kształtu) oraz potencjał do aglomeracji (a więc zwiększania rozmiaru wraz ze zmianą kształtu); b) DLS (ang. *dynamic light scattering* - dynamiczne rozpraszanie światła), umożliwiająca określenie rozkładu wielkości cząstek w zawiesinie; oraz c) ELS (ang. *electrophoretic light scattering* - elektroforetyczne rozpraszanie światła),

inaczej zwane potencjałem zeta, pozwalające na określenie potencjału elektrycznego cząstek (Baia i Simon, 2007; Pecora, 2000). Wskazane powyżej parametry i techniki najsilniej rzutują na właściwości biologiczne nanocząstek srebra, a więc na ich zdolność do oddziaływania z materiałem biologicznym na każdym poziomie jego zorganizowania. Na przykład, im mniejszy jest rozmiar nanocząstek, tym łatwiej jest im przekroczyć bariery biologiczne (przede wszystkim błonę komórkową), a co za tym idzie, zinfiltrować struktury bardziej złożone, takie jak błony śluzowe (np. jamy nosowej, jelita) czy barierę krew-mózg (Böhmer i wsp., 2014; Cueva i wsp., 2019). Drugim bardzo ważnym parametrem, wpływającym na możliwość migracji nanocząstek wewnątrz komórek, jest ich potencjał elektryczny. Na zasadzie oddziaływań elektrostatycznych, nanocząstki charakteryzują się różnym powinowactwem do powierzchni komórki. Jeżeli ładunek ten będzie przeciwny w obu strukturach, zdolność do adhezji będzie większa niż w przypadku, gdy ładunek elektryczny będzie zgodny. Ponadto, przyłożenie zewnętrznego pola i napięcia elektrycznego (naturalnie występującego i zmieniającego się wewnątrz organizmów) może dodatkowo modyfikować lub indukować nie tylko ich zdolność do adhezji, ale także do migracji wewnątrzkomórkowej (Donath i Pastushenko, 1979; Nakamura i wsp., 2019; Zhang i wsp., 2008).

2.6. Sposoby wytwarzania nanocząstek

Metody wytwarzania nanocząstek srebra podzielić można na trzy główne rodziny: fizyczne, chemiczne i biologiczne. Pierwsza z nich działa na zasadzie redukcji rozmiarów większego materiału wyjściowego (ang. *Top-Down*), a pozostałe dwie bazują na syntezie *de novo*, gdzie zaczyna się od produktów o niewielkich rozmiarach, a następnie powoli zwiększa się ich objętość (ang. *Bottom-Up*). Niemożliwe jest jednak wyróżnienie najlepszego czy optymalnego sposobu na otrzymywanie nanocząstek, ponieważ każda z dostępnych metodyk charakteryzuje się specyficznymi zaletami i wadami, które mogą dotyczyć stopnia skomplikowania procesu wytwarzania (czyli kosztów), docelowych rozmiarów nanocząstek oraz różnic w ich wielkości i stabilności, a także aplikowalności powstającego produktu (Islam i wsp., 2021).

Metody fizyczne skupiają się na wykorzystaniu energii do zmiany stanu skupienia metalicznego srebra. Niezależnie od konkretnie obranego schematu wytwarzania, składają się one z trzech głównych etapów: a) ogrzewania materiału w klasycznym piecu bądź na skutek krótkich wyładowań energetycznych (generowanych przy użyciu lasera, prądu lub wzbudzenia indukcyjnego); b) wyparowania części materiału wejściowego; oraz c)

ponownej kondensacji materiału w postaci nanocząstek (Dell'Aglio i wsp., 2013). Produktem klasycznej ewaporacji na skutek działania prądu lub temperatury oraz wtórnej kondensacji są nanocząstki o wysokiej stabilności, małych rozmiarach oraz niskim rozkładzie wielkości. Metody te charakteryzują się jednak wysokimi kosztami, związanymi głównie z czaso- i energochłonnością tak zorganizowanej produkcji nanocząstek, a także potrzebą użycia drogich i zaawansowanych konstrukcyjnie urządzeń (Haider i Kang, 2015). Odpowiedzią na te problemy są metodyki polegające na wypalaniu kawałków metalicznego srebra przy użyciu lasera, a więc skupionej wiązki fotonów o wysokiej energii. Uzyskiwany w ten sposób materiał spełnia założenia opisane powyżej dla klasycznej ewaporacji, jednakże metodyka ta jest skuteczna już po pięciominutowym traktowaniu materiału laserem o różnej długości fali (w cytowanym badaniu było to 1064 nm, 532 nm oraz 355 nm), przy czym nanocząstki charakteryzują się coraz mniejszymi rozmiarami wraz ze spadkiem długości fali (Tsuji i wsp., 2002). Reasumując, metody fizyczne charakteryzują się względnie wysokimi kosztami produkcji, ale za to pozwalają uzyskać wysoce czysty, stabilny produkt o powtarzalnych i małych rozmiarach (Natsuki, 2015).

Na skalę przemysłową nanocząstki srebra najczęściej produkowane są przy pomocy metod chemicznych. Wymagają one zastosowania większej ilości elementów w układzie produkcyjnym aniżeli metody fizyczne: metalicznego prekursora, czynnika redukującego oraz czynnika stabilizującego. Sam proces składa się z samorzutnego tworzenia się miejsc nukleacji nanocząstek srebra, a następnie ich wzrostu (Lee i Jun, 2019). Prekursorami w procesie chemicznej syntezy nanocząstek są głównie sole srebra: AgNO_3 czy AgCl . Do czynników redukujących podczas wytwarzania nanocząstek zaliczyć można zarówno związki organiczne (np. glukozę, witaminę C, dimetyloformamid, dekstrozę), jak i nieorganiczne (np. hydrazynę, borowodorek sodu). Parametry uzyskanych nanocząstek zależą jednak nie tylko od obranego prekursora oraz reduktora, ale także od parametrów fizykochemicznych, w których zachodzi proces syntezy, takich jak temperatura, pH układu produkcyjnego, naświetlenie oraz czas reakcji (Evanoff i Chumanov, 2005; Lee i Jun, 2019; Mota i wsp., 2020). Największym wyzwaniem jest jednak stabilizacja uzyskiwanych produktów. Dlatego też, aby uniknąć procesu aglomeracji świeżo otrzymanych nanocząstek w struktury większe niż pożądane, stosuje się np. alkohol poliwinylowy (PvA), poliwinylpirolidon (PvP), kwas cytrynowy i inne (Das i Das, 2019; Khan i wsp., 2012; Verma i Maheshwari, 2019). Poza standardowymi metodami, w kategorii układów

chemicznych stosowane są także metody hybrydowe, będące połączeniem oddziaływania czynników fizycznych (takich jak światło czy prąd) oraz podejścia do syntezy od strony chemicznej. Przykładami takiej strategii są metodyki polegające na redukcji azotanu srebra na jeden z dwóch sposobów: światłem UV na membranach żywicznych (Huang i Yang, 2008) lub rozkładu elektrolitycznego (Zhu i wsp., 2001). Pomimo ogólnie niskich kosztów oraz łatwości przeprowadzenia syntezy chemicznej nanocząstek, często toksyczne i niebiodegradowalne pozostałości czynników redukujących stanowią potencjalne zagrożenie dla ludzi oraz środowiska naturalnego, co znacząco ogranicza możliwości ich wykorzystania ze względów bezpieczeństwa (León-Silva i wsp., 2016).

Metody zielonej syntezy, zwane również syntezą biologiczną, skupiają się wykorzystaniu szerokiego zakresu naturalnych prekursorów, w postaci zarówno żywych organizmów: grzybów, roślin oraz bakterii, ale także ich ekstraktów czy enzymów (Vega-Baudrit i wsp., 2019). Pomimo ogólnie zdefiniowanych właściwości bakteriobójczych i grzybobójczych srebra, wyróżnia się gatunki oraz szczepy mikroorganizmów opornych na jego działanie. Mechanizmy detoksykacji, którymi się one posługują, polegają na wytrącaniu srebra na błonie komórkowej lub w formie wtrętów komórkowych, pod postacią jednorodnych cząsteczek osiągających średnicę do 200 nm (Klaus i wsp., 1999; Slawson i wsp., 1992). Fenomen ten jest obecnie wykorzystywany do syntezy nanocząstek przy użyciu bioreaktorów wykorzystujących grzyby oraz bakterie. Podobnie jak w syntezie chemicznej, rolę prekursora pełni najczęściej azotan srebra (Nayak i wsp., 2011; Pugazhenthiran i wsp., 2009). Niektóre ze sposobów produkcji nanocząstek srebra trudno jest jednak jednoznacznie sklasyfikować. Jako przykłady można wskazać otrzymywanie nanocząstek srebra przy wykorzystaniu melaniny lub soku z winogron (a więc substancji pochodzenia biologicznego) jako czynnika redukującego, w układzie typowym dla syntezy chemicznej (Gnanajobitha i wsp., 2013; S. Roy i wsp., 2019). Podsumowując, metody biologiczne są potencjalnie najbardziej wartościowymi w porównaniu do pozostałych sposobów syntezy nanocząstek, gdyż cechują się ekologicznym, biodegradowalnym i niewykorzystującym elementów toksycznych schematem postępowania, przy zachowaniu relatywnie niskich kosztów produkcji. Niestety, produkty końcowe charakteryzują się większą rozbieżnością rozmiarów nanocząstek, mniejszą stabilnością produktu oraz mniejszymi możliwościami manipulacji tych parametrów, co istotnie ogranicza ich aplikowalność (Rafique i wsp., 2017).

2.7. Zagrożenia wywołane przez nanocząstki srebra

Badania naukowe sugerują, że nanocząstki srebra obserwowane są w środowisku z dwóch powodów: procesów naturalnych i działalności człowieka. Do procesów nieantropogenicznych zaliczyć można na przykład wybuchy wulkanów, powolną i delikatną erozję minerałów bogatych w srebro czy procesy utleniania i redukcji form srebra występujących w ciekach wodnych (Guildford i wsp., 2009; Yin i wsp., 2015). Ze względu na coraz szersze wykorzystanie nanocząstek srebra przez człowieka, od początku XXI wieku nastąpiło zdecydowane zwiększenie ich produkcji, a co za tym idzie wzrosła także ich depozycja w środowisku. Nanocząstki srebra zanieczyszczają globalny ekosystem na każdym etapie swojego cyklu życiowego, zaczynając od ośrodków ich produkcji, poprzez gospodarstwa domowe, placówki medyczne lub przemysłowe, aż do systemów utylizacji odpadów, takich jak oczyszczalnie ścieków, wysypiska czy spalarnie śmieci. Dotychczas opisanych zostało wiele mechanizmów infiltracji środowiska przez nanocząstki srebra, związanych z opisanymi wektorami, a więc również z transportem w trzech stanach skupienia materii: ciekłym, stałym i gazowym. Przykładowo, placówki przemysłowe, medyczne i gospodarstwa domowe utylizują nanocząstki wraz z resztą ścieków w stanie ciekłym lub ze śmieciami w fazie stałej. Ośrodki przetwórcze, takie jak huty czy spalarnie śmieci, w których nanomateriały poddawane są działaniu wysokiej temperatury, ubocznie uwalniają srebro do atmosfery, które rozprzestrzenia się w postaci aerozolu. Wypadkowo, obieg wody w postaci: a) opadów, kondensujących w powietrzu, aerozol bogaty w nanocząstki srebra; b) cieków wodnych, wypłukujących srebro z gleby (szczególnie w okolicy kopalń, wysypisk śmieci czy pól uprawnych); c) depozycji wody z oczyszczalni ścieków lub niekontrolowanych zrzutów, powoduje przede wszystkim zanieczyszczenie wysoce wrażliwego środowiska wodnego (Islam i wsp., 2021; McGillicuddy i wsp., 2017).

Badania empiryczne oraz powstałe na ich podstawie modele matematyczne wskazują na nieregularność stężeń w jakich nanocząstki srebra mogą występować na świecie, a nawet w obrębie jednego cieków wodnego. W rzekach Ameryki Północnej (stany Teksas i Connecticut) stężenie nanocząstek srebra wahało się od 0,01 do 100 ng/L, w zależności od stopnia zurbanizowania oraz industrializacji na terenie zlewni. Podobna sytuacja wystąpiła w Europie w rzece Ren, gdzie stężenia te przybierały wartości od 4 do 40 ng/L. Doniesienia o najwyższych obserwowalnych stężeniach nanocząstek srebra pochodzą natomiast z Malezji, gdzie osiągały wartości aż 10-20 mg/L, zależnie od pory roku, ze szczytem w lipcu (Syafiuddin i wsp., 2018). Modele matematyczne tworzone są natomiast na podstawie

wielu danych, nie tylko wyników pomiarów stężeń w wodzie, ale też informacji o emisji nanocząstek srebra oraz sposobach utylizacji ścieków (głównie przez gospodarstwa domowe), a także nałożeniu funkcji w czasie uwzględniając pomiary do 90 percentyla obserwowanych stężeń, co pozwala na stwierdzenie trendów w powstawaniu zanieczyszczeń nanocząstkami. Wskazują one, że w ośrodkach miejskich oraz przemysłowych, a także w pobliżu starych masywów górskich stężenia nanocząstek mogą wzrastać. Podobne wnioski można wysnuć z obserwacji dokonanych w przypadku rzek Europy Wschodniej, gdzie wyższe stężenia nanocząstek srebra powiązano z relatywnie niskim tempem przepływu wody. Ponadto, modele potwierdzają przypuszczenia o zależności stężeń nanocząstek srebra względem pory roku, gdzie najwyższe stężenia obserwowane są w ciągu roku w najcieplejszych miesiącach (Dumont i wsp., 2015; Gottschalk i wsp., 2011).

2.8. Toksyczny potencjał nanocząstek srebra

Obecnie istnieje poważnie niebezpieczeństwo polegające na zaburzeniu stabilności środowiska wodnego przez srebro i jego związki, co związane jest m.in. ze wzrostem użycia nanocząstek srebra przez człowieka na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat. Biorąc pod uwagę powyższe, występuje potrzeba prowadzenia szczegółowych badań na temat toksycznego potencjału tego materiału nowej generacji (Čaloudová i wsp., 2021). Literatura naukowa (Tabela 1) sugeruje występowanie wielu mechanizmów negatywnego oddziaływania nanocząstek srebra na organizmy żywe. Powiązane są one zwłaszcza z długością ekspozycji, rozmiarami nanocząstek, pozycją systematyczną organizmów, drogą podania, czy warunkami, w których ta ekspozycja zachodzi. Dla przykładu, podczas krótkiej ekspozycji, nanocząstki srebra mają zdolność do aglomeracji tylko na powierzchni ciała organizmów, bez wewnętrznej akumulacji. Wydłużenie tego czasu umożliwia zaś migrację form srebra w głąb tkanek, a tym samym determinuje występowanie procesu bioakumulacji srebra. Droga podania również wpływa na zdolność nanocząstek srebra do akumulacji - asymilacja nanocząstek wraz z pokarmem stanowi większe zagrożenie dla pracy układu pokarmowego niż w przypadku ekspozycji na srebro dla homeostazy skrzeli (Tabela 1).

Tabela 1. Przegląd informacji na temat toksycznego wpływu nanocząstek srebra na fitoplankton, zooplankton oraz organizmy kręgowce. Na podstawie (Banu i wsp., 2021). Skrót EC 50- *effective concentration 50*, czyli dawka powodująca wywołanie efektu u 50% osobników badanych.

Organizm	Droga podania	Długość narażenia	Bioakumulacja	Stężenie nanocząstek	Odwołanie
Fitoplankton i rośliny naczyniowe					
<i>Ulva lactuca</i>	Zawieszenie w wodzie	48 godzin	Fizycznie związany z powierzchnią glonów	Reakcja toksyczna generowana powyżej stężenia 15-1 µg/L	(Turner i wsp., 2012)
<i>Chlorella sp.</i>	Zawieszenie w wodzie	24 godziny	Stwierdzono, że AgNPs w formie zagregowanej są związane z powierzchnią zewnętrzną	Hamowanie szybkości zachodzenia fotosyntezy EC50 of 0.89 ± 0.68 mg/L	(Yoo-iam i wsp., 2014)
<i>Euglena gracilis</i>	Zawieszenie w wodzie	1-2 godziny	W pelikuli	Zmiany w morfologii komórek przy stężeniu 5 µM	(Xiaomei Li i wsp., 2015)
<i>Lemna gibba</i>	Zawieszenie w wodzie	7 dni	wewnątrzkomórkowa akumulacja AgNPs wystąpiła w roślinie	Zahamowanie mechanizmu fotosyntezy przy stężeniu 1 mg/L	(Dewez i wsp., 2018)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Zawieszenie w wodzie	24 godziny	Na ścianie komórkowej	10 nm Internalizacja AgNP przy wyższym stężeniu 40 µg/L	(Sekine i wsp., 2017)
Zooplankton					
<i>Daphnia magna</i>	Podane z pokarmem	5 dni	W układzie pokarmowym	Zmniejszona ilość pokarmu, gdy organizm jest karmiony komórką <i>Chlamydomonas</i> hodowaną w 100 µg/L AgNPs	(McTeer i wsp., 2014)
<i>Daphnia similis</i>	Zawieszenie w wodzie	21 dni	Mała dawka AgNPs obecna w ciele organizmu	Wstrzymanie reprodukcji w stężeniach 0.02 i 1 µg/L	(Wang i wsp., 2018)

<i>Artemia salina</i>	Zawieszenie w wodzie	72 godziny	W układzie pokarmowym	Produkcja ROS przy wartości EC10 i EC50 wynoszącej 1,48 ± 0,6 i 10,70 ± 1,3 mg/L dla AgNPs	(An i wsp., 2019)
<i>Artemia salina</i>	Zawieszenie w wodzie	24 i 48 godzin	W układzie pokarmowym	Generowanie stresu oksydacyjnego przy stężeniu 500 mg/L	(Demarchi i wsp., 2020)
Organizmy kręgowce					
<i>Danio rerio</i> (embrion)	Zawieszenie w wodzie	5 dni	Akumulacja w różnych narządach rozwijającego się zarodka	Deformacje wielonarządowe przy 14-20 ng/mL AgNPs	(Kannan i wsp., 2011)
<i>Danio rerio</i> (embrion)	Zawieszenie w wodzie	4 godziny	Na zewnętrznej powierzchni tkanki	Zmniejszenie reotaksji przy 150 i 225 µg/L stężenia	(McNeil i wsp., 2014)
<i>Cyprinus carpio</i>	Zawieszenie w wodzie	7 dni	W wątrobie, skrzelach, przewodzie pokarmowym	Efekt toksyczny obserwowano przy stężeniu 0,62 ± 0,12 mg/L.	(Jang i wsp., 2014)
<i>Danio rerio</i>	Podane z pokarmem	21 dni	W jelicie i wątrobie	Histopatologia w wątrobie przy stężeniu EC50 19,63mg/L	(Lacave i wsp., 2017)
<i>Danio rerio</i>	Zawieszenie w wodzie	21 dni i 6 miesięcy	W skrzelach i wątrobie	Zapalenie, hiperplazja Zmiany w skrzelach, destabilizacja błony lizosomalnej przy 10 µg/L AgNPs	(Lacave i wsp., 2018)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Podane z pokarmem	14 dni	Akumulacja srebra w przewodzie pokarmowym. Zaobserwowano również ograniczony transfer przez ścianę jelita	Stężenie do 34,3 µg/kg nanosrebra stwierdzone w przewodzie pokarmowym organizmu po spożyciu zooplanktonu obciążonego AgNPs	(Zeumer i wsp., 2020)

2.9. Ocena ryzyka ekologicznego lub środowiskowego

Jednym z celów prowadzenia badań z zakresu ekotoksykologii jest rozpoznanie rozmieszczenia ksenobiotyku w środowisku oraz oszacowanie jego wpływu zarówno na konkretne organizmy żywe, jak i całe ekosystemy. Dokonuje się tego poprzez opracowanie oceny ryzyka ekologicznego lub środowiskowego (ang. *ecological or environmental risk assessment* - ERA), które definiowane są jako procedury kierujące użyciem metodologii naukowych o znanym stopniu pewności, szacujących prawdopodobne lub rzeczywiste skutki ingerencji w środowisko (na przykład przez depozycję ksenobiotyków) dla ekosystemów oraz jego składników (Depledge i Fossi, 1994). Proces oceny ryzyka można podzielić na analizę ryzyka podpartą danymi naukowymi i politycznie zorientowane zarządzanie ryzykiem. Analiza ryzyka obejmuje niektóre lub wszystkie z następujących elementów: identyfikację zagrożeń, ocenę skutków, ocenę narażenia i charakterystykę ryzyka (gdzie określa się ryzyko wystąpienia określonej sytuacji). Zarządzanie ryzykiem środowiskowym dotyczy zaś środków regulacyjnych opartych na ocenie ryzyka oraz badań nad potencjalnymi rozwiązaniami dla poszczególnych problemów (Hope, 2006; Van Leeuwen i wsp., 1996).

W rzeczywistości, określenie faktycznego oddziaływania zanieczyszczeń na populacje organizmów w środowisku naturalnym jest często trudne, ponieważ wiele efektów ujawnia się dopiero po dłuższym czasie. Kiedy efekt staje się w końcu zauważalny, proces destrukcyjny może wykraczać już poza punkt, w którym możliwe jest jego odwrócenie poprzez działania zaradcze lub redukcję ryzyka. Występowanie właśnie takiego ryzyka zbyt późnego dostrzegania zmian patologicznych w obrębie środowiska dało początek badaniom nad opracowaniem adekwatnych systemów sygnalizacji, czyli wskaźników wczesnego ostrzegania - biomarkerów (Bucheli i Fent, 1995).

Biomarkery definiowane są jako wszelkie mierzalne zmiany w obrębie organizmu, a zwłaszcza w jego płynach ustrojowych, komórkach, tkankach lub też zachowaniu, wskazujące na fizjologiczne oraz patologiczne zmiany spowodowane obecnością toksyn. Podzielić je można na trzy klasy:

- Biomarkery narażenia, obejmujące wykrywanie i pomiar stężenia ksenobiotyków, ich metabolitów lub produktów interakcji między czynnikiem ksenobiotycznym, a specyficznym docelowym elementem znajdującym się w obrębie organizmu;

- Biomarkery skutków, w tym mierzalne zmiany biochemiczne, fizjologiczne lub inne, zachodzące w tkankach lub płynach ustrojowych organizmu, które można uznać za związane z już zaistniałym lub możliwym pogorszeniem stanu zdrowia, lub konkretną chorobą;
- Biomarkery podatności, w tym różne czynniki genetyczne i zmiany w receptorach komórkowych, wskazujące na wrodzoną lub nabytą zdolność organizmu do reakcji na zaistniałe narażenie na określony ksenobiotyk, mogące także odpowiadać za modulowanie podatności organizmu na to narażenie.

Dzięki tak szeroko określonej definicji, biomarkery znalazły zastosowanie w modelu poziomującym organizację życia na ziemi w następujący sposób:

1. Molekularnym;
2. Poniżej komórkowym (organelli);
3. Komórkowym;
4. Tkankowym;
5. Narządowym;
6. Organizmów;
7. Populacyjnym;
8. Biotopowym;
9. Ekosystemu;

Biomarkery określane są na wczesnych etapach narażenia, a następnie łączone są z efektami negatywnych oddziaływań ksenobiotyków w środowisku naturalnym. Skutki na wyższych poziomach hierarchii są zawsze poprzedzone wcześniejszymi zmianami w obrębie szeroko pojętych procesów biologicznych, co pozwala na opracowywanie biomarkerów wczesnego ostrzegania. W kontekście środowiskowym są one obiecujące do stosowania jako czułe wskaźniki, które zarówno wskazują na przedostawanie się, rozprzodzenie toksyn w organizmach i finalnie wywoływanie przez nie efektu toksycznego w krytycznych lokalizacjach, jak i również umożliwiają badania nad rozwojem i stosowaniem czułych, laboratoryjnych testów biologicznych (Lionetto i wsp., 2019; McCarthy i Shugart, 2018; van der Oost i wsp., 2003).

2.10. Uzasadnienie obranej metodyki

Na przestrzeni lat toksykologia jako dziedzina nauki miała duży wkład w dostarczaniu informacji o negatywnym i potencjalnie szkodliwym wpływie badanych substancji na organizmy żywe. Za jej początek uznawany jest rok 1927, kiedy to powstały pierwsze testy obejmujące pojęcie LD 50 (ang. *lethal dose 50*, czyli dawka substancji, w której umiera 50% badanej populacji). Współcześnie, rozwój toksykologii postępuje dzięki zastosowaniu procesu oceny ryzyka jako systemowego, naukowego podejścia do jakościowego i ilościowego określania potencjalnie szkodliwego działania substancji chemicznych (Bakand i wsp., 2005). Trzema głównymi metodykami wykorzystywanymi w analizie toksykologicznej są testy: a) *in vitro* - wykorzystujące zazwyczaj hodowle komórek macierzystych; b) *in vivo* - używające modeli zwierzęcych; c) *in silico* - korzystające z najnowszych osiągnięć w zakresie komputerowego modelowania danych (Ciallella i Zhu, 2019). W kontekście badań nad nanomateriałami, testy toksyczności *in vitro* są metodyką pierwszego wyboru dla większości badaczy. Wynika to z faktu, że testy te są tańsze, szybsze i wygodniejsze do przeprowadzenia, a także pozbawione wszelkich kwestii etycznych związanych z prowadzeniem badań nad organizmami zwierzęcymi. W systemach hodowli komórkowych brakuje jednak złożonych interakcji typu komórka-komórka i komórka-matryca, różnorodności typów komórek oraz efektów hormonalnych, czyli zjawisk występujących w warunkach *in vivo*. Ponadto, prowadzenie długoterminowych badań nad chronicznymi efektami oddziaływania ksenobiotyków na organizmy zwyczajnie nie jest możliwe bez wykonywania doświadczeń *in vivo*. Takie badania są jednak czasochłonne, kosztowne i niestety wiążą się z problematycznymi kwestiami etycznymi (Dhawan i Sharma, 2010).

W tego rodzaju badaniach nad środowiskiem wodnym najczęściej wykorzystywanym gatunkiem jest danio pręgowany (*Danio rerio*). Jest on uznanym organizmem modelowym używanym w badaniach profilowania toksyczności, zarówno jako model embrionalny w testach ekspozycji ostrej, jak i w późniejszych stadiach rozwoju w badaniach krótko i długoterminowych (Verma i wsp., 2021).

Danio pręgowane jest także jednym z najważniejszych i najlepiej poznanych organizmów modelowych kręgowców w wielu dziedzinach nauki, takich jak genetyka, biologia rozwoju, biologia komórki, biologia molekularna, biologia ewolucyjna,

neurofizjologia oraz medycyna. Specjaliści zrzeszeni w ramach The Zebrafish Information Network (ZFIN, zfin.org), posiadający wiedzę z opisywanych zakresów, dokonali adnotacji ponad 16 000 publikacji dotyczących badań nad danio przegowanym w celu uzyskania danych obejmujących: a) geny i ich funkcje, sekwencje, allele, ekspresję czy ortologię; b) fenotypy; c) linie zmutowane i transgeniczne; d) modele chorób ludzkich; oraz e) przeciwciała (Bradford i wsp., 2022). Gatunek ten charakteryzuje się szeregiem cech, które czynią go szczególnie przydatnym do używania w badaniach laboratoryjnych. Przede wszystkim jest to wysoce żywotna ryba o niewielkich rozmiarach, żyjąca w wodzie o temperaturze pokojowej lub do niej zbliżonych, która ponad sto lat temu została sprowadzona do Europy z Indii w celu prowadzenia hodowli akwariowych. Ze względu na niski koszt oraz łatwość utrzymania jest chętnie hodowana zarówno przez pasjonatów akwarystyki, jak i również w celach naukowych. Samice mogą składać ikrę, przez cały rok, co dwa-trzy dni (choć zalecana częstotliwość wynosi raz w tygodniu), a pojedyncze tarło może owocować nawet kilkuset zapłodnionymi ziarnami ikry. Oocyty mają 0,7 mm średnicy w momencie zapłodnienia i są przezroczyste, ponieważ żółtko jest zamknięte w osobnej osłonce, co ułatwia obserwacje rozwoju embrionu już od pierwszych godzin po zapłodnieniu. Czas jednej generacji, a więc okres od wyklucia do osiągnięcia dojrzałości płciowej, mieści się w zakresie od trzech do czterech miesięcy, ułatwiając tym samym prowadzenie wielopokoleniowych eksperymentów w warunkach laboratoryjnych (Spence i wsp., 2008).

W celu ewaluacji potencjalnie toksycznego wpływu nanocząstek na ryby, różne parametry biologiczne (np. hematologiczne, biochemiczne, histologiczne, genetyczne, rozwojowe czy behawioralne) wykorzystywane są jako biomarkery. Wskazane mierniki stosowane są przez badaczy z całego świata i powtarzane pomiędzy publikacjami, a więc rutynowo wykorzystywane w wielu badaniach. Co więcej, w większości prac i raportów dokonuje się podobnych interpretacji wyników na podstawie tak uzyskanych danych, tym samym wskazując na ich wysoce powtarzalny charakter (Samim i wsp., 2022). Wśród nich znajdują się techniki histologiczne, które są ważnym narzędziem pozwalającym na badanie morfologii komórek, tkanek oraz organów, obserwowanych przy użyciu mikroskopu świetlnego. Zmiany histopatologiczne są wykorzystywane jako narzędzie do biomonitoringu lub jako wskaźnik stopnia zmian strukturalnych zachodzących w tkankach i komórkach w badaniach nanotoksyczności. Metodologia ta może być również wykorzystywana do badania korelacji pomiędzy strukturą a funkcją komórek i tkanek,

odgrywa też kluczową rolę w badaniu ich architektury. Szczególną uwagę w literaturze opisującej zmiany histopatologiczne z użyciem modeli rybich poświęca się na obserwacje dokonywane w skrzelach oraz wątrobie, a w mniejszym stopniu w układach: pokarmowym, nerwowym, rozrodczym i wydalniczym (Gupta i wsp., 2016; Kumar i wsp., 2018; Samim i wsp., 2022).

Parametry biochemiczne również przyciągają uwagę wielu badaczy, ponieważ wskazują one na modyfikacje procesów chemicznych i biochemicznych zachodzących w obrębie organizmów, a tym samym mogą świadczyć o toksycznym wpływie ksenobiotyków. Podobnie jak parametry histologiczne, aktywność enzymatyczna oraz analizy ilościowe metabolitów wykorzystane są jako biomarkery do badań nad toksycznością nanocząstek u ryb. Przede wszystkim rozpatrywane są biomarkery wskazujące na zaburzenia homeostazy wątroby, które mogą być mierzone zarówno w samym narządzie, jak i zastępczo w osoczu. Analizy te uzupełniane są testami neurodegeneracyjnymi, rozszerzeniem profilu biochemicznego krwi i pomiarami aktywności Na^+/K^+ ATPazy. W odróżnieniu od klasycznych form metali i ich związków, podczas badań nanocząstek dużą uwagę zwraca się również na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, uważanych za kluczowe wskaźniki stresu oksydacyjnego wywołwanego w organizmach przez ksenobiotyki (Amjad i wsp., 2018; Samim i wsp., 2022; Shaw i wsp., 2012).

Literatura naukowa wskazuje też, że wybrane geny oraz poziom ich ekspresji mogą być wykorzystywane jako wielowymiarowe biomarkery do wczesnej identyfikacji narażenia na specyficzne zanieczyszczenia, w tym nanocząstki. Używanie technik genetycznych podpartych analizami statystycznymi ogranicza prawdopodobieństwo uzyskania fałszywie pozytywnych wyników, generowanych przeważnie na skutek oddziaływania środowiska życia organizmów. Podobnie jak w przypadku ewaluacji wspomnianych wcześniej biomarkerów biochemicznych i histologicznych, największy nacisk kładziony jest tu na badania homeostazy skrzeli oraz wątroby u osobników dorosłych, ale również ogólnoustrojowej ekspresji genów w przypadku larw i embrionów (Boran i Şaffak, 2018; Ghaniem i wsp., 2022; Hook, 2010).

3. Materiał i metody

3.1. Materiały i schemat doświadczenia

By zweryfikować cel oraz hipotezę badawczą, zaprojektowano i przeprowadzono trzymiesięczne doświadczenie toksykologiczne na danio pręgowanym, obejmujące okres rozwoju larwalnego, juvenilnego oraz moment osiągnięcia dojrzałości płciowej. Eksperyment przeprowadzono na podstawie wytycznych opisanych przez (Tsang i wsp., 2017) i za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie (Uchwała nr WAW2/009/2019). Doświadczenie było realizowane w ramach grantu Narodowego Centrum Nauki nr 2015/19/D/NZ8/03871.

Danio pręgowane (*Danio rerio*) linii dzikiej ABTU w wieku dziewiętnastu dni od wyklucia, zostały zakupione w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie. Podczas pierwszego etapu odchowu, trwającego blisko trzy tygodnie i obejmującego fazy odżywiania endogennego oraz egzogenego, ryby utrzymywano w standardowych warunkach środowiskowych, adekwatnych dla tego gatunku. Następnie ryby przetransportowane zostały do podchowalni Samodzielnego Zakładu Ichtiologii i Biotechnologii w Akwakulturze Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, gdzie zostały umieszczone po osiemdziesiąt sztuk w szklanych, zakrywanych pokrywą akwariach, zawierających sześć litrów wody hodowlanej, gdzie prowadzono aklimatyzację do zakładanych warunków testu ekotoksykologicznego. Woda hodowlana (roztwór E3) została przygotowana na zasadzie rozpuszczenia w wodzie destylowanej odpowiednich soli, zgodnie z wartościami przedstawionymi w tabeli 2. Ryby żywione były trzy razy dziennie *ad libitum* pokarmem suchym (Sparos, Portugalia) przeznaczonym dla danio pręgowanego. Fotoperiod był zgodny z miesiącami prowadzenia eksperymentu (maj-lipiec), a woda była dodatkowo napowietrzana. Parametry wody były codziennie kontrolowane przy pomocy sondy pH z termometrem HI 208 (Hanna Instruments, Stany Zjednoczone) oraz kolometrycznych testów paskowych (Tetra Test 6 in 1; Tetra, Niemcy). Parametry fizykochemiczne wody podczas doświadczenia przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 2. Skład chemiczny roztworu E3. Podany skład dotyczy roztworu wyjściowego, który następnie jest 60-krotnie rozcieńczany.

Substancja chemiczna	Stężenie [g/L]
CaCl ₂ ×2H ₂ O	2,9 g/L
NaCl	17,4 g/L
KCl	0,8 g/L
MgCl ₂ ×6H ₂ O	4,89 g/L

Tabela 3. Parametry fizykochemiczne wody podczas doświadczenia.

Temperatura	25±1°C
Twardość ogólna (GH)	6-10°d
Twardość węglanowa (KH)	6-10°d
Stężenie jonów NO ³⁻	5-20 mg/L
Stężenie jonów NO ²⁻	0-1 mg/L
Stężenie Cl ₂	0 mg/L
pH	7,2±0,2

Po jedenastodniowej aklimacji rozpoczęto doświadczenie. Zbiorniki z rybami przypisano do grup doświadczalnych, które były eksponowane na roztwory: nanocząstek srebra o stężeniach: 0,001 mg/L, 0,01 mg/L, 0,1 mg/L, 1,0 mg/L; azotanu srebra o stężeniu 0,001 mg/L, oraz próbę kontrolną (roztwór E3 bez dodatku ksenobiotyków). W doświadczeniu analizowano wpływ roztworów nanocząstek srebra pokrytych poliwinylpiperolidonem (PvP) (Sigma-Aldrich; Wielka Brytania) oraz azotanu srebra (Poch, Gliwice).

Badane stężenia ksenobiotyków uzyskiwano poprzez dodanie odpowiedniej ilości zagęszczonego roztworu nanocząstek srebra o stężeniu 200 mg/ml, poddanego wcześniej trójrotnemu procesowi piętnastominutowej sonikacji w płuczce ultradźwiękowej (Ultron U-505, Polska) celem rozbicia aglomeratów tej substancji, natomiast azotan srebra rozcieńczano z roztworu wyjściowego o stężeniu 50 mg/L. Parametry nanocząstek opisane zostały w publikacji (Szudrowicz i wsp., 2022) (ryc.2) i wynosiły: a) średnia średnica

hydrodynamiczna nanocząstek srebra - od 39 nm do 93 nm; b) średnia średnica hydrodynamiczna aglomeratów - ponad 202 nm; c) średnia potencjału zeta wynosiła -23,4 mV; d) pomiary z mikroskopu elektronowego wskazały nanocząstki o średniej średnicy $42,10 \pm 19,27$ nm (min. 6,14 nm; max. 108,79 nm).

Zbiorniki na regałach hodowlanych rozmieszczone były w sposób losowy, na każdą grupę utworzono trzy zbiorniki badane. W trakcie doświadczenia codziennie analizowano parametry fizykochemiczne wody oraz sprawdzano dobrostan i behawior ryb, natomiast co drugi dzień wymieniano połowę objętości wody oraz czyszczono akwaria. Po wymianie wody stężenie badanych substancji uzupełniano tak, aby utrzymać zakładane dla danej grupy wartości. Czas trwania doświadczenia (sto dni) obejmował okres młodociany oraz osiągnięcia dojrzałości płciowej przez danio przegowane. W ramach wyjątku, ze względu na wysoką śmiertelność w grupie ryb narażonych na nanocząstki srebra o stężeniu 0,1 mg/L, po dwudziestu sześciu dniach ekspozycji na ksenobiotyk podjęto decyzję o wcześniejszym zakończeniu doświadczenia w tej grupie eksperymentalnej (zgodnie z wytycznymi Lokalnej Komisji Etycznej). Nieliczne pozostające przy życiu ryby uśmiercono i pobrano do analiz doświadczalnych.

Czterdziestego pierwszego dnia eksperymentu zmniejszono obsadę zbiorników do dwudziestu ryb na zbiornik (zagęszczenie 3,33 ryby/L). W setnym dniu zakończono doświadczenie w pozostałych grupach eksperymentalnych. Ryby zostały uśmiercone poprzez kąpiel w roztworze metanosulfonian trikainy- MS-222 (Sigma-Aldrich; Wielka Brytania) o stężeniu 250 mg/L, a następnie zważone (waga Radwag WPS 60/C/10) i zmierzone suwmiarką (Powerfix Digital Calliper). Ponadto obliczono współczynnik kondycji Fultona (Fulton's condition factor) zgodnie ze wzorem:

$$K = (m/Si^3) * 100$$

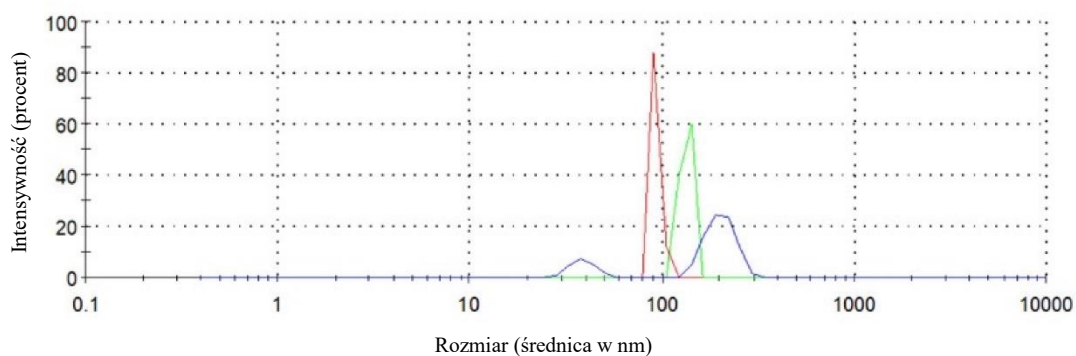
Objaśnienia::

K - współczynnik kondycji Fultona

m - masa ciała (g)

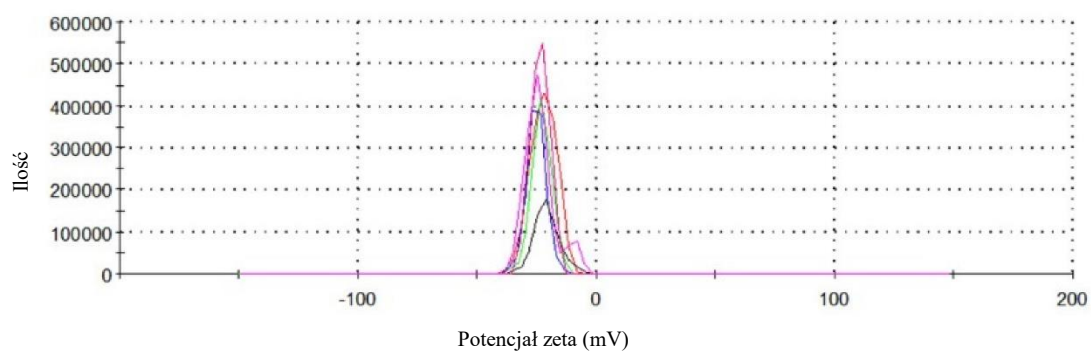
Si - standardowa długość ciała (mm)

Rozkład wielkości zależny od intensywności



A Record 237: Ag 1 ppm 1 Record 238: Ag 1 ppm 2 Record 239: Ag 1 ppm 3

Rozkład potencjału zeta



B Record 251: Ag 1 ppm 1 Record 252: Ag 1 ppm 2 Record 253: Ag 1 ppm 3
Record 254: Ag 1 ppm 1 Record 255: Ag 1 ppm 2 Record 256: Ag 1 ppm 3



Rycina 2. Parametry i kształt nanocząstek srebra użytych w eksperymencie: (A) rozkład wielkości, (B) rozkład potencjału zeta (mV) oraz (C) morfologia agregatów nanocząstek srebra. Pasek skali: 0,2 μm (Szudrowicz i wsp., 2022).

Podczas poboru ryb do analiz dokonano podziału osobników na trzy kategorie: samce, samice oraz ryby, których płeć była niemożliwa do określenia na podstawie drugorzędowych cech dymorfizmu płciowego (wielkości, ubarwienia oraz kształtu ciała), zgodnie z opracowaniem (Clark i wsp., 2018). Materiał badawczy pobrano do analiz histologicznych, biochemicznych i genetycznych, zabezpieczając odpowiednio do każdego rodzaju analiz.

3.2. Analizy histologiczne

Celem wizualizacji stanu tkanek przy użyciu technik mikroskopii świetlnej, materiał badawczy pochodzący z poboru w dwudziestym szóstym (n=4) oraz setnym dniu (n=5) eksperymentu utrwalony został w czteroprocentowym roztworze paraformaldehydu (Sigma-Aldrich; Wielka Brytania). Następnie próby zostały poddane procedurze zatapiania w parafinie, która obejmowała następujące etapy: odwodnienie przy rosnącym stężeniu alkoholi; wymiana alkoholu w tkankach na płyn pośredni - ksylen; nasączenie parafiną. Procedura wykonana została przy użyciu karuzelowego procesora tkankowego TP 1020 (Leica, Niemcy). Materiał badawczy nasączony parafiną przeniesiony został do stacji zatapiania Microm EC350-2 (Microm, Niemcy), gdzie uformowano z niego bloczki parafinowe, a następnie przytwierdzono je do kasetek histologicznych. Tak przygotowane bloczki skrojono na mikrotomie RM2265 (Leica, Niemcy) na skrawki o grubości pięciu mikrometrów i osadzono na szkiełkach podstawowych mikroskopowych, pokrytych białkiem jaja kurzego z dodatkiem glicerolu. Preparaty osuszono przez dwadzieścia cztery godziny w cieplarni, w temperaturze 37°C i przechowywano w pudełkach histologicznych do czasu ich zabarwienia. W toku analiz doświadczalnych preparaty zabarwiono metodą hematoksyliny i eozyna (H&E). Barwienie składało się z etapów: odparafinowania skrawków, nawodnienia, barwienia oraz różnicowania, odwodnienia, prześwietlenia, zaklejenia preparatu szkiełkiem nakrywkowym. Barwienia wykonane zostały przy użyciu automatycznej barwiarki Autostainer XL (Leica, Niemcy). Zabarwione szkiełka osuszono przez 24 godziny w cieplarni, w temperaturze 37°C.

Barwienie topograficzne H&E użyte zostało w celu uzyskania informacji na temat ogólnej budowy morfologicznej narządów wewnętrznych pobranych osobników danio pręgowanego, ze szczególnym uwzględnieniem wątroby. Istotą barwienia jest penetracja przez barwnik hematoksylinę zasadochłonnych struktur komórkowych, przede wszystkim jąder komórkowych, które wybarwiają się na kolor niebiesko-fioletowy oraz wiązanie się

eozyiny do kwasochłonných struktur cytoplazmatycznych, które wybarwiają się na kolor różowy.

Następnie uzyskane preparaty analizowano na podstawie zdjęć wykonanych przy użyciu mikroskopu Nikon Eclipse Ni-E (Nikon, Japonia), w programie NIS Elements (Nikon, Japonia). Obserwacji dokonano pod kątem stwierdzenia jakościowych zmian histopatologicznych w obrębie całego organizmu. Ponadto, w przypadku wątroby wykonana została analiza histomorfometryczna następujących parametrów hepatocytów (n=50 na osobnika):

- Ogólnej powierzchni komórki
- Powierzchni jądra komórkowego
- Indeksu jądrowego (powierzchnia jądra komórkowego dzielona przez powierzchnię komórki)

Pomiary histomorfometryczne zostały przeprowadzone w programie QuPath (v0.3.0) (Bankhead i wsp., 2017).

3.3. Analizy biochemiczne

W momencie dysekcji, wątroby ryb, przeznaczone do analiz biochemicznych (n=10), zostały pobrane do probówek typu eppendorf o pojemności 2ml, a następnie zanurzone w ciekłym azocie celem ich utrwalenia. Pobrany materiał przetrzymywany był w -80°C aż do momentu jego homogenizacji, której dokonano przy użyciu homogenizatora ręcznego (PRO-scientific 205, Wielka Brytania), w wodzie dejonizowanej o objętości 700µl. Następnie, próby zostały odwirowane w wirówce (Eppendorf 5804 R; Niemcy) przez 10 minut w warunkach: 4°C i sile odśrodkowej 14000g. Supernatant pobrano i rozcieńczono w dodatkowej objętości wody dejonizowanej. Tak przygotowany materiał utrwalony został ponownie w ciekłym azocie i przetrzymywany był w -80°C do czasu jego analizy.

W ramach analiz biochemicznych wykonano ilościową analizę stężenia białka w próbach oraz aktywności enzymatycznych: fosfatazy alkalicznej, fosfatazy kwaśnej, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej, reduktazy glutationowej, według metodyk opisanych poniżej. Oznaczenia wykonane zostały w płytkach 96-dołkowych za pomocą spektrometru płytkowego Tecan Infinite 200 PRO (Tekan gmbh, Austria), w temperaturze 37°C, a każda próbka mierzona była w trzech powtórzeniach.

Oznaczenie zawartości białka.

Ilościowe oznaczenia białka następują na drodze dwustopniowej reakcji:

1. Aminokwasy aromatyczne (tyrozyna i tryptofan) tworzą wiązanie kierunkowe z jonami miedzi.
2. Kompleksy te redukują kwas fosfomolibdenowy oraz fosforowolframowy do barwnego produktu (niebieskiego) - błękitu fosfomolibdenowego.

Oznaczenie białka wykonano według metodyki opisanej przez (Lowry i wsp., 1951). Reakcję prowadzono poprzez połączenie i wymieszanie: 10 μ l próby, 30 μ l wody dejonizowanej i 200 μ l odczynnika miedziowego (CuSO_4) o stężeniu 200 mmol/L (Poch, Polska). Mieszanina inkubowana była przez 10 minut. Następnie dodano 20 μ l trzykrotnie rozcieńczonego odczynnika Folina-Ciocalteu (Chempur, Polska) i inkubowano przez 30 minut. Obie inkubacje przeprowadzone zostały w 25°C. Na zakończenie dokonano spektrometrycznego odczytu absorbancji w dołkach przy długości fali 670nm. Wyniki zmiany absorbancji przeliczono na podstawie krzywej wzorcowej utworzonej z albuminy (Sigma-Aldrich, USA) po wcześniejszym zerowaniu na próbę ślepą z wodą dejonizowaną.

Oznaczenie aktywności fosfatazy alkalicznej.

Enzym ten katalizuje reakcję hydrolizy bezbarwnego substratu - p-nitrofenylofosforanu do barwnego (żółtego) p-nitrofenylu oraz fosforanu w środowisku zasadowym (pH 10,4), według metodyki opisanej przez (Kaplan, 1972). Do oznaczeń wykorzystano kit firmy Spinreact (nr ref. 1001131, Spinreact, Hiszpania). Reakcję prowadzono poprzez połączenie i 15 sekundowe wymieszanie 20 μ l próby i 200 μ l roztworu roboczego o stężeniu 10 mmol/L p-nitrofenylofosforanu. Następnie mieszanina inkubowana była przez 45 sekund, po czym dokonano pomiarów absorbancji (długość fali 410 nm) w 4 cyklach odczytów, w jednonminutowych interwałach. Wyniki minutowej zmiany absorbancji przeliczono w oparciu o przygotowaną wcześniej krzywą wzorcową, a następnie podzielono ilość uwolnionego p-nitrofenylu przez zawartość białka w próbce w celu otrzymania aktywności enzymu w U/mg białka.

Oznaczenie aktywności fosfatazy kwaśnej.

Pomiar aktywności tego enzymu następuje na drodze dwustopniowej reakcji:

1. Fosfataza kwaśna katalizuje reakcję hydrolizy substratu alfa-naftylofosforanu do alfa-naftolu oraz fosforanu w środowisku kwaśnym (pH 5).
2. Alfa-naftol w reakcji z solą Fast Red TR tworzy barwny produkt - barwnik azydkowy.

Oznaczenia wykonano według metodyki opisanej przez (Abbott, 1984). Do oznaczeń wykorzystano kit firmy Spinreact (nr ref. 1001122, Spinreact, Hiszpania). Reakcję prowadzono poprzez połączenie i 15 sekundowe wymieszanie 20 μ l próby i 200 μ l roztworu roboczego o stężeniu 10 mmol/L alfa-naftylofosforanu oraz 6 mmol/L Fast Red TR. Następnie mieszanka inkubowana była przez 4:45 minut, po czym dokonano pomiarów absorbancji (długość fali 405 nm) w czterech cyklach odczytów, w jednocinutowych interwałach. Wyniki minutowej zmiany absorbancji przeliczono w oparciu o zalecenia producenta, a następnie podzielono przez zawartość białka w próbie w celu otrzymania aktywności enzymu w U/mg białka.

Oznaczenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej.

Enzym ten hamuje reakcję chlorku 2-(4-jodofenylo) 3-(4-nitrofenylo)-5-fenylotetrazolowego z anionorodnikiem ponadtlenkowym, powstałym przy użyciu ksantyny i oksydazy ksantynowej, tworząc barwny (czerwony) produkt - barwnik formazanowy. Oznaczenia wykonano według metodyki opisanej przez opisanej przez (Wooliams i wsp., 1983). Do oznaczeń wykorzystano kit firmy Randox (nr ref. SD 125, Randox, Wielka Brytania). Reakcję prowadzono poprzez połączenie i 15 sekundowe wymieszanie 6 μ l próby, 200 μ l roztworu roboczego R1 o stężeniu ksantyny 0,05 mmol/L; chlorku 2-(4-jodofenylo) 3-(4-nitrofenylo)-5-fenylotetrazolowego o stężeniu 0,025 mol/L oraz 30 μ l oksydazy ksantynowej o aktywności 80U/L. Następnie mieszanka inkubowana była przez 45 sekund, po czym dokonano pomiarów absorbancji (długość fali 505 nm) w trzech cyklach odczytów, w jednocinutowych interwałach. Wyniki minutowej zmiany absorbancji przeliczono na podstawie krzywej wzorcowej w oparciu o zalecenia producenta i wzorce dostępne w kicie, a następnie podzielono przez zawartość białka w próbie w celu otrzymania aktywności enzymu w U/mg białka.

Oznaczenie aktywności peroksydazy glutationowej.

Pomiar aktywności tego enzymu następuje na drodze dwustopniowej reakcji:

1. Peroksydaza glutationowa katalizuje reakcję utlenienia glutationu przez wodoronadtlenek kumenu.
2. Reduktaza glutationowa katalizują reakcję utlenienia NADPH do NADP⁺ przy jednoczesnej redukcji utlenowanej formy glutationu.

Oznaczenia wykonano według metodyki opisanej przez (Paglia i Valentine, 1967). Do oznaczeń wykorzystano kit firmy Randox (nr ref. RS 505, Randox, Wielka Brytania). Reakcję prowadzono poprzez połączenie i 15 sekundowe wymieszanie: 20µl próby, 200µl roztworu roboczego R1 o stężeniu glutationu 4 mmol/L; NADPH 0,34 mmol/L; reduktazy glutationowej o aktywności 0,5 U/L, oraz 10µl roztworu roboczego R2 wodoronadtlenku kumenu o stężeniu molowym 0,18 mmol/L. Następnie mieszanka inkubowana była przez 45 sekund, po czym dokonano pomiarów absorbancji (długość fali 340 nm) w 2 cyklach odczytów, w jednodominutowych interwałach. Wyniki minutowej zmiany absorbancji przeliczono na podstawie krzywej wzorcowej w oparciu o surowicę kalibrującą (nr ref. SC 10154, Randox, Wielka Brytania), a następnie podzielono przez zawartość białka w próbce w celu otrzymania aktywności enzymu w U/mg białka.

Oznaczenie aktywności reduktazy glutationowej.

Enzym ten katalizuje reakcję utlenienia NADPH do NADP⁺ przy jednoczesnej redukcji utlenowanej formy glutationu. Oznaczenia wykonano według metodyki opisanej przez (Goldberg, 1984). Do oznaczeń wykorzystano kit firmy Randox (Wielka Brytania; nr ref. GR 2368). Reakcję prowadzono poprzez połączenie i 15 sekundowe wymieszanie: 20µl próby, 200µl roztworu roboczego R1 o stężeniu utlenionego glutationu 2,2 mmol/L oraz 30µl roztworu roboczego R2 o stężeniu NADPH 0,17 mmol/L. Następnie mieszanka inkubowana była przez 45 sekund, po czym dokonano pomiarów absorbancji (długość fali 340 nm) w pięciu cyklach odczytów, w jednodominutowych interwałach. Wyniki minutowej zmiany absorbancji przeliczono na podstawie krzywej wzorcowej w oparciu o surowicę kalibrującą (nr ref. GR2609, Randox, Wielka Brytania), a następnie podzielono przez zawartość białka w próbce w celu otrzymania aktywności enzymu w jednostkach uniwersalnych (U/mg białka).

Wyniki wszystkich analiz biochemicznych wyrażono również jako aktywność relatywną, gdzie wartość aktywności U/mg białka w grupie kontrolnej wyrażono jako 1.

3.4. Analiza ekspresji genów

Podczas poboru, prób wątroby osobników danio przegowanego (n=5) zostały utrwalone w ciekłym azocie po wcześniejszym umieszczeniu ich w próbkówkach typu eppendorf o pojemności 2ml. Pobrany materiał przetrzymywany był w -80°C do momentu izolacji całkowitego RNA, czego dokonano przy użyciu zestawu kolumnkowego NucleoSpin RNA/Protein (Macherey-Nagel, Niemcy). Proces ten składał się z ośmiu etapów:

1. Homogenizacji około 30 mg próbki przy użyciu homogenizatora kulkowego (Qiagen TissueLyserLT, Austria).
2. Dezintegracji komórek w buforze lizującym z dodatkiem β -merkaptoetanolu (Sigma-Aldrich).
3. Filtracji lizatu.
4. Połączenia RNA ze złożem kolumny przy użyciu 70% etanolu.
5. Odsalania membrany.
6. Trawienia pozostałości DNA.
7. Oczyszczenia i wysuszenia membran.
8. Elucji oczyszczonego RNA.

Ilość i jakość uzyskanego RNA zostały zweryfikowane na dwa sposoby:

1. Po 5 minutowej inkubacji w 65°C dokonano spektrofotometrycznego pomiaru gęstości optycznej 1,5 μ l próby przy użyciu spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, USA) przy długościach fal 230 nm, 260 nm i 280 nm.
2. Około 700 ng RNA na próbkę nałożone zostało na 1% żel agarozowy (Maximus Polskie agarozy, Polska) z bromkiem etydyny ((0,5 μ g/ml, Sigma-Aldrich, Wielka Brytania). Następnie przeprowadzono elektroforezę w buforze TAE (Sigma-Aldrich), w aparacie do elektroforezy (Apogee Horizon 58). Wizualizację przeprowadzono w świetle UV przy użyciu systemu dokumentacji żeli (Bio-Rad Gel Doc XR+, Stany Zjednoczone).

Otrzymane RNA o stężeniu 60ng/ μ l przepisano na cDNA przy użyciu zestawu do odwrotnej transkrypcji Maxima™ First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Fisher Scientific, USA). RNA inkubowane było w buforze z oligonukleotydami oraz odwrotną transkryptazą przez 10 minut w 25°C, a następnie przez 30 minut w 50°C. Reakcję zatrzymano zwiększając temperaturę do 85°C na 5 minut. Tak przygotowaną matrycę rozcieńczono, zamrożono i przetrzymywano w -80°C do czasu analizy ekspresji

genów (technika Real-Time PCR), którą przeprowadzono przy użyciu zestawu FIREPol® HOT EvaGreen qPCR Mix® Plus (Solis Biodyne, Estonia). Właściwy profil temperaturowy dla każdego genu został dobrany po optymalizacji standardowego protokołu: 95°C przez 15 min dla aktywacji polimerazy DNA HOT FIREPol® oraz 40 cykli w 95°C przez 5-10 s dla denaturacji, 60°C przez 10-30 s dla annealingu i 72°C przez 15-30 s dla wydłużania.

W trakcie analiz oznaczono ekspresję następujących genów: catalazy (*cat*), reduktazy glutationowej (*gsr*) peroksydazy glutationowej (*gpx1a*), dysmutazy ponadtlenkowej (*sod1*), cytochromu P450 (*cyp1a*) i białka szoku cieplnego (*hsp70*). Reakcje PCR przeprowadzono przy użyciu termocyklera RotorGene Q (Qiagen, USA) z fabrycznym oprogramowaniem komputerowym. W celu wykazania względnej ekspresji, wyniki uzyskane dla badanych genów normalizowano do genu referencyjnego wybranego spośród czterech genów: dwóch wariantów β -aktyny (*actb1*, *actb2*); domniemanej fimbrynalnej podjednostce wiążącej laminę (*elfA*) oraz β -2-mikroglobuliny (*b2m*) za pomocą programu NormFinder (metodą $2^{-\Delta\Delta C_T}$, <https://moma.dk/normfinder-software>) służącego do identyfikacji optymalnego genu normalizującego. Startery użyte dla każdego z badanych genów przedstawiono w tabeli 4. Wyniki przedstawiono jako relatywny poziom ekspresji, jako stosunek ekspresji genu docelowego do ekspresji genu referencyjnego z grupą kontrolną liczoną jako 1.

3.5. Analiza statystyczna

Dane ilościowe z analiz morfometrycznych, biochemicznych i ekspresji genów sprawdzono pod kątem zgodności z rozkładem normalnym testem Kołgomorowa-Smirnoffa (dla $p < 0,05$). Dla rozkładów prób spełniających kryterium zgodności z rozkładem normalnym przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) z testem post-hoc Tuckey'a dla różnych N (dla $p < 0,05$). Dla parametrów niespełniających tego wymogu przeprowadzono test Kruskala-Wallisa (dla $p < 0,05$). Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica (v12; Statsoft).

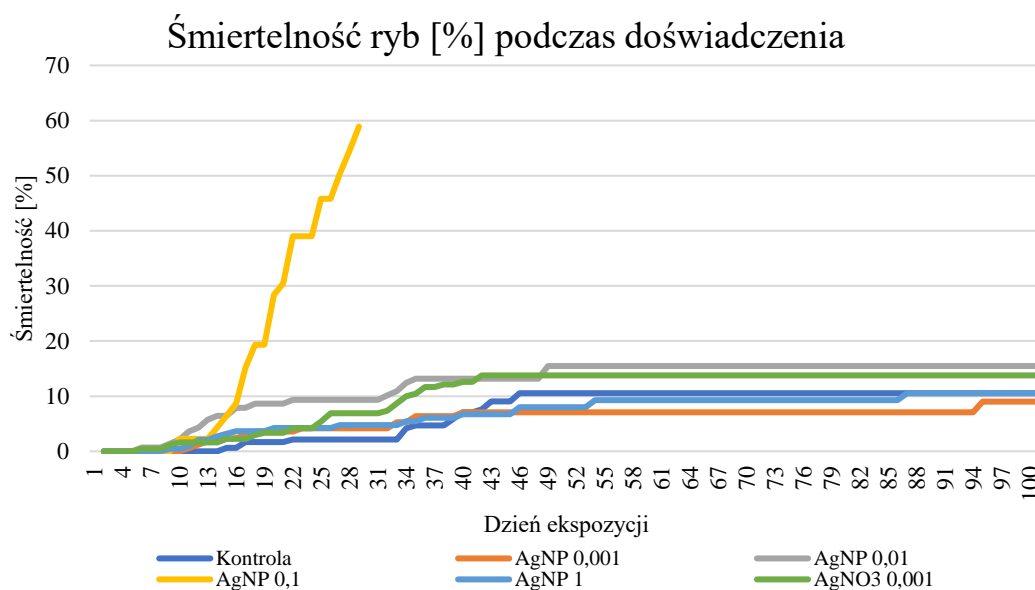
Tabela 4. Geny oraz sekwencje starterów użytych do ich oznaczenia.

Symbol genu (Numer GenBank)	Sekwencja starteru		Długość produktu
	Forward	Reverse	
<i>actb1</i> (NM_131031)	CGAGCAGGAGATGGGAACC	CAACGGAAACGCTCATTGC	102
<i>actb2</i> (NM_181601.5)	ACGATGGATGGGAAGACA	AAATTGCCGCACTGGTT	94
<i>b2m</i> (NM_131163.2)	GCCTTCACCCCAGAGAAAGG	GCGGTTGGGATTTACATGTTG	101
<i>elfa</i> (NM_131263.1)	TTGAGCGCAAGGAGGGTAAT	AGGTACAGTTCCAATACCTCCAAT	143
<i>gsr</i> (NM_001020554.1)	TGTGCCAGGATCCAGTTTAGG	GCACCCCTCCTTGTCGTATG	167
<i>cat</i> (NM_130912.2)	CTCCTGATGTGGCCCGATAAC	ATCAGGTTTTGCACCATGCG	172
<i>gpx1a</i> (NM_001007281.2)	GCACCAGGAGAAGTCAAGAATG	CAGAGGGTGGGCGTTTTTAC	130
<i>sod1</i> (NM_131294.1)	TGGTGACAACACAAACGGCT	TCTCCGACGTGTCTCACACTA	99
<i>cyp1a</i> (NM_131879.2)	GGAGCCGGTTTCGACACTAT	GTGCGATCCTTCCCGATCTT	122
<i>hsp70</i> (NM_001362359.1)	GGCAAATTTGAGCTGACGGG	CTGCCCTTGTCGTTGGTGAT	158

4. Wyniki

4.1. Przeżywalność i śmiertelność ryb podczas doświadczenia

Przez pierwsze dziesięć dni eksperymentu średnia śmiertelność wynosiła 1,33% we wszystkich grupach doświadczalnych i nie różniła się statystycznie istotnie między grupami. Od jedenastego dnia eksperymentu zaobserwowana została raptownie zwiększająca się śmiertelność osobników w grupie AgNP 0,1, która to osiągnęła wartość 60% w dwudziestym dziewiątym dniu eksperymentu. Śmiertelność ta była obserwowana we wszystkich trzech zbiornikach tej grupy badanej. Ze względu na względy bioetyczne, uwzględniając zapisy ze zgody na doświadczenie wydane przez Lokalną Komisję Etyczną do badań na zwierzętach, podjęto decyzję o zakończeniu eksperymentu dla tej grupy. W pozostałych grupach doświadczalnych oraz w grupie kontrolnej w trakcie doświadczenia, procent przeżywalności nie różnił się istotnie statystycznie między sobą. Śmiertelność wynosiła średnio 5,19% w dwudziestym dziewiątym dniu doświadczenia oraz 11,61% w setnym dniu eksperymentu (ryc. 3).

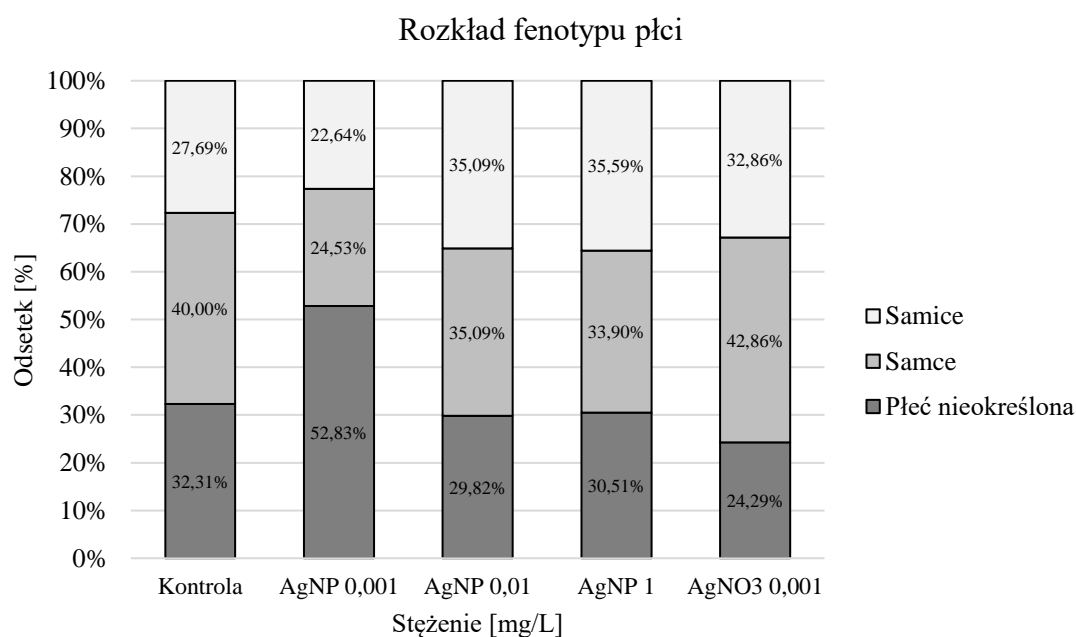


Rycina 3. Kumulatywna śmiertelność ryb z każdej z grup podczas trwania doświadczenia.

4.2. Tempo wzrostu ryb i rozkład płci w populacji

Parametry długości i masy ciała ryb oraz współczynnik kondycji Fultona analizowane były ostatniego dnia doświadczenia, uwzględniając płeć analizowanych ryb, oznaczoną na podstawie zewnętrznych cech dymorfizmu płciowego.

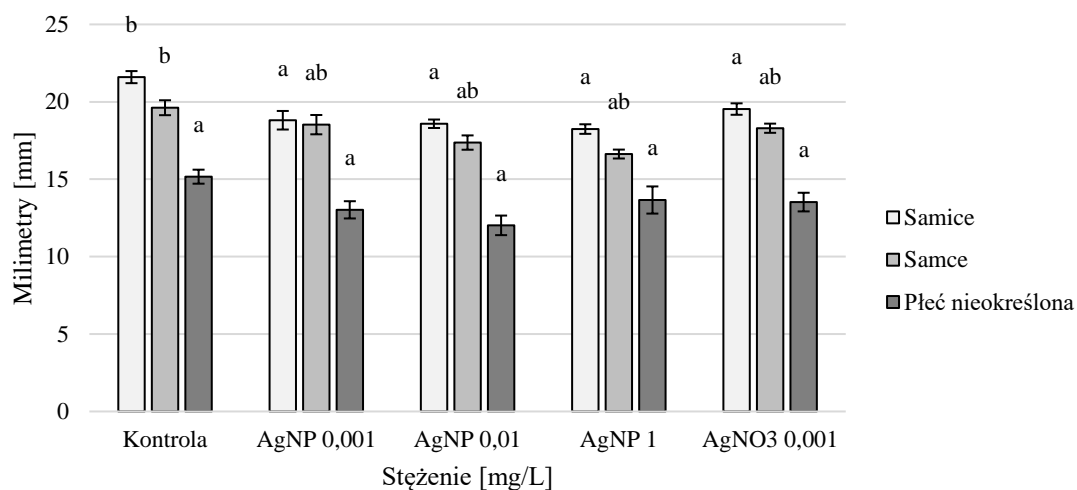
Rozkład fenotypu płci w badanych grupach doświadczalnych przedstawiony został na rycinie (ryc. 4). Największy udział osobników o nieokreślonej płci w setnym dniu został stwierdzony w grupie ryb narażonych na roztwór nanocząstek srebra o stężeniu 0,001 mg/L. W tej grupie doświadczalnej obserwowano najmniejszy udział procentowy ryb o płci żeńskiej i męskiej (ryc. 4). Dla pozostałych grup odsetek osobników o płci nieokreślonej utrzymywał się na podobnym poziomie około 30% (ryc. 4). Największy udział osobników płci męskiej zaobserwowano w grupach: kontrolnej oraz AgNO₃ 0,001 mg/L. Natomiast osobniki o fenotypie żeńskim równie licznie prezentowane były w grupach: AgNP 0,01 mg/L, AgNP 1 mg/L, oraz AgNO₃ 0,001 mg/L (ryc. 4).



Rycina 4. Procentowy udział płci ryb w ostatnim dniu doświadczenia (n=50-60).

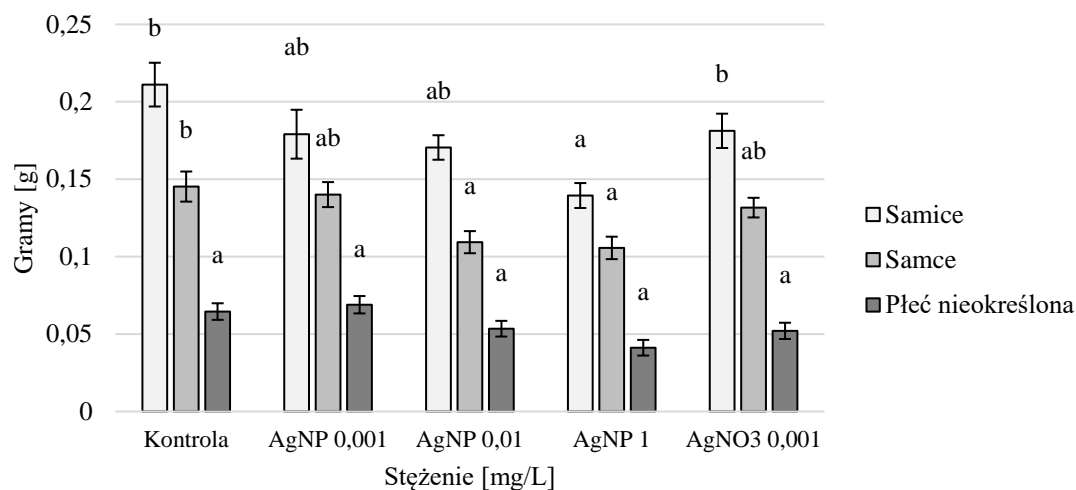
Analiza statystyczna nie wykazała różnic statystycznie istotnych pomiędzy grupami doświadczalnymi w długości ciała u ryb o nieokreślonej na podstawie cech zewnętrznych płci (ryc. 5). W przypadku analizowanych samic stwierdzono statystycznie istotnie wyższą wartość długości ciała ryb z grupy kontrolnej w porównaniu do ryb z grup badanych narażonych na związki srebra (ryc. 5). Podobnie u samców, stwierdzono mniejsze wartości

długości ciała u ryb narażonych na badane ksenobiotyki w porównaniu do ryb z grupy kontrolnej. Stwierdzono różnice statystycznie istotne w wartości tego parametru pomiędzy grupą kontrolną a grupami AgNP 0,01 mg/L oraz 1 mg/L (ryc. 5).



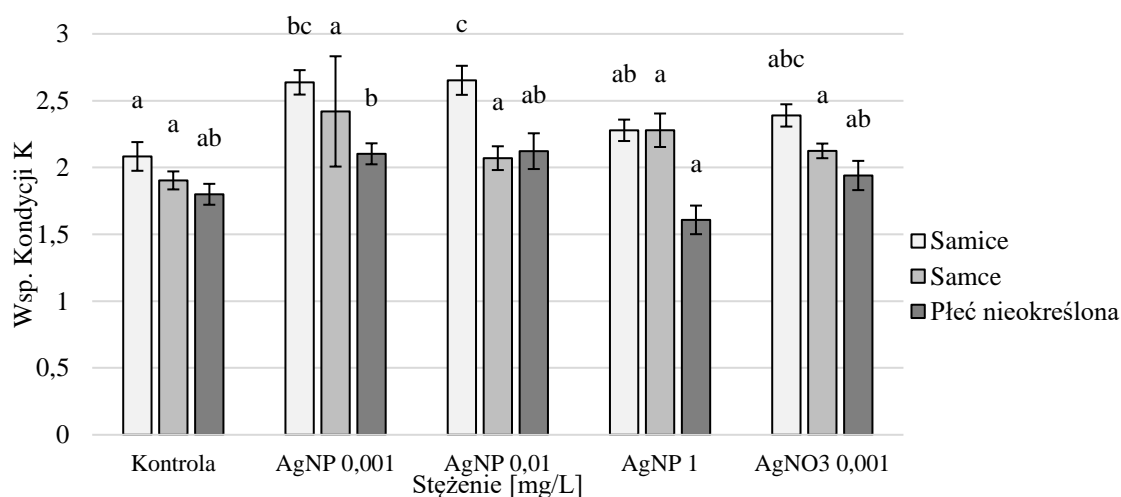
Rycina 5. Średnia (\pm błąd standardowy) długość ciała ryb w setnym dniu doświadczenia. Litery oznaczają przynależność do grup homogennych wydzielonych jednoczynnikową ANOVA z testem post-hoc Tukeya ($p < 0,05$, $n = 50-60$).

Podobnie jak w przypadku długości ciała, również masa ciała ryb o nieokreślonej płci nie różniła się statystycznie istotnie między badanymi grupami (ryc. 6). W przypadku samic stwierdzono statystycznie istotnie niższą masę ciała w przypadku ryb narażonych na nanocząstki srebra w stężeniu 1 mg/L, w porównaniu do ryb z grupy kontrolnej i narażonych na azotan srebra (ryc. 6). Samce danio przegowanego z grup doświadczalnych AgNP 0,01 i AgNP 1 mg/L miały statystycznie istotnie niższą masę ciała w porównaniu do samców z grupy kontrolnej (ryc. 6).



Rycina 6. Średnia (\pm błąd standardowy) masy ciała ryb w setnym dniu doświadczenia. Litery oznaczają przynależność do grup homogennych wydzielonych jednoczynnikową ANOVA z testem post-hoc Tukeya ($p < 0,05$, $n = 50-60$).

Analiza statystyczna współczynnika kondycji Fultona wykazała różnice statystycznie istotne w wartości tego parametru u samic i osobników o nieokreślonej płci (ryc. 7). U samców nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w tym parametrze (ryc. 7).



Rycina 7. Średnia (\pm błąd standardowy) współczynnika kondycji Fultona w setnym dniu doświadczenia. Litery oznaczają przynależność do grup homogennych wydzielonych jednoczynnikową ANOVA z testem post-hoc Tukeya ($p < 0,05$, $n = 50-60$).

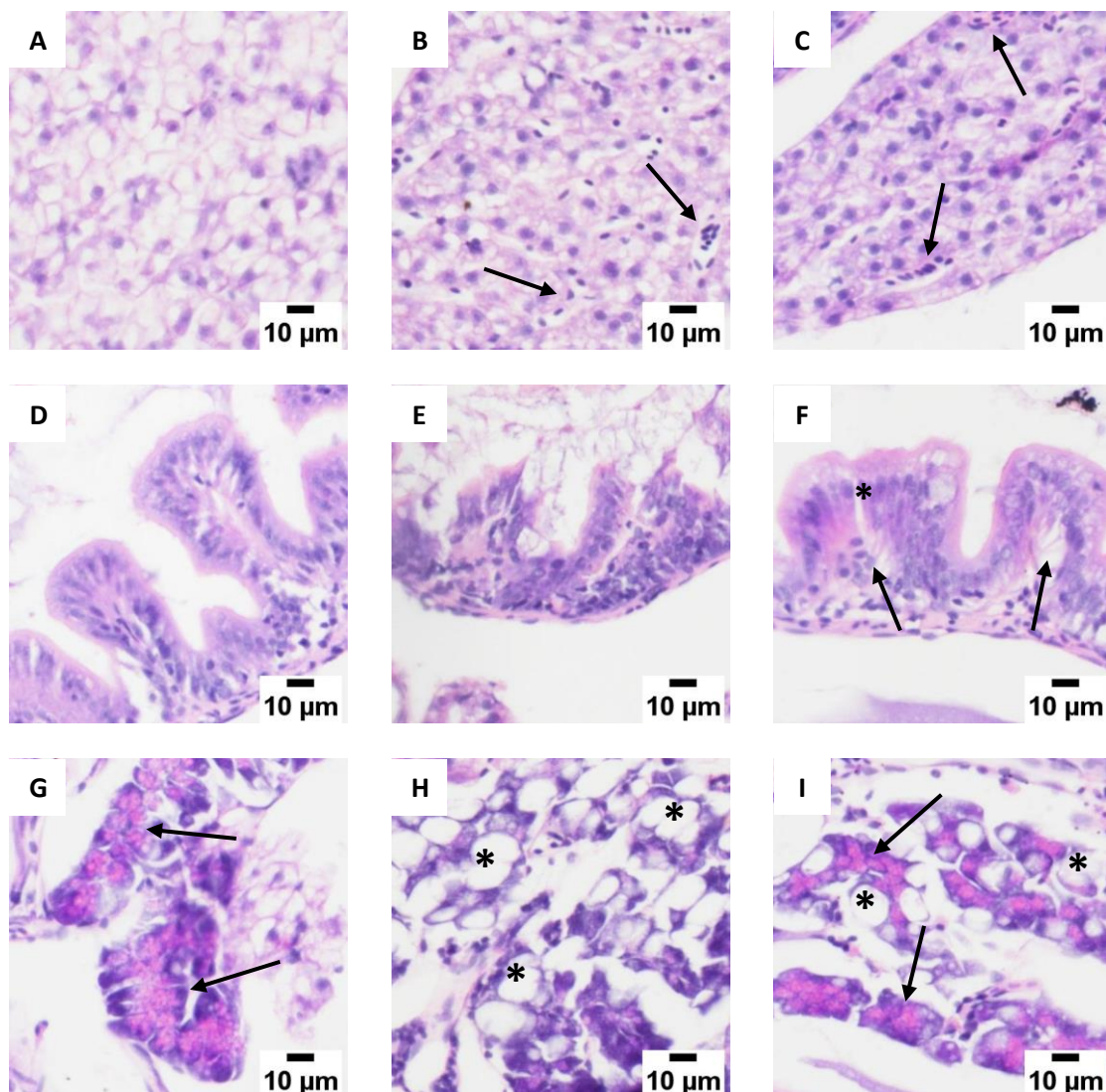
4.3. Analizy histologiczne

Obserwacje histologiczne w dwudziestym szóstym dniu eksperymentu.

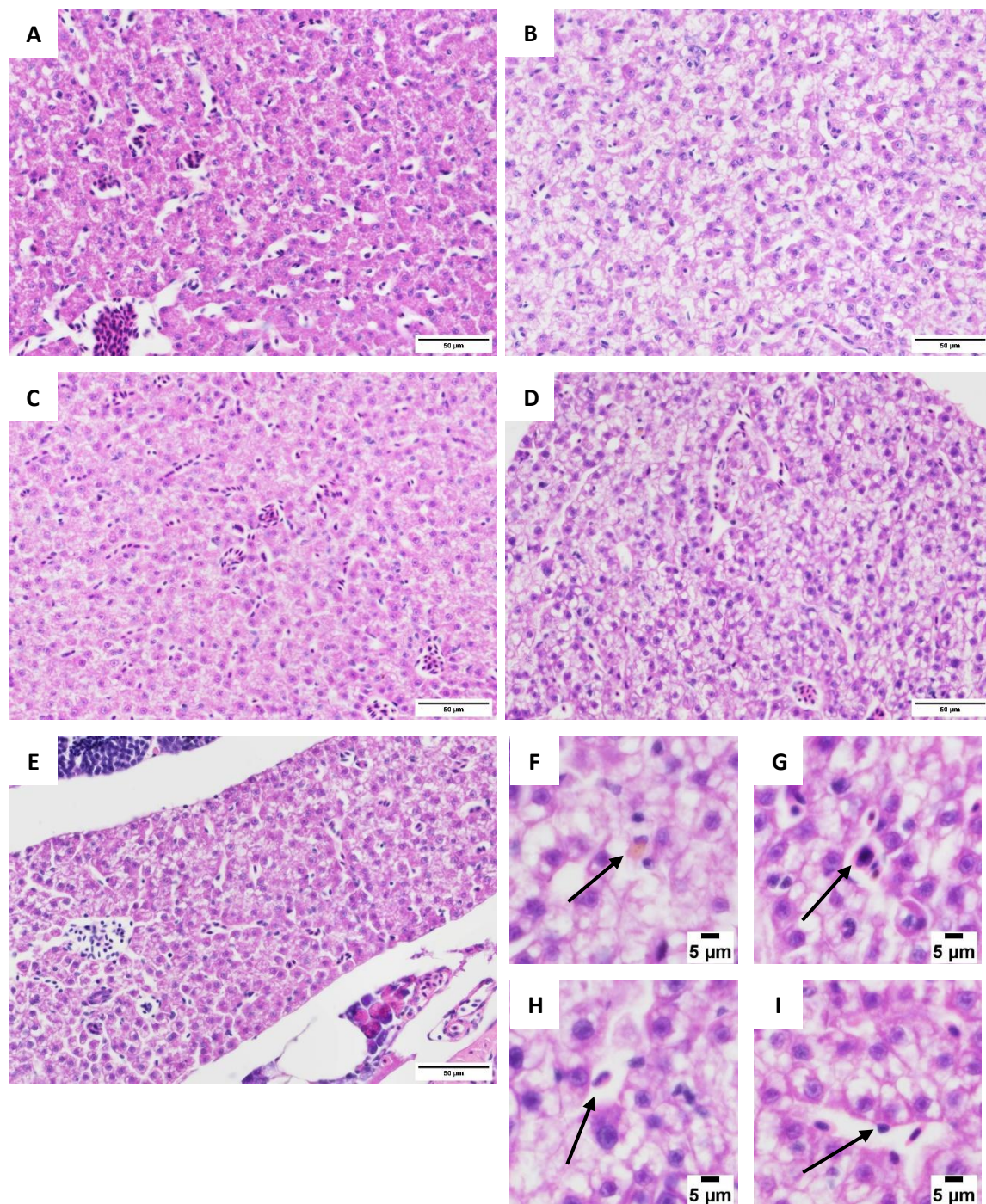
W wątrobie osobników z grupy kontrolnej (ryc. 8.A) nie znaleziono zmian o charakterze histopatologicznym. W parenchymie wyróżnić można regularnie ułożone wielokątne hepatocyty z centralnie ułożonym jądrem komórkowym. W wątrobach osobników narażonych na działanie nanocząstek (ryc. 8.B i ryc. 8.C) obserwowane są zmiany polegające na poszerzeniu sinusoid oraz obkurczeniu hepatocytów. Jelita przednie osobników w grupie kontrolnej (ryc. 8.D) charakteryzują się poprawną budową. Fałdy jelitowe ułożone są regularnie bez widocznych cech odkształceń nabłonka. W grupie o stężeniu AgNP 0,1 mg/L (ryc. 8.E) obserwowana jest postępująca liza nabłonka jelit. Jelita osobników z grupy AgNP 1 mg/L (ryc. 8.F) wskazują na poszerzenie się blaszki środkowej i możliwą fuzję dwóch fałdów jelitowych. Trzustka osobników w grupie kontrolnej (ryc. 8.G) charakteryzuje się poprawną budową z dobrze widocznymi ziarnami zymogenu. W grupie o stężeniu AgNP 0,1 mg/L (ryc. 8.H) obserwuje się zmiany histopatologiczne polegające na nadmiernym stłuszczeniu oraz brak depozycji zymogenu. Trzustki osobników z grupy AgNP 1 mg/L charakteryzują się obniżoną względem grupy kontrolnej depozycją ziaren zymogenu przy jednoczesnym stłuszczeniu tego narządu.

Obserwacje histologiczne w setnym dniu eksperymentu.

Wątroba, niezależnie od grupy, charakteryzuje się dużym ukrwieniem. W wątrobie osobników z grup: kontrolnej, AgNP 0,001 mg/L, AgNP 0,01 (ryc. 8.A,B,C) nie obserwuje się zmian o charakterze histopatologicznym. W parenchymie wyróżnić można regularnie ułożone wielokątne hepatocyty z centralnie ułożonym jądrem komórkowym. W grupach narażonych na azotan srebra (ryc. 9 E) oraz nanocząstki srebra zauważyć można tendencję do powiększania się komórek wątrobowych (ryc. 9 B,C,D), w przypadku grup AgNP wraz ze wzrostem stężenia. W grupie o stężeniu AgNP 1 mg/L obserwowane są zmiany o charakterze patologicznym polegające na infiltracji parenchymy oraz naczyń krwionośnych komórkami układu odpornościowego: melanomakrofagami (ryc.9.F), monocytami (ryc.9.G), eozynofilami (ryc.9.H), makrofagami (ryc.9.I) (na każdym zdjęciu zaznaczone strzałkami).

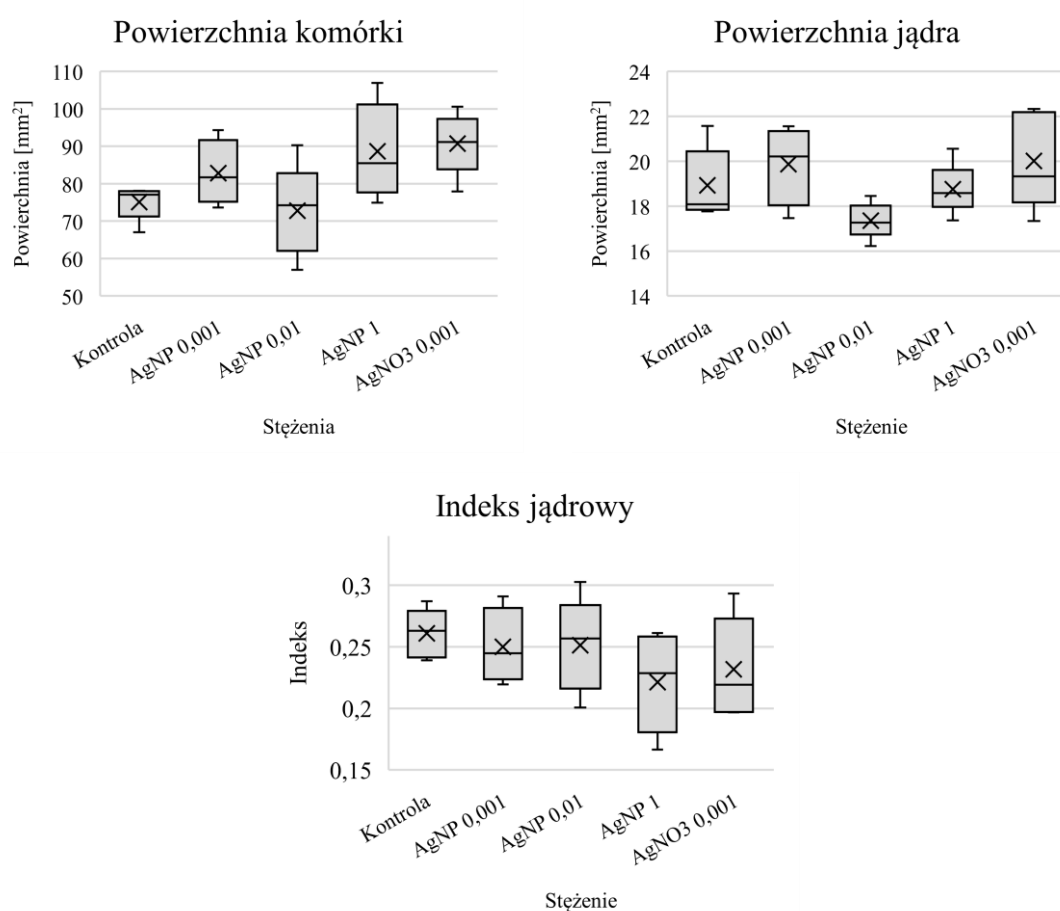


Rycina 8. Obraz preparatów histologicznych w przekroju podłużnym daniø pręgowanego w dwudziestym szóstym dniu eksperymentu. Zdjęcia prezentują przekrój przez: wątroby w grupach: A) kontrolnej; B) AgNP 0,1 mg/L (↑-poszerzona sinusoida); C) AgNP 1 mg/L (↑-poszerzona sinusoida); jelito przednie w grupach: D) kontrolnej; E) AgNP 0,1 mg/L; F) AgNP 1 mg/L (↑-poszerzona sinusoida, *fuzja fałdów jelitowych); trzustkę w grupach: G) kontrolnej (↑-depozycja glikogenu); H) AgNP 0,1 mg/L (*-wakuolizacja); I) AgNP 1 mg/L (↑-poszerzona sinusoida, *-wakuolizacja). Barwienie H&E, czarny pasek oznacza skalę.



Rycina 9. Obraz preparatów histologicznych w przekroju podłużnym danio przegowanego w setnym dniu eksperymentu. Zdjęcia prezentują przekrój przez: wątrobę w grupach: A) kontrolnej B) AgNP 0,001 mg/L C) AgNP 0,01 mg/L; D) AgNP 1 mg/L; E) AgNO₃ 0,001 mg/L; Zmiany histopatologiczne w grupie AgNP 1 mg/L melanomakrofagi (ryc.9.F), monocyty (ryc.9.G), eozynofile (ryc.9.H), makrofagi (ryc.9.I) (na każdym zdjęciu zaznaczone strzałkami). Barwienie H&E, czarny pasek oznacza skalę.

Zaobserwowano, że w grupach narażonych na nanocząstki srebra powierzchnia hepatocytów wzrastała wraz ze stężeniem badanych ksenobiotyków (ryc. 10), jednakże nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych w wartościach tego parametru. Podobnie, nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych między badanymi grupami w powierzchni jąder hepatocytów. Najniższą średnią powierzchnię stwierdzono u ryb z grupy AgNP 0,01 mg/L, jednakże różnice względem pozostałych grup nie były istotne statystycznie (ryc. 10). Wartość indeksu jądrowego zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia nanocząstek srebra, jednakże zmiany te nie były istotne statystycznie (ryc. 10).



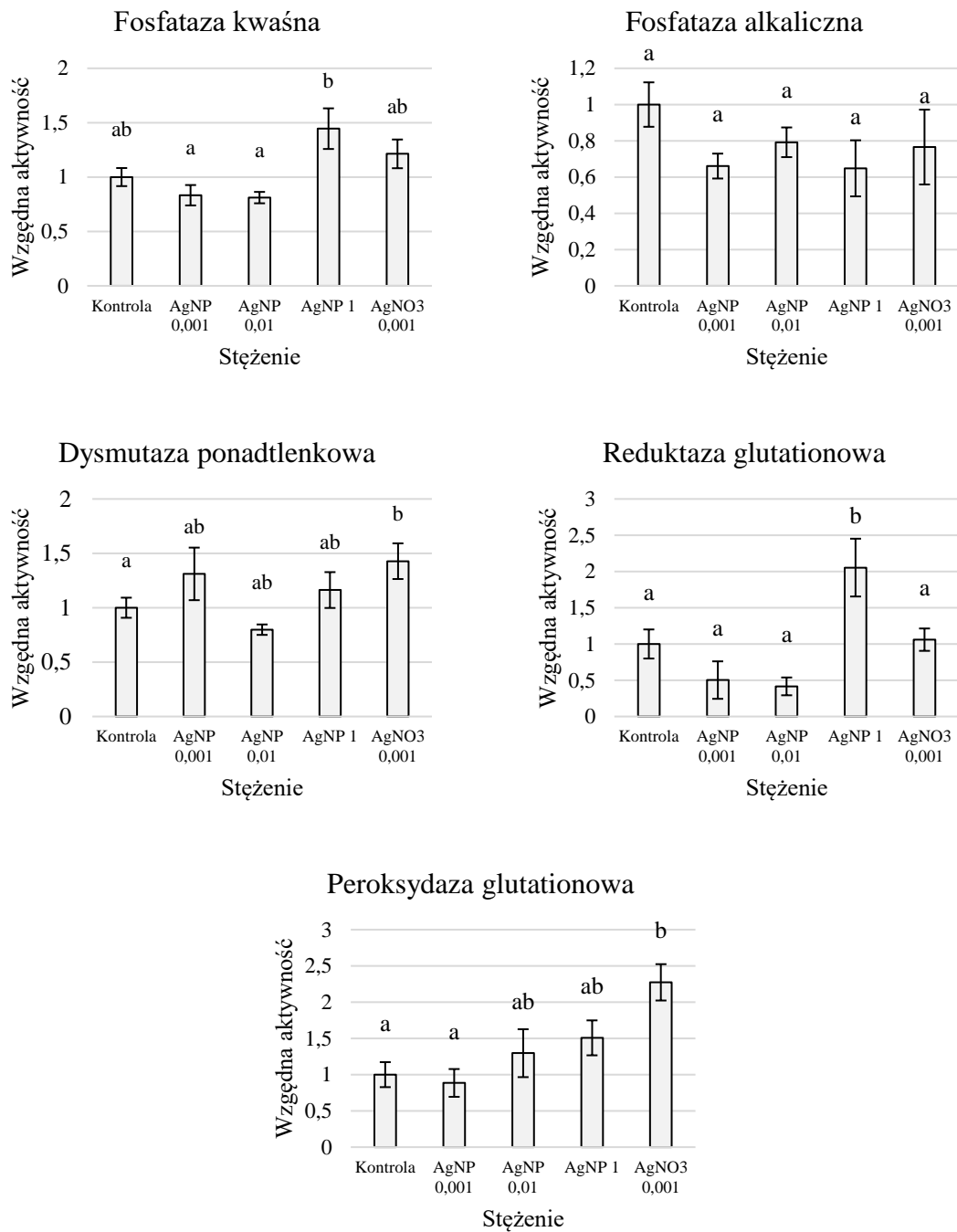
Rycina 10. Wyniki analiz histomorfometrycznych hepatocytów. Analiza statystyczna testem Kruskala-Wallisa nie wskazała różnic istotnych pomiędzy grupami (n=5). Średnia zaznaczona została poziomą kreską, mediana symbol X.

4.4. Analizy biochemiczne

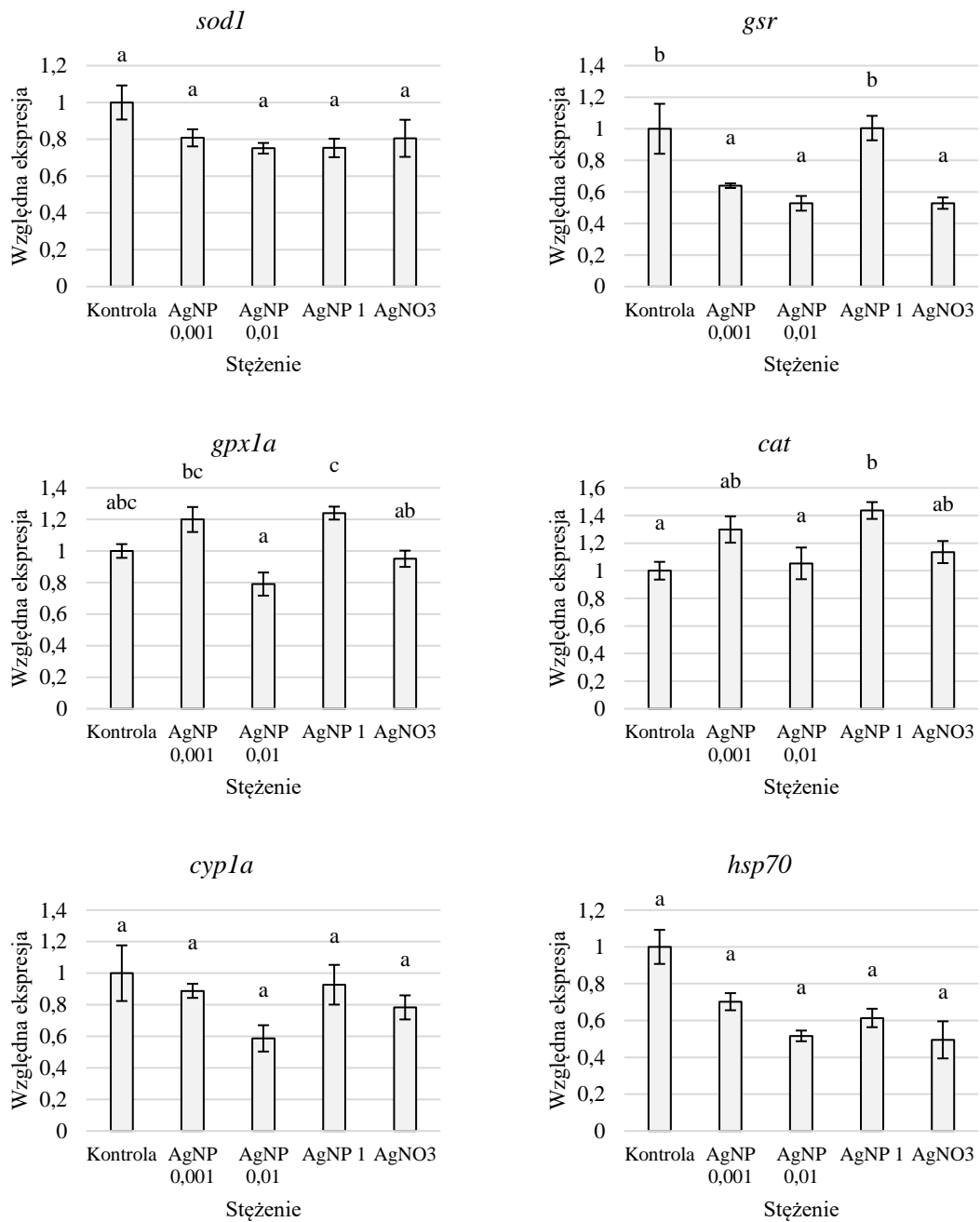
Aktywność fosfatazy kwaśnej nie różniła się statystycznie istotnie pomiędzy grupami badanymi, a grupą kontrolną. Stwierdzono jedynie różnice statystycznie istotne w aktywności tego enzymu pomiędzy rybami narażonymi na nanocząstki srebra w stężeniu 1 mg/L a 0,001 mg/L oraz 0,01 mg/L (ryc. 11). Nie wskazano różnic istotnych statystycznie w aktywności fosfatazy alkalicznej. Obserwowano jedynie niższą aktywność w grupach narażonych na badane ksenobiotyki w porównaniu do grupy kontrolnej (ryc. 11). Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej nie różniła się statystycznie istotnie pomiędzy grupą kontrolną a grupami, gdzie ryby były narażone na nanocząstki srebra (ryc. 11). Stwierdzono jedynie różnice statystycznie istotne w aktywności tego enzymu pomiędzy grupą AgNO₃ 0,001 mg/L, a grupą kontrolną (ryc. 11). Najwyższą, statystycznie istotną aktywność reduktazy glutationowej stwierdzono w grupie ryb narażonych na nanocząstki srebra w stężeniu 1 mg/L. Pomędzy pozostałymi grupami doświadczalnymi nie stwierdzono różnic statystycznie istotnych (ryc. 11). Wykazano trend wzrostu aktywności peroksydazy glutationowej wraz ze zwiększającym się stężeniem nanocząstek srebra, jednakże różnice w aktywności nie były istotne statystycznie (ryc. 11). Najwyższą aktywność tego enzymu stwierdzono w grupie ryb narażonych na AgNO₃ 0,001mg/L, a różnice były statystycznie istotne w porównaniu do wartości tego parametru w grupie kontrolnej i AgNP 0,001 mg/L (ryc. 11).

4.5. Wyniki analiz genetycznych

Ekspresja genów *sod1a*, *hsp70* oraz *cypla* były niższa w grupach badanych niż w grupie kontrolnej (ryc. 12), nie stwierdzono jednak różnic statystycznie istotnych w poziomie ekspresji tych genów. Wyniki ekspresji *gsr* wskazują na istotnie statystyczny spadek w grupach badanych o stężeniach AgNP 0,001 mg/L, AgNP 0,01 mg/L oraz AgNO₃ 0,001 mg/L. Profil ekspresji genów *gpx1a* oraz *cat* był podobny pomiędzy grupami i charakteryzował się wzrostem ekspresji w grupach AgNP 0,001 mg/L oraz AgNP 1 mg/L względem grupy kontrolnej oraz spadkiem ekspresji tych genów w grupie AgNP 0,01 mg/L w porównaniu do innych grup narażonych na działanie nanocząstek (ryc. 12).



Rycina 11. Wykresy aktywności relatywnej (średnia±błąd standardowy) analizowanych enzymów. Litery oznaczają przynależność do grup homogennych (test Kruskala-Wallisa; $p < 0,05$; $n = 10$).



Rycina 12. Wykresy relatywnej ekspresji (średnia±błąd standardowy) analizowanych genów. Litery oznaczają przynależność do grup homogennych (test Kruskala-Wallisa; $p < 0,05$; $n=5$).

5. Dyskusja

Rozwój nanotechnologii, szczególnie w zakresie opracowania nowych metod pozyskiwania nanocząstek srebra, spopularyzował ich użycie w różnych produktach konsumenckich. Ich unikalne właściwości przyciągnęły uwagę wielu branż, a zwłaszcza tych, w których efekt antyseptyczny jest szczególnie pożądanym. Dotyczy to przemysłu spożywczego, włókienniczego i budowlanego, a także medycyny, kosmetologii, farmacji i innych. Nanocząstki srebra znajdują również zastosowanie w energetyce oraz w biomedycynie. Szacuje się, że globalna produkcja nanocząstek srebra w roku 2014 wahała się w zakresie od 135-435 ton (Pulit-Prociak i Banach, 2016), a roku 2015 mogła już dochodzić do 550 ton (Qiang i wsp., 2020). Innowacje w zakresie produktów konsumenckich o wartości handlowej nie byłyby możliwe bez wcześniejszych badań i odkryć w zakresie potencjalnego wykorzystania nanocząstek srebra. Lata 2001- 2011 charakteryzowały się znaczącym wzrostem liczby opublikowanych artykułów naukowych badających możliwości zastosowań nowych materiałów. Z poziomu 247 pozycji w 2002 roku, liczba ta wzrosła do 3603 pozycji w 2011 roku. Większość osiągnięć zostało dokonanych w dziedzinie chemii, materiałoznawstwa, fizyki, inżynierii, polimerów, spektroskopii, elektrochemii, biochemii molekularnej, optyki i spektroskopii (Haider i Kang, 2015). Tak gwałtownie postępujący proces popularyzacji nanocząstek srebra zwiększył ich potencjał do interakcji ze środowiskiem lądowym i wodnym, jak również do narażenia zdrowia ludzkiego. Analizy naukowe sugerują, że nadal istnieją luki w ocenie ryzyka związanego z wystawieniem na ekspozycję nanocząstkami zarówno ludzi, jak i środowiska (Ferdous i Nemmar, 2020). W związku z tym istnieje potrzeba przeprowadzenia wielowymiarowej oceny ryzyka ekologicznego nanocząstek, ale wymaga ona zrozumienia długoterminowych skutków stężeń istotnych w kontekście ochrony środowiska (Grün i wsp., 2018; Ottoni i wsp., 2020).

Niniejsza praca skupia się na ewaluacji toksycznego wpływu nanocząstek srebra na organizm modelowy jakim jest danio pręgowany (*Danio rerio*). Stanowić ma uzupełnienie wiedzy w zakresie negatywnego wpływu tego ksenobiotyku w kontekście ciągłego zanieczyszczenia środowiska ryb na wielu etapach ich rozwoju. Długoterminowa ekspozycja, począwszy od wczesnych etapów życia organizmu do okresu, w którym osiąga on dojrzałość płciową, przyczynić się może do poprawy modelowania zagrożenia środowiskowego, uwzględniającego: analizę wpływu na dynamikę populacji; zmiany homeostazy wątroby, a więc najważniejszego narządu odpowiedzialnego za detoksykację

organizmu; jak i również przyrostu wiedzy na temat dojrzewania osobników w warunkach potencjalnie ograniczających poprawny rozwój. W celu oceny tych zmian posłużono się narzędziami inspirowanymi pojęciami z zakresu oceny ryzyka ekologicznego lub środowiskowego. To znaczy, że praca obejmowała wybór oraz oznaczenia swoistych biomarkerów, będących jednocześnie mierzalnym wskaźnikiem odpowiedzi organizmów na ksenobiotyk.

5.1. Parametry ciała

Parametry takie, jak: śmiertelność, długość całkowita, długość standardowa, masa ciała oraz wskaźniki kondycji są podstawowymi wskaźnikami, które są szeroko stosowane zarówno w zarządzaniu akwakulturą, jak i w badaniach laboratoryjnych, ponieważ dostarczają informacji o stanie populacji oraz kondycji poszczególnych ryb. Dodatkowo, zakładając możliwość wyznaczenia zależności pomiędzy długością i masą ryby, przyjąć można, że im większa masa ryby o danej długości tym jest w lepszej kondycji (Panjang-Berat i wsp., 2015; Schloesser i Fabrizio, 2017). W przypadku danio pręgowanego wskaźniki kondycji (np. taki jak wskaźnik kondycji Fultona) służyć mogą do szybkiego oszacowania statusu energetycznego organizmu lub zawartości lipidów (otłuszczenia) w obrębie organizmu (Clark i wsp., 2018).

Przegląd światowej literatury naukowej nie oferuje szerokiego zakresu badań łączących zależność stężenia nanocząstek srebra ze wzrostem ryb. W niniejszej pracy wykazano, że wraz ze wzrastającym stężeniem nanocząstek srebra zmniejszają się parametry ciała ryb, takie jak ich długość oraz masa. Podobne wyniki uzyskane zostały w długoterminowych testach na karasiu srebrzystym (*Carassius auratus gibelio*), gdzie po półrocznej ekspozycji, mającej początek w stadium larwalnym, wykazano obniżenie się zarówno długości ciała, jak i masy ryb, w stosunku do grupy kontrolnej, a zmiana zależna była od użytego stężenia (0,001 mg/L, 0,002 mg/L oraz 0,003 mg/L), przy czym nie obserwowano wzrostu śmiertelności w grupach badanych (Forouhar Vajargah i wsp., 2019). Doświadczenie przeprowadzone na stadium embrionalnym danio pręgowanego wskazuje, że wysokie stężenia nanocząstek (0,963 mg/L oraz 1,925 mg/L) hamują wzrost długości ciała embrionu (względem grupy kontrolnej) na drodze inhibicji resorpcji woreczka żółtkowego podczas siedemdziesięciudwugodzinnej ekspozycji (Qiang i wsp., 2020). Badania przeprowadzone przy użyciu nanocząstek srebra w zakresie stężeń od 0,15 mg/L do 15 mg/L, pokrytych trzema rodzajami powłok, wskazały brak wpływu na wzrost młodocianych stadiów ryżanki japońskiej (*Oryzias latipes*) podczas dwudziesto-

jednodniowej ekspozycji, pomimo różnic w śmiertelności wewnątrz eksperymentu (Kwok i wsp., 2012). Obserwacje dokonane na młodocianych (embrionalnym, larwalnym i post-larwalnym) stadiach tego gatunku z wykorzystaniem nanocząstek srebra pokrytych powłoką PVP zobrazowały brak prostoliniowej zależności. Sześćdziesięciodniowa ekspozycja wskazała, że w grupach o niższych stężeniach (0,1 mg/L oraz 0,2 mg/L) obserwowano nieznaczny spadek zarówno długości ciała, jak i masy ryb oraz brak różnic w śmiertelności względem grupy kontrolnej. Z drugiej jednak strony w grupach o stężeniach wyższych (0,4 mg/L oraz 0,6 mg/L) zaobserwowano wzrost zarówno długości ciała, jak i jego masy przy jednoczesnym wzroście śmiertelności (Wu i wsp., 2010).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki są zgodne z doniesieniami naukowymi z całego świata, gdyż sugerują, że nanocząstki srebra nie są obojętne dla wzrostu ryb. Opisane różnice w parametrach ciała wskazują na dwa potencjalne i mogące występować równoległe zjawiska: a) hamowanie wzrostu ryb przez nanocząstki srebra na drodze zaburzeń statusu energetycznego i b) nadmierną depozycję materiału zapasowego, tylko pozornie wpływającą pozytywnie na kondycję ryb, szczególnie widoczną u samic. Przyczyn tego oddziaływania może być kilka i dotyczą one wpływu zaburzającego różne etapy rozwoju ryb, zarówno w kontekście ich wzrostu, jak i następstw penetracji srebra w głąb organizmu.

5.2. Rozkład fenotypu płci

Badania mające na celu określanie wpływu na organizmy danych ksenobiotyków skupiają się na ewaluacji biomarkerów na poziomie indywidualnych osobników. Jednak te punkty końcowe na poziomie organizmu są niepełne w kontekście oceny ryzyka ekologicznego lub środowiskowego oraz jego założeń. Indywidualna ewaluacja składowych pomija efekt długoterminowego utrzymywania się populacji gatunków w przestrzeni i czasie, ignorując naturalnie zmieniające się warunki środowiskowe, czy obecność innych stresorów. Ryzyko ekologiczne jest najczęściej charakteryzowane jako stosunek przewidywanego zagrożenia lub mierzonego narażenia do przewidywanego poziomu braku działań niepożądanych, wyrażonego jako stężenie lub dawka (Forbes i wsp., 2010). Modele populacyjne oparte między innymi o strukturę wieku oraz płci mogą wnieść wartość dodaną do oceny ryzyka ekologicznego poprzez lepsze zrozumienie powiązań między indywidualnymi reakcjami a wielkością i strukturą populacji oraz poprzez uwzględnienie większych poziomów złożoności ekologicznej (Forbes i wsp., 2008).

Badania przeprowadzone przy użyciu toksyny o działaniu estrogennym 4-tert-oktylofenolu w stężeniu 0,2 mg/L wykazały zmianę udziału samic w populacji danio pręgowanego do 90%, co skutkowało zmniejszeniem się liczebności do 51% osobników na początku eksperymentu. Następnie podczas regeneracji, zaobserwowano silne uprzedzenie do płci przeciwnej, prowadząc do dynamicznej oscylacji liczebności populacji przed powrotem do poziomu sprzed ekspozycji (Hazlerigg i wsp., 2014). Eksperymenty *in vitro* na pęcherzykach jajnikowych pierwotnych ryb *Oryzias melastigma* wskazują, że nanocząstki srebra (zwłaszcza te pokryte powłoką PVP dla EC50 równego 0,007 mg/L) w znaczący sposób deregulują ekspresję genów, a tym samym szlak tworzenia związków steroidowych, kluczowych dla pracy gonad, zatem potencjalnie stanowią toksynę zaburzającą układ endokrynowy (Degger i wsp., 2015). Wspomniana już publikacja z udziałem karasia złocistego, wskazała zależność między zwiększającym się stężeniem nanocząstek srebra, a odsetkiem ryb niewykształcających komórek płciowych (Forouhar Vajargah i wsp., 2019). Na poziomie molekularnym nanocząstki srebra na drodze peroksydacji lipidów zmieniają kompozycję kwasów tłuszczowych oocytów u osobników dorosłych *Danio rerio*. Lipidy stanowią integralny składnik układu rozrodczego gdyż są selektywnie magazynowane w oocytach, jako materiał do rozwoju przyszłych embrionów (Seyedi i wsp., 2021). Podczas siedmiodniowej ekspozycji dorosłych danio pręgowanego wskazano na zahamowanie rozwoju oocytów w gonadach żeńskich ryb narażonych na nanocząstki srebra w stężeniach 0,5 i 1,0 mg/L. Analizy gonad samców wykazały, że obecność nanocząstek srebra (w zakresie stężeń 0,01 mg/L do 1 mg/L) obniżała procentowy udział spermatogonii w parenchymie narządu na rzecz spermatyd (Szudrowicz i wsp., 2022).

Wyniki eksperymentu potwierdzają dotychczasowe badania o negatywnym wpływie nanocząstek srebra na rozwój i pracę gonad. Ksenobiotyk ten jednocześnie może opóźniać rozwój płci lub wręcz zmieniać jego szlak. Stwierdzenie to wpasowuje się w narrację mówiącą, że szczególnie niebezpieczne dla zaburzenia równowagi rozkładu płci są toksyny mające wpływ na gospodarkę hormonalną regulującą wykształcanie się płci, induktorów lub inhibitorów sekrecji hormonów. Ponadto nanocząstki srebra mają zdolność do zaburzania funkcjonowania już wykształconych gonad, nie tylko na zasadzie deregulacji szlaków metabolicznych, ale też już dojrzałych elementów składowych układu rozrodczego.

5.3. Biomarkery histologiczne

Techniki histopatologiczne obejmują mikroskopowe badanie komórek i tkanek organizmu oraz ilościowe określenie nieprawidłowości histopatologicznych. Zmiany histologiczne w wybranych narządach docelowych są czułymi biomarkerami działania ksenobiotyków. Dlatego też analiza zmian histologicznych w różnych tkankach ryb jest od dziesięcioleci szeroko stosowana jako instrument w toksykologii do monitorowania ostrych i przewlekłych skutków ekspozycji na dane toksyny, a także w celu dostarczenia dodatkowych informacji, uzupełniających analizy fizykochemiczne (Yancheva, 2016).

W momencie przekroczenia barier biologicznych i infiltracji krwiobiegu, toksyny docierają do organów wewnętrznych ryb, a tym samym rozpoczynają procesy akumulacji oraz zaburzają homeostazę organizmów. Liczne badania poszukujące związków przyczynowych związanych ze zdrowiem ryb wskazują, że wątroba stanowi prawdopodobnie jeden z najlepszych wyborów do ewaluacji ogólnej kondycji ryb. Jest ona organem detoksykacyjnym, niezbędnym zarówno do prowadzenia metabolizmu, jak i wydalania substancji toksycznych. W związku z pełnionymi funkcjami jest również narządem docelowym dla wielu ksenobiotyków ze względu na jej duże ukrwienie (Mohamed, 2009; Salamat i Zarie, 2012).

Dotychczas przeprowadzono wiele eksperymentów na rybach, które pozwalają na określenie toksycznego wpływu nanocząstek srebra na pracę wątroby (Roy i Nath, 2022). Zmiany o charakterze histopatologicznym tego narządu objawiają się na zasadzie dwóch obserwowalnych mechanizmów: a) zmianą budowy hepatocytów - zwiększenia lub obniżenia powierzchni komórek, ich wakuolizacją, utratą regularnych wielokątnych kształtów, zacieraniem granic pomiędzy komórkami w obrazie mikroskopowym, pyknozą jąder komórkowych wraz z obserwacją stanów nekrotycznych; oraz b) pobudzeniem układu odpornościowego - naciekami komórek odpornościowych w parenchymie narządu jak i w naczyniach krwionośnych, tworzeniem się centrów melanomakrofagowych czy zwiększoną liczbą komórek Browicza-Küpferra. Występowanie powyższych zmian stwierdzono między innymi w następujących badaniach toksyczności chronicznej: a) piętnastodniowej ekspozycji w stężeniach 0,1 i 0,001 mg/L nanocząstek srebra na sumie afrykańskim (*Clarias gariepinus*) (Naguib i wsp., 2020); b) dwudziestośmiodniowym eksperymencie na gatunku *Labeo rohita*, przeprowadzonym w stężeniach z zakresu 10-55 mg/L (M. S. Khan i wsp., 2018); c) dwudziestośmiodniowym teście z udziałem pstrąga tęczowego (*Oncorhynchus mykiss*) przeprowadzonym w stężeniu 1,5 mg/L (Ostaszewska

i wsp., 2018); czy d) w eksperymencie żywieniowym, polegającym na zanieczyszczeniu pokarmu nanocząstkami srebra i podawaniu przez piętnaście dni, sumom *Rhamdia quelen* (López-Barrera i wsp., 2021).

Powyższe przesłanki, a także wyniki obecnego eksperymentu sugerują niespecyficzny, ale toksyczny wpływ nanocząstek srebra na homeostazę wątroby podczas długoterminowych ekspozycji, zwłaszcza w wyższych stężeniach nanocząstek srebra. Samo wystąpienie zmian wydaje się być niezależne od użytych stężeń, wielkości czy drogi podania nanocząstek, jak i również od gatunku ryb i czasu badania. Ich nasilenie jest bardziej widoczne w wyższych stężeniach, ale nie można mówić o liniowym charakterze tego zjawiska. Ponadto, obserwacje wskazują na kilka potencjalnych mechanizmów toksyczności w obrębie tego narządu, przede wszystkim na aktywację układu immunologicznego oraz na zaburzenia pracy hepatocytów (co zauważono u osobników w dwudziestym szóstym dniu ekspozycji).

Literatura naukowa wskazuje, że metale stanowią środowiskowe czynniki ryzyka w zakresie zaburzeń gospodarki hormonalnej trzustki z podobnych powodów co wątroba. Obserwowana jest tendencja tego narządu do akumulowania toksyn ze względu na jego wysokie ukrwienie. Toksyczny wpływ metali może wpływać na homeostazę zarówno części egzokrynowej, jak i endokrynowej trzustki poprzez zmiany charakteru ekspresji genów i białek, prowadząc między innymi do cukrzycy (Rana, 2014). Trzydziestodniowy eksperyment żywieniowy z udziałem pstrąga tęczowego z narażeniem na nanocząstki tlenku niklu uwidocznili zmiany histopatologiczne obejmujące dezintegrację, martwicę i obkurczenie komórek pęcherzykowych, obrzęk tkanki łącznej oraz przerwanie ciągłości błon śluzowych trzustki (Nazdar i wsp., 2018). Testy toksyczności ostrej na tilapii mozambijskiej (*Oreochromis mossambicus*) wskazały zmiany degeneracyjne tkanki trzustki na skutek narażenia ryb na nanocząstki tlenku glinu (Murali i wsp., 2017).

W przypadku nanocząstek srebra, wiedza na temat ich wpływu na pracę trzustki jest bardzo ograniczona (Alkaladi i wsp., 2014). Podczas dwudziestoosmiodniowej ekspozycji tilapii nilowej (*Oreochromis niloticus*) i dorady (*Sparus auratus*) w stężeniach nanocząstek 0,005 mg/L i 0,001 mg/L zaobserwowano zatkania naczyń krwionośnych oraz obkurczenie komórek pęcherzykowych trzustki (Moustafa i wsp., 2021). Badania sprawdzające antybakteryjne właściwości nanocząstek srebra stwierdziły zależność między wzrostem stężenia tego ksenobiotyku (od 0,15 mg/L do 0,75 mg/L), a obniżeniem intensywności

zmian histopatologicznych w części trzustkowej wątroby tilapii nilowych po narażeniu na bakterię *Aeromonas veronii* (Elgendy i wsp., 2022). Uzyskane wyniki wskazują na niespecyficzny, ale również silnie toksyczny wpływ nanocząstek srebra, zwłaszcza u ryb w młodym wieku. Na podstawie obserwowanych zmian przypuszczać można, że zaburzenie pracy trzustki mogło być determinującym czynnikiem wpływającym na śmiertelność grupy badanej AgNP 0,1 mg/L. Ze względu na ograniczoną wiedzę w temacie wpływu nanocząstek srebra na ten narząd, istnieje jednak potrzeba prowadzenia dalszych badań nad tym zjawiskiem.

Badania wskazują, że środowiska w wysokim stopniu poddawane wpływom antropogenicznym mogą oddziaływać negatywnie na pracę układu trawiennego organizmów wodnych. Narządy odpowiedzialne za przyswajanie substancji odżywczych opisywane są jako jedne z głównych dróg penetracji ksenobiotyków do wnętrza organizmów. Przewód pokarmowy ryb, ze względu na swoje funkcje przetwarzania i wchłaniania pożywienia, jest wysoce narażony na działanie toksyn przyjmowanych wraz z pokarmem lub z pobieraną wodą (Marinsek i wsp., 2022). Ten drugi z kierunków narażenia dotyczy jednak głównie gatunków słonowodnych, bowiem słodkowodne piją mało wody, co znacząco ogranicza ilość toksyn wchłanianych poprzez układ pokarmowy (Griffith, 2017).

Badania układu pokarmowego i jego składowych prowadzone są zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Dwie prace badawcze przeprowadzone na linii komórkowej RTgutGC pochodzącej z pstrąga tęczowego, potwierdzają zdolność komórek nabłonka do aktywnego poboru nanocząstek srebra przy jednoczesnym angażowaniu mechanizmów odpowiedzialnych za detoksykację jonów metali (Chanda i wsp., 2021; Minghetti i Schirmer, 2016). Dwudziestodniowy eksperyment na karpniu (*Cyprinus carpio*) w zakresie stężeń 0,03-0,09 mg/L wskazał na zmiany histopatologiczne jelit w zakresie zmian nekrotycznych, aktywacji układu immunologicznego, złuszczeń i dezintegracji błony śluzowej (Kakakhel i wsp., 2021). Dwudziestojednodniowa ekspozycja pstrąga tęczowego na nanocząstki srebra o zakresie stężeń 0,1 mg/L do 10 mg/L w wodzie słodkiej wskazała na zmiany nekrotyczne oraz stany zapalne. Ponadto, badacze stwierdzili wyższe stężenie nanocząstek srebra w obrębie jelit niż w wątrobie, co prawdopodobnie mogło być skutkiem odruchu połknięcia wody, przyczyniającego się do zwiększonej depozycji ksenobiotyku w warunkach narażenia na stres (Johari i wsp., 2015). Siedmiodniowa ewaluacja skutków nanocząstek srebra w stężeniu 0,02 mg/L, przeprowadzona na danio

pręgowanym, wskazała możliwą przyczynę infiltracji nanocząstek w głąb układu pokarmowego. Tym powodem może być tendencja zwłaszcza młodocianych ryb do mylenia nanocząstek oraz ich aglomeratów z pokarmem (Xiao i wsp., 2020). Uzyskane w obecnym eksperymencie wyniki są zgodne z literaturą naukową i wskazują na silnie toksyczny wpływ na ryby nanocząstek srebra w wyższych stężeniach, stwierdzony w dwudziestym szóstym dniu ekspozycji. Podobnie jak w przypadku trzustki: a) nie stwierdzono zależności liniowej między stopniem zaawansowania zmian histopatologicznych, a stężeniami ksenobiotyku; oraz b) biorąc pod uwagę obserwowany stopień zmian jelita, wywnioskowano, że zaburzenia pracy tego narządu mogły być drugim czynnikiem determinującym wysoką śmiertelność w grupie 0,1 mg/L.

5.4. Niespecyficzne biomarkery biochemiczne

Parametry fizjologiczne, histologiczne i morfologiczne nie są przydatne jako sygnały wczesnego ostrzeżenia podczas oceny ryzyka, jednakże są stosunkowo łatwe do określenia i wartościowe dla oceny ekotoksykologicznego znaczenia innych biomarkerów, takich jak biomarkery biochemiczne, świadczą bowiem o nieodwracalnym uszkodzeniu tkanek lub chorobie (van der Oost i wsp., 2003).

Fosfataza alkaliczna jest niespecyficznym wskaźnikiem w diagnostyce uszkodzeń różnych narządów, między innymi wątroby. Enzym ten odgrywa istotną rolę w procesie detoksykacji ksenobiotyków w hepatocytach (Hatami i wsp., 2019). Ponadto, pomiar aktywności fosfatazy alkalicznej w płynach międzykomórkowych może być pośrednio przydatny do oceny funkcji błon komórkowych narażonych na działanie ksenobiotyków. Interakcja zanieczyszczeń środowiskowych ze strukturą fosfatazy alkalicznej lub peroksydacją lipidów błon komórkowych może powodować wahania aktywności tego enzymu wewnątrz komórek lub w płynach pozakomórkowych, a tym samym wskazywać na poziom stresu doznawanego przez komórki (Banaee, 2020). Oceny ryzyka immunotoksykologicznego wykazały, że wykrycie immunomodulacyjnych efektów ksenobiotyków może być wykorzystywane jako wskaźnik potencjalnego zatrucia. W ramach nieswoistego układu odpornościowego, makrofagi znajdują się w pierwszej linii obrony organizmu, są zdolne pobierać obcy materiał oraz degradować patogeny i resztki komórkowe organizmu. W tym procesie fosfataza kwaśna jest jednym z najważniejszych enzymów biorących udział w degradacji fagocytywowanego materiału i dlatego może służyć jako marker zdolności makrofagów do trawienia (Broeg, 2003).

Podobnie do uzyskanych wyników w trakcie omawianego eksperymentu, badania aktywności fosfataz w obrębie wątrób, poprowadzone na gatunku *Labeo rohita*, wskazały na zależność między dawką (w zakresie stężeń od 5 do 100 mg/L) nanocząstek srebra, a aktywnością fosfatazy kwaśnej, ale również na brak takiej zależności dla fosfatazy alkalicznej (Rajkumar i wsp., 2016). Doświadczenie prowadzone na żmijogłowach (*Channa punctata*) wskazało zależność między wzrostem aktywności obydwu fosfataz a stężeniem nanocząstek (w zakresie 0,001 mg/L, 0,002 mg/L i 0,003 mg/L) (Sharma i wsp., 2019). Poza ewaluacją w obrębie samego narządu stwierdza się ściłą zależność poziomu aktywności fosfatazy alkalicznej między wątrobą oraz krwią (Ali i wsp., 2006). Doświadczenia uwzględniające parametry hematologiczne wskazują jednoznacznie na zależność między stężeniem nanocząstek a wzrostem aktywności fosfatazy alkalicznej, przykładowo: a) w czternastodniowym doświadczeniu nad zmiennością toksyczności nanocząstek srebra ze względu na poziom zasolenia, wykonanym na jesiotrze kaspijskim (*Acipenser persicus*) (w stężeniach od 0,2 mg/L do 0,6 mg/L) (Banan i wsp., 2020) oraz b) w ośmiodniowym eksperymencie na pstrągu tęczowym (w stężeniach 0,1 mg/L, 0,2 mg/L, 0,4 mg/L) (Imani i wsp., 2015). W prezentowanych publikacjach wskazywano również na zmiany histopatologiczne wątrób zgodne z opisem w akapicie powyżej, wykazując tym samym zależność wystąpienia tych dwóch patologii od odpowiedzi organizmu na nanocząstki.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badanie wskazuje na niewielki wpływ nanocząstek srebra na hepatocyty po długotrwałej, bo studniowej ekspozycji. Wzrostu aktywności fosfatazy kwaśnej, wraz z widocznym pobudzeniem układu immunologicznego, w grupie AgNP 1 mg/L zachodzącym na skutek potrzeby degradacji elementów morfotycznych związanych z metabolizmem srebra, głównie przez makrofagi. Spadek aktywności tego w grupach o stężeniu nanocząstek srebra 0,001 mg/L i 0,01 mg/L, może mieć podobne źródło jak w badaniach na basie wielkogębowym (*Micropterus salmoides*) nad fulerenami (Oberdörster, 2004) i ryżance japońskiej z narażeniem na nanocząstki srebra (Wu i wsp., 2010). Obniżenie aktywności enzymu wraz z brakiem pobudzenia układu immunologicznego wskazywać by mogło na pozytywny wpływ nanocząstek srebra na homeostazę wątroby, na skutek poprawy jakości środowiska życia ryb, spowodowany głównie jego antybakteryjnymi właściwościami.

5.5. Niespecyficzne biomarkery genetyczne

W odpowiedzi na niesprzyjające warunki środowiskowe, komórki są zdolne do ekspresji mechanizmów obronnych, które przeciwdziałają toksycznym substancjom poprzez ich detoksykację albo naprawę uszkodzeń komórkowych przez nie spowodowanych. Działania prewencyjne obejmują zmianę we wzorcu ekspresji genów i szybką syntezę zestawu białek określanych jako białka stresu lub białka szoku cieplnego. Ze względu na ich zdolność reagowania na różne formy stresu, białka takie jak Hsp70 i CYP1A1 znalazły szerokie zastosowanie w biomonitoringu i toksykologii środowiskowej jako biomarkery. W tym kontekście za miarę zmian niespecyficznych indukcji genów stresowych przyjmuje się przyrost lub spadek produktów genowych w postaci mRNA w odpowiedzi na ekspozycję ksenobiotykiem (McClain i wsp., 2003; Mukhopadhyay i wsp., 2003). Z tego też względu wykorzystywane są one w ewaluacji toksycznego wpływu nanocząstek srebra, gdzie powiązано zmiany ekspresji (zarówno spadek, jak i wzrost) tych białek z innymi niespecyficznymi zmianami homeostazy, np. z opisywanymi histopatologiami wątroby. Podczas eksperymentów prowadzonych na tołpydze białej (*Hypophthalmichthys molitrix*) (Younas i wsp., 2022) oraz karpia (Khosravi-Katuli i wsp., 2018) stwierdzono podwyższony poziom ekspresji *hsp70* w odpowiedzi na nanocząstki srebra w zakresie stężeń od 0,05 mg/L do 0,7 mg/L. Natomiast testy toksyczności nanocząstek srebra na ryżance japońskiej (w stężeniu 0,001 mg/L) (Pham i wsp., 2012) i tilapii nilowej (w zakresie stężeń od 0 do 26,5 mg/L) (Mansour i wsp., 2021) wskazały na spadek ekspresji tego genu. W czwartym opisywanym badaniu stwierdzono również równoległe podniesienie ekspresji *cyp1a1*, podobnie jak w doświadczeniu na ryżance japońskiej (Chae i wsp., 2009) na skutek narażenia na nanocząstki srebra. W związku z brakiem obserwacji silnych zmian patologicznych uzyskanych dzięki technikom histologicznym, biochemicznym i molekularnym ryb w setnym dniu eksperymentu, należy stwierdzić, że użyte w doświadczeniu warunki ekspozycji nie wpływają w sposób znaczny na pracę wątroby. Wyjaśnienia wymaga jednakże fakt pobudzenia układu immunologicznego, jak i również kwestia widocznych zmian morfologicznych hepatocytów w najwyższym stężeniu nanocząstek srebra.

5.6. Biomarkery stresu oksydacyjnego

Stres oksydacyjny powstaje w wyniku znacznego wzrostu stężenia reaktywnych form tlenu (ROS) i reaktywnych form azotu (RNS) i/lub obniżenia poziomu komórkowych mechanizmów detoksykacyjnych, w postaci enzymów takich jak dysmutaza

ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa oraz reduktaza glutationowa. Wysoki poziom ROS wywiera toksyczny wpływ na biomolekuły, takie jak DNA, białka i lipidy (np. zachodzi nieenzymatyczna peroksydacja lipidów), prowadząc w ten sposób do akumulacji uszkodzeń oksydacyjnych w różnych miejscach komórki, rozregulowania wrażliwych szlaków metabolicznych i sygnalizacyjnych oraz ostatecznie do stanów patologicznych (Schrader i Fahimi, 2006).

Odpowiedzi organizmów na stres oksydacyjny są szeroko stosowane do oceny biologicznego wpływu zanieczyszczeń środowiska. Podczas badań prowadzonych na embrionach *Danio rerio* przy użyciu nanocząstek srebra o stężeniach 1-4 mg/L stwierdzono między innymi: nagromadzenie reaktywnych form tlenu (ROS), zahamowanie aktywności oraz obniżenie ekspresji dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy. Zmiany te zostały połączone z zaburzeniem pracy mitochondriów na skutek ingerencji w działanie szlaku oddechowego (Lu i wsp., 2022). Dwudziestojednodniowe doświadczenie na karpach w zakresie stężeń 0,25-1 mg/L nanocząstek srebra wskazało na podwyższoną aktywność katalazy oraz dysmutazy ponadtlenkowej osocza krwi w najniższym stężeniu, ale jej obniżenie w wyższych stężeniach (Vali i wsp., 2020). Podczas dwudziestojednodniowej ekspozycji ryby żyworódkowatej *Chapalichthys pardalis* w badanych stężeniach z zakresu 1,93 mg/L do 4,08 mg/L stwierdzono spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej i peroksydazy glutationowej, ale nie wskazano zmian w aktywności katalazy wątroby. Jednocześnie zaobserwowano nagromadzenie reaktywnych form tlenu oraz oksydowanych białek (Valerio-García i wsp., 2017). Po narażeniu na nanocząstki srebra o stężeniu 2 mg/L osobników tilapii nilowej zaobserwowano spadek aktywności dysmutazy ponadtlenkowej oraz katalazy podczas czterdziestodwudniowej ekspozycji, a zmiany te powiązane zostały ze spadkiem ilości glutationu oraz zwiększeniem stężenia produktów peroksydacji lipidów na terenie wątroby (Hamed i Abdel-Tawwab, 2021). Podczas trzydziestopięciodniowej ekspozycji *Labeo rohita* w stężeniach 0,0025 mg/L oraz 0,005 mg/L nanocząstek srebra wskazano obniżenie aktywności peroksydazy glutationowej przy jednoczesnym wzroście aktywności reduktazy glutationowej. Obserwacje te połączone zostały z wykrytymi zmianami histopatologicznymi charakterystycznymi dla nanocząstek srebra (Shobana i wsp., 2018). Badania toksyczności ostrej (96 godzin) prowadzone na tilapii nilowej i innego gatunku *Coptodon zillii* wskazały na obniżenie zawartości zredukowanego glutationu, obniżenie aktywności i ekspresji genów dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy,

reduktazy glutationowej, peroksydazy glutationowej oraz zwiększenie stężenia produktów peroksydacji lipidów w mózgach osobników (Afifi i wsp., 2016).

Na podstawie uzyskanych wyników w trakcie badań oraz biorąc pod uwagę doniesienia literatury światowej wskazać można, że ryby były poddane procesom stresu oksydacyjnego, z różnym natężeniem w zależności od grupy. Główną odpowiedzią na zanieczyszczenie środowiska nanocząstkami srebra podczas długoterminowej ekspozycji było unieczynnienie reaktywnych form tlenu i azotu przy użyciu mechanizmów metabolizmu glutationu. Glutation jest jedną z najważniejszych składowych komórkowych systemów antyoksydacyjnych. W swojej zredukowanej formie glutation zdolny jest do neutralizacji reaktywnych form tlenu i azotu. Organizmy, które wykorzystują glutation do utrzymania homeostazy wykorzystują dwa enzymy: a) peroksydazę glutationową - przenosząc ładunek ujemny z reaktywnych form tlenu i azotu na glutation (utleniając go); oraz b) reduktazy glutationowej zdolnej do syntezy zredukowanego glutationu, ale również do recyklingu już raz utlenionego glutationu z powrotem do formy zredukowanej (Couto i wsp., 2016; Flohé i wsp., 2022). Opisywane i obserwowane zmiany w aktywności oraz ekspresji genów sugerują wystąpienie dwóch dodatkowych zjawisk: a) zaburzenia delikatnej równowagi między syntezą, aktywnością i degradacją białek odpowiadających na stres oksydacyjny, na przykład znane zjawisko wyczerpania mechanizmów ochronnych antyoksydantów, polegające na obniżeniu ich aktywności na skutek długiej ekspozycji (Benedetti i wsp., 2015); oraz b) transkrypcji genów i aktywności enzymatycznej, które zazwyczaj są analizowane w tych samych tkankach i w tym samym czasie, ale można oczekiwać opóźnionych odpowiedzi w czasie. Zjawisko to jest konsekwencją różnych terminów procesów potranskrypcyjnych i syntezy białek. To znaczy krótszy okres półtrwania mRNA, w porównaniu z odpowiadającym mu białkiem może dodatkowo tłumaczyć wciąż zwiększony poziom aktywności enzymatycznej przy pozornie niezmiennych poziomach transkrypcji. Co więcej, stosunkowo niewiele badań wykazało jednoczesne molekularne i biochemiczne odpowiedzi enzymów biotransformacyjnych i antyoksydacyjnych u ryb, porównując ich reaktywność na różne klasy zanieczyszczeń chemicznych (Regoli i wsp., 2011).

5.7. Jony srebra a nanocząstki srebra

W niniejszej pracy dokonano porównania toksycznego wpływu jonów i nanocząstek srebra. Wykazano różnice w charakterze profilu toksyczności, objawiające się wzrostem aktywności peroksydazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej przy jednoczesnym

braku zmian aktywności reduktazy glutationowej. Zaobserwowane zmiany patologiczne wątroby obejmowały występowanie największych odstępstw od prawidłowej budowy hepatocytów w grupie narażonej na srebro w postaci jonowej, ale nie wskazywały one na angażowanie układu immunologicznego w procesie detoksykacji organizmu. Badanie na tilapii mozambijskiej (w stężeniach z zakresu 0,0025 mg/L do 0,1 mg/L) również wskazało na stres oksydacyjny niezależnie od formy użytego srebra, ale jednak na istotnie większy wzrost tych parametrów w grupach jonowych (Sibiya i wsp., 2022). Podczas eksperymentu na danio przegowanym wykazano różnice w wartościach LC50 pomiędzy nanocząstkami srebra oraz jonami srebra, wynoszących odpowiednio 0,084 mg/L i 0,025 mg/L. Przy narażeniu na jony srebra, zaobserwowano ponadto zmiany behawioru tych ryb (odruch ucieczki i niepokój) (Bilberg i wsp., 2012). Ekspozycja ryb gatunku *Prochilodus lineatus* wskazała na brak zależności między formą użytego srebra w najwyższych stężeniach, a poziomem stresu oksydacyjnego oraz parametrami mogącymi sugerować zmiany neurotoksyczne (Mahboub i wsp., 2021). Podczas badania na gatunku *Pimephales promelas* w stężeniach 0,0048 mg/L AgNO₃ oraz 0,0614 mg/L nanocząstek srebra obserwowano jednakowy wpływ obydwu substancji na utrzymanie homeostazy jonów wapnia, potasu i wodoru w organizmie, ale wskazało zróżnicowane oddziaływanie z szlakami neurotoksyczności. Oznacza to, że jony srebra angażowały mniejszą ilość receptorów komórkowych niż nanocząstki srebra (Garcia-Reyero i wsp., 2014). Ze względu na dobrze poznany fakt zdolności sekrecji jonów srebra z powierzchni nanocząstek srebra (Kim i wsp., 2011) oraz podobieństwo zmian niektórych badanych parametrów pomiędzy grupami AgNO₃ 0,001 mg/L, a AgNP 1 mg/L wnioskować można, że w setnym dniu eksperymentu, w grupie o najwyższym stężeniu ksenobiotyku odpowiedź organizmów mogła mieć charakter mieszany. Ryby mogły być jednocześnie poddane stresowi związanemu z ekspozycją na nanocząstki jak i jony uwolnione do środowiska. Ponadto, wyniki badań wpisują się w narrację, że jony srebra są dużo groźniejsze dla organizmów wodnych niż nanocząstki srebra.

5.8. Potencjalne przyczyny nieliniowości toksyczności nanocząstek srebra

Literatura naukowa prezentuje pojedyncze przykłady nieliniowej toksyczności badanego ksenobiotyku na ryby (Forouhar Vajargah i wsp., 2019; Szudrowicz i wsp., 2022; Wu i wsp., 2010). Zarówno bardzo szeroki zakres stężeń (od 0,001 do 100 mg/L) nanocząstek srebra i mnogość powodowanych przez nie skutków, opisane dotychczas w niniejszym rozdziale, jak i modele statystyczne utworzone na dziewięćdziesięciu czterech

testach przeprowadzonych z udziałem bakterii oraz bezkręgowców (Nedyalkova i wsp., 2019) zdają się potwierdzać, że nie samo stężenie, a zestaw innych czynników determinuje wynik testów toksykologicznych.

Źródła tak zmiennych właściwości i toksycznego potencjału nanocząstek srebra poszukuje się głównie w metodach i warunkach ich produkcji oraz w substancjach stabilizujących parametry nanocząstek, używanych w trakcie ich otrzymywania i użytkowania. Na przykład zaobserwowana została zmniejszona tendencja do toksycznego oddziaływania nanocząstek srebra uzyskanych metodami zielonej syntezy na organizmy, względem innych metod produkcji tego materiału (de Souza i wsp., 2019). Używanie czynników stabilizujących (a tym samym pokrywających nanocząstki srebra) zmniejsza ich toksyczność w stosunku do materiałów pozbawionych takich czynników, przy czym pokrywa PVP uznawana jest za dodatek umożliwiający najwyższą stabilność nanomateriału (Restrepo i Villa, 2021). Jednak eksperyment przeprowadzony na danio pręgowanym wskazał, że istotniejszym czynnikiem od pokrywy nanocząstki jest ich kształt i wielkość. Badanie wskazało wyższą toksyczność nanocząstek o wielkości rzędu 20 nm niż 100 nm oraz lepsze parametry zdrowotności dla nanomateriału pokrytego powłoką PVP w stosunku do powłoki z kwasem cytrynowym (Liu i wsp., 2019).

Większość metod oceny toksyczności została zaprojektowana i wystandardyzowana z myślą o toksykologii chemicznej, jednakże nanocząstki wykazują kilka unikalnych właściwości fizykochemicznych, które mogą zakłócać lub stanowić wyzwanie dla klasycznych metod oceny toksyczności (Dhawan i Sharma, 2010). Wśród nanocząstek srebra wyróżnić można kilka takich mechanizmów, czyniących je szczególnie podatnymi na przemiany środowiskowe: a) zdolność do agregacji; b) zmiana stanu utlenienia powierzchni; c) wytrącanie frakcji wtórnych w postaci nanocząstek o nowych właściwościach; d) wytrącanie srebra metalicznego na powierzchniach innych materiałów; oraz e) powinowactwo do łączenia się ze związkami organicznymi i nieorganicznymi. Wskazane czynniki określa się również jako główne determinanty zmiany parametrów nanocząstek oddziałujących z organizmami względem ich pierwotnej formy (Levard i wsp., 2012). Szczególnie istotne w kontekście możliwości wywołania toksycznego wpływu na organizmy wodne są przemiany, które będą prowadziły do: a) zmiany rozmiaru i kształtu nanocząstek, a zwłaszcza ich zmniejszenia; b) zmiany ładunku elektrycznego na ich powierzchni; oraz c) zdolności do sekrecji jonów srebra, zarówno w toni wodnej, jak i w obrębie organizmu (Reidy i wsp., 2013).

Zarówno wyniki uzyskane w eksperymencie, jak i powyższe przesłanki sugerują, że szczególnie istotnym mechanizmem wpływającym na wyniki badań jest przesunięcie stanu równowagi nanocząstek srebra pomiędzy następującymi zjawiskami: a) zwiększoną aglomeracją nanocząstek; b) utrzymaniem się nanocząstek w formie wolnej; c) redukcją nanocząstek do formy jonowej; oraz d) syntezą nanocząstek *de novo* z jonów obecnych w toni wodnej. Biorąc pod uwagę fakty, że: a) wszystkie zbiorniki były utrzymywane w tych samych warunkach fizykochemicznych (Deshmukh i wsp., 2019; Marimuthu i wsp., 2020); b) we wszystkich grupach badanych używano nanocząstek srebra pochodzącego z tego samego zagęszczonego roztworu, a więc nanocząstek o tych samych parametrach; oraz c) uwzględniono porównywalną obsadę oraz identyczny reżim żywienia i czyszczenia zbiorników (Yin i wsp., 2020); wnioskować można, że jedynym parametrem wpływającym na zmianę fazy w układzie dynamicznym nanocząstek jest ich stężenie.

Grupy narażone na nanocząstki o stężeniach 0,001 mg/L oraz 0,01 mg/L wykazywały względnie niskie poziomy parametrów wskazujących na cytotoksyczny wpływ substancji badanej, co potwierdza fakt ekspozycji na nanocząstki srebra w formie pierwotnej. W grupie o stężeniu 1 mg/L, dwubiegunowy charakter ekspozycji przypuszczalnie nastąpił z powodu jednoczesnego zajścia dwóch zjawisk: a) większość nanocząstek srebra uległa aglomeracji, pozostawiając zmniejszone stężenie biodostępnych nanocząstek srebra w toni wodnej; b) zarówno aglomerowane, jak i wolne nanocząstki uwalniały do środowiska wodnego jony srebra. Obserwacje prowadzone na osobnikach z grupy 0,1 mg/L sugerują, że w zbiornikach doświadczalnych nie doszło do aglomeracji nanocząstek, a tym samym obniżenia ich toksyczności, tak jak mogło mieć to miejsce w grupie o stężeniu 1 mg/L. Tak silną reakcję toksyczną nanocząstek srebra o stężeniu 0,1 mg/L można przypisać dwóm mechanizmom: a) tendencji do uwalniania jonów srebra przez wolne nanocząstki srebra (Xuan Li i Lenhart, 2012); b) wytworzeniu materiału o nowych właściwościach na skutek redukcji rozmiarów pierwotnie dodanych nanocząstek srebra lub syntezy nowego materiału *de novo*. Ten drugi proces mógł zostać dodatkowo spotęgowany w układzie pokarmowym, gdzie wykazano, że treść jelitowa jest zdolna do zmniejszenia rozmiarów nanomateriałów przed jego asymilacją (Xiao i wsp., 2020). Obrona w pracy metodologia nie pozwala jednak na pełne potwierdzenie tych hipotez. Próba weryfikacji tych i innych obserwacji (np. nieliniowej toksyczności nanomateriałów) mogłaby stanowić podstawę do interdyscyplinarnych badań naukowych w przyszłości.

6. Stwierdzenia i wnioski

Wyniki analiz laboratoryjnych po studniowej ekspozycji danio pręgowanego (*Danio rerio*) na roztwory nanocząstek srebra, stężeniami nawiązującymi do obserwowanych w środowisku, wskazały na:

- Możliwość wywołania efektów negatywnych u ryb w badanych stężeniach.
- Zmiany parametrów ciała w zależności od użytych stężeń nanocząstek, szczególnie obniżenie wymiarów w grupie AgNP 1 mg/L w setnym dniu eksperymentu.
- Zmiany rozkładu płci dojrzewającej populacji danio pręgowanego, szczególnie widoczne w grupie AgNP 0,001 mg/L w setnym dniu eksperymentu.
- Zmiany patologiczne skutkujące wysoką śmiertelnością w grupie o stężeniu AgNP 0,1 mg/L stwierdzone w dwudziestym szóstym dniu ekspozycji. Zmiany histopatologiczne obejmowały zmiany degeneracyjne jelit i trzustek, oraz w mniejszym stopniu też wątrób.
- Zmiany patologiczne w grupie o stężeniu AgNP 1 mg/L stwierdzone w dwudziestym szóstym dniu ekspozycji. Zmiany histopatologiczne obejmowały zmiany jelit, trzustek oraz wątrób.
- Brak zmian o charakterze silnie patologicznym w setnym dniu ekspozycji, a więc regenerację narządów w grupie AgNP 1 mg/L wraz z czasem trwania eksperymentu.
- Pobudzenie układu immunologicznego wątroby w AgNP 1 mg/L w setnym dniu eksperymentu.
- Odczuwanie stresu oksydacyjnego przez ryby ze wszystkich grupy badanych, ze szczególnym wyróżnieniem grupy AgNP 1mg/L.
- Odpowiedź osobników na stres oksydacyjny z użyciem metabolizmu glutationu.
- Nierówną zmianę ekspresji genów i aktywności białek: dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej, reduktazy glutationowej. Proces ten był spowodowany prawdopodobnie dwoma mechanizmami: wyczerpywania potencjału do regulacji stresu oraz dysproporcji związanej z czasem odpowiedzi na poziomie ekspresji genu i syntezy białka.
- Większą toksyczność jonów srebra względem nanocząstek srebra w odpowiadających stężeniach.
- Nieliniową toksyczność nanocząstek srebra, objawiającą się brakiem zależności zmian analizowanych parametrów, a wzrostem badanego stężenia.

Ponadto, wyniki eksperymentu sugerują możliwość podjęcia następujących kierunków badawczych w przyszłości:

- Podjęcia nowej ścieżki badań, polegającej na usprawnieniu modelowania tak nieprzewidywalnego materiału, jakim są nanocząstki srebra.
- Wyjaśnienia nieliniowego charakteru toksyczności badanych nanocząstek. Główną wskazaną możliwością jest zmiana formy nanocząstek srebra po unoszeniu się w wodzie w warunkach ekspozycji chronicznej.
- Badań nad potencjalnie pozytywnym wpływem nanocząstek srebra, szczególnie widocznym w grupie AgNP 0,01 mg/L, oraz ustalenia zakresu stężeń (granicy, zarówno dolnej, jak i górnej) bezpiecznych do wykorzystania komercyjnego.

7. Bibliografia

1. Abbott, L. (1984). Acid phosphatase. *Clinical Chemistry*, 1079–1083.
2. Afifi, M., Saddick, S., i Abu Zinada, O. A. (2016). Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(6), 754–760. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.06.008>
3. Albrecht, M. A., Evans, C. W., i Raston, C. L. (2006). Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chemistry*, 8(5), 417. <https://doi.org/10.1039/b517131h>
4. Ali, A. T., Paiker, J. E., i Crowther, N. J. (2006). The relationship between anthropometry and serum concentrations of alkaline phosphatase isoenzymes, liver enzymes, albumin, and bilirubin. *American Journal of Clinical Pathology*, 126(3), 437–442. <https://doi.org/10.1309/9N346GXX67B6PX5W>
5. Alkaladi, A., Abdelazim, A., i Afifi, M. (2014). Antidiabetic Activity of Zinc Oxide and Silver Nanoparticles on Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), 2015–2023. <https://doi.org/10.3390/ijms15022015>
6. Amjad, S., Sharma, A. K., i Serajuddin, M. (2018). Toxicity assessment of cypermethrin nanoparticles in *Channa punctatus*: Behavioural response, micronuclei induction and enzyme alteration. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 100, 127–133. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2018.10.004>
7. An, H. J., Sarkheil, M., Park, H. S., Yu, I. J., i Johari, S. A. (2019). Comparative toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) on saltwater microcrustacean, *Artemia salina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology i Pharmacology*, 218, 62–69. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2019.01.002>
8. Baia, L., i Simon, S. (2007). UV-VIS and TEM assessment of morphological features of silver nanoparticles from phosphate glass matrices. *Modern Research and Educational Topics in ...*, 576–583. <http://www.formatex.org/microscopy3/pdf/pp576-583.pdf>
9. Bakand, S., Winder, C., Khalil, C., i Hayes, A. (2005). Toxicity assessment of industrial chemicals and airborne contaminants: Transition from in vivo to in vitro test methods: A review. *Inhalation Toxicology*, 17(13), 775–787. <https://doi.org/10.1080/08958370500225240>
10. Banaee, M. (2020). Alkaline phosphatase activity as a biochemical biomarker in aqua-toxicological studies. *International Journal of Aquatic Biology*, 8(2), 143–147.

<https://doi.org/10.22034/ijab.v8i2.880>

11. Banan, A., Kalbassi, M. R., Bahmani, M., Sotoudeh, E., Johari, S. A., Ali, J. M., i Kolok, A. S. (2020). Salinity modulates biochemical and histopathological changes caused by silver nanoparticles in juvenile Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). *Environmental Science and Pollution Research*, 27(10), 10658–10671. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-07687-7/TABLES/5>
12. Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernández, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-Tellez, M., i Hamilton, P. W. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Scientific Reports 2017 7:1*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17204-5>
13. Banu, A. N., Kudesia, N., Raut, A. M., Pakrudheen, I., i Wahengbam, J. (2021). Toxicity, bioaccumulation, and transformation of silver nanoparticles in aqua biota: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(6), 4275–4296. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01304-w>
14. Barillo, D. J., i Marx, D. E. (2014). Silver in medicine: A brief history BC 335 to present. *Burns*, 40(S1), S3–S8. <https://doi.org/10.1016/J.BURNS.2014.09.009>
15. Barillo, D. J., Pozza, M., i Margaret-Brandt, M. (2014). A literature review of the military uses of silver-nylon dressings with emphasis on wartime operations. *Burns*, 40(S1), S24–S29. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.09.017>
16. Benedetti, M., Giuliani, M. E., i Regoli, F. (2015). Oxidative metabolism of chemical pollutants in marine organisms: molecular and biochemical biomarkers in environmental toxicology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340(1), 8–19. <https://doi.org/10.1111/NYAS.12698>
17. Bilberg, K., Hovgaard, M. B., Besenbacher, F., i Baatrup, E. (2012). In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/293784>
18. Böhmert, L., Girod, M., Hansen, U., Maul, R., Knappe, P., Niemann, B., Weidner, S. M., Thünemann, A. F., i Lampen, A. (2014). Analytically monitored digestion of silver nanoparticles and their toxicity on human intestinal cells. *Nanotoxicology*, 8(6), 631–642. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.815284>
19. Boran, H., i Şaffak, S. (2018). Comparison of Dissolved Nickel and Nickel Nanoparticles Toxicity in Larval Zebrafish in Terms of Gene Expression and DNA Damage. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 74(1), 193–202.

<https://doi.org/10.1007/S00244-017-0468-8/FIGURES/9>

20. Bradford, Y. M., Van Slyke, C. E., Ruzicka, L., Singer, A., Eagle, A., Fashena, D., Howe, D. G., Frazer, K., Martin, R., Paddock, H., Pich, C., Ramachandran, S., i Westerfield, M. (2022). Zebrafish information network, the knowledgebase for *Danio rerio* research. *Genetics*, 220(4). <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAC016>
21. Broeg, K. (2003). Acid phosphatase activity in liver macrophage aggregates as a marker for pollution-induced immunomodulation of the non-specific immune response in fish. *Helgoland Marine Research*, 57(3–4), 166–175. <https://doi.org/10.1007/s10152-003-0154-2>
22. Bucheli, T. D., i Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 25(3), 201–268. <https://doi.org/10.1080/10643389509388479>
23. Bundschuh, M., Filser, J., Lüderwald, S., McKee, M. S., Metreveli, G., Schaumann, G. E., Schulz, R., i Wagner, S. (2018). Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? *Environmental Sciences Europe*, 30(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-018-0132-6>
24. Bury, N. R., Galvez, F., i Wood, C. M. (1999). Effects of chloride, calcium, and dissolved organic carbon on silver toxicity: Comparison between rainbow trout and fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1), 56–62. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1999\)018<0056:EOCCAD>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1999)018<0056:EOCCAD>2.3.CO;2)
25. Čaloudová, H., Čaloudová, J., i Svobodová, Z. (2021). A review of the effects of metallic nanoparticles on fish. *Acta Veterinaria Brno*, 90(3), 331–347. <https://doi.org/10.2754/avb202190030331>
26. Cambier, S., Røgeberg, M., Georgantzopoulou, A., Serchi, T., Karlsson, C., Verhaegen, S., Iversen, T. G., Guignard, C., Kruszewski, M., Hoffmann, L., Audinot, J. N., Ropstad, E., i Gutleb, A. C. (2018). Fate and effects of silver nanoparticles on early life-stage development of zebrafish (*Danio rerio*) in comparison to silver nitrate. *Science of the Total Environment*, 610–611, 972–982. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.115>
27. Chae, Y. J., Pham, C. H., Lee, J., Bae, E., Yi, J., i Gu, M. B. (2009). Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*, 94(4), 320–327. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.07.019>
28. Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., i Lee, S.-S. (2016). Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *Journal of Nanobiotechnology*,

- 14(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0217-6>
29. Chanda, D., Dufefoi, W., Anadu, J., i Minghetti, M. (2021). Evaluation of the effect of silver and silver nanoparticles on the function of selenoproteins using an in-vitro model of the fish intestine: The cell line RTgutGC. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 211, 111930. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.111930>
30. Ciallella, H. L., i Zhu, H. (2019). Advancing Computational Toxicology in the Big Data Era by Artificial Intelligence: Data-Driven and Mechanism-Driven Modeling for Chemical Toxicity. *Chemical Research in Toxicology*, 32(4), 536–547. https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.8B00393/ASSET/IMAGES/MEDIUM/TX-2018-00393B_0004.GIF
31. Clark, T. S., Pandolfo, L. M., Marshall, C. M., Mitra, A. K., i Schech, J. M. (2018). Body Condition Scoring for Adult Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 57(6), 698–702. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-18-000045>
32. Couto, N., Wood, J., i Barber, J. (2016). The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 27–42. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2016.02.028>
33. Cueva, C., Gil-Sánchez, I., Tamargo, A., Miralles, B., Crespo, J., Bartolomé, B., i Moreno-Arribas, M. V. (2019). Gastrointestinal digestion of food-use silver nanoparticles in the dynamic SIMulator of the GastroIntestinal tract (simgi®). Impact on human gut microbiota. *Food and Chemical Toxicology*, 132, 110657. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110657>
34. Das, R. K., i Das, M. (2019). Study of silver nanoparticle/polyvinyl alcohol nanocomposite. *International Journal of Plastics Technology*, 23(1), 101–109. <https://doi.org/10.1007/s12588-019-09229-4>
35. de Souza, J., Alves, T., Rosa Souza, L. R., i Franchi, L. P. (2019). Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 171, 691–700. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.12.095>
36. Degger, N., Tse, A. C. K., i Wu, R. S. S. (2015). Silver nanoparticles disrupt regulation of steroidogenesis in fish ovarian cells. *Aquatic Toxicology*, 169, 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.10.015>
37. Dell'Aglio, M., Gaudiuso, R., ElRashedy, R., De Pascale, O., Palazzo, G., i De Giacomo, A. (2013). Collinear double pulse laser ablation in water for the production

- of silver nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15(48), 20868. <https://doi.org/10.1039/c3cp54194k>
38. Demarchi, C. A., da Silva, L. M., Niedźwiecka, A., Ślawska-Waniewska, A., Lewińska, S., Dal Magro, J., Fossá Calisto, J. F., Martello, R., i Rodrigues, C. A. (2020). Nanoecotoxicology study of the response of magnetic O-Carboxymethylchitosan loaded silver nanoparticles on *Artemia salina*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 74, 103298. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103298>
 39. Depledge, M. H., i Fossi, M. C. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (2). Invertebrates. *Ecotoxicology 1994 3:3*, 3(3), 161–172. <https://doi.org/10.1007/BF00117081>
 40. Deshmukh, S. P., Patil, S. M., Mullani, S. B., i Delekar, S. D. (2019). Silver nanoparticles as an effective disinfectant: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 97, 954–965. <https://doi.org/10.1016/J.MSEC.2018.12.102>
 41. Dewez, D., Goltsev, V., Kalaji, H. M., i Oukarroum, A. (2018). Inhibitory effects of silver nanoparticles on photosystem II performance in *Lemna gibba* probed by chlorophyll fluorescence. *Current Plant Biology*, 16, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2018.11.006>
 42. Dhawan, A., i Sharma, V. (2010). Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 589–605. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3996-x>
 43. Donath, E., i Pastushenko, V. (1979). Electrophoretical study of cell surface properties. The influence of the surface coat on the electric potential distribution and on general electrokinetic properties of animal cells. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 104(C), 543–554. [https://doi.org/10.1016/S0022-0728\(79\)81067-0](https://doi.org/10.1016/S0022-0728(79)81067-0)
 44. Dumont, E., Johnson, A. C., Keller, V. D. J., i Williams, R. J. (2015). Nano silver and nano zinc-oxide in surface waters – Exposure estimation for Europe at high spatial and temporal resolution. *Environmental Pollution*, 196, 341–349. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.10.022>
 45. Elgendy, M. Y., Shaalan, M., Abdelsalam, M., Eissa, A. E., El-Adawy, M. M., i Seida, A. A. (2022). Antibacterial activity of silver nanoparticles against antibiotic-resistant *Aeromonas veronii* infections in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in vitro and in vivo assay. *Aquaculture Research*, 53(3), 901–920. <https://doi.org/10.1111/ARE.15632>
 46. Erickson, R. J., Brooke, L. T., Kahl, M. D., Venter, F. V., Harting, S. L., Markee, T. P.,

- i Spehar, R. L. (1998). Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(4), 572–578. <https://doi.org/10.1002/ETC.5620170407>
47. Evanoff, D. D., i Chumanov, G. (2005). Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays. *ChemPhysChem*, 6(7), 1221–1231. <https://doi.org/10.1002/cphc.200500113>
48. Fabrega, J., Luoma, S. N., Tyler, C. R., Galloway, T. S., i Lead, J. R. (2011). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. In *Environment International* (Vol. 37, Issue 2, pp. 517–531). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.012>
49. Ferdous, Z., i Nemmar, A. (2020). Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 2375, 21(7), 2375. <https://doi.org/10.3390/IJMS21072375>
50. Flohé, L., Toppo, S., i Orrian, L. (2022). The glutathione peroxidase family: Discoveries and mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*, 187, 113–122. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2022.05.003>
51. Forbes, V. E., Calow, P., Grimm, V., Hayashi, T., Jager, T., Palmqvist, A., Pastorok, R., Salvito, D., Sibly, R., Spromberg, J., Stark, J., i Stillman, R. A. (2010). Integrating population modeling into ecological risk assessment. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6(1), 191–193. <https://doi.org/10.1002/ieam.25>
52. Forbes, V. E., Calow, P., i Sibly, R. M. (2008). The extrapolation problem and how population modeling can help. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(10), 1987. <https://doi.org/10.1897/08-029.1>
53. Forouhar Vajargah, M., Imanpoor, M. R., Shabani, A., Hedayati, A., i Faggio, C. (2019). Effect of long-term exposure of silver nanoparticles on growth indices, hematological and biochemical parameters and gonad histology of male goldfish (*Carassius auratus gibelio*). *Microscopy Research and Technique*, 82(7), 1224–1230. <https://doi.org/10.1002/jemt.23271>
54. Garcia-Reyero, N., Kennedy, A. J., Escalon, B. L., Habib, T., Laird, J. G., Rawat, A., Wiseman, S., Hecker, M., Denslow, N., Steevens, J. A., i Perkins, E. J. (2014). Differential effects and potential adverse outcomes of ionic silver and silver nanoparticles in vivo and in vitro. *Environmental Science and Technology*, 48(8), 4546–4555.

https://doi.org/10.1021/ES4042258/SUPPL_FILE/ES4042258_SI_002.XLSX

55. Ghaniem, S., Nassef, E., Zaineldin, A. I., Bakr, A., i Hegazi, S. (2022). A Comparison of the Beneficial Effects of Inorganic, Organic, and Elemental Nano-selenium on Nile Tilapia: Growth, Immunity, Oxidative Status, Gut Morphology, and Immune Gene Expression. *Biological Trace Element Research*, 200(12), 5226–5241. <https://doi.org/10.1007/S12011-021-03075-5/FIGURES/5>
56. Gnanajobitha, G., Paulkumar, K., Vanaja, M., Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Annadurai, G., i Kannan, C. (2013). Fruit-mediated synthesis of silver nanoparticles using *Vitis vinifera* and evaluation of their antimicrobial efficacy. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 3(1), 67. <https://doi.org/10.1186/2193-8865-3-67>
57. Goldberg, D. M. (1984). Glutathione reductase. *Methods of Enzymatic Analysis*, 3, 258–265.
58. Gottschalk, F., Ort, C., Scholz, R. W., i Nowack, B. (2011). Engineered nanomaterials in rivers – Exposure scenarios for Switzerland at high spatial and temporal resolution. *Environmental Pollution*, 159(12), 3439–3445. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2011.08.023>
59. Griffith, M. B. (2017). Toxicological perspective on the osmoregulation and ionoregulation physiology of major ions by freshwater animals: Teleost fish, crustacea, aquatic insects, and Mollusca. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(3), 576–600. <https://doi.org/10.1002/etc.3676>
60. Grosell, M., Nielsen, C., i Bianchini, A. (2002). Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 133(1–2), 287–303. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00085-6](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00085-6)
61. Grün, A. L., Straskraba, S., Schulz, S., Schloter, M., i Emmerling, C. (2018). Long-term effects of environmentally relevant concentrations of silver nanoparticles on microbial biomass, enzyme activity, and functional genes involved in the nitrogen cycle of loamy soil. *Journal of Environmental Sciences*, 69, 12–22. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2018.04.013>
62. Guildford, A. L., Poletti, T., Osbourne, L. H., Cerbo, A. Di, Gatti, A. M., i Santin, M. (2009). Nanoparticles of a different source induce different patterns of activation in key biochemical and cellular components of the host response. *Journal of the Royal Society Interface*, 6(41), 1213–1221. <https://doi.org/10.1098/rsif.2009.0021>
63. Gupta, Y. R., Sellegounder, D., Kannan, M., Deepa, S., Senthilkumaran, B., i

- Basavaraju, Y. (2016). Effect of copper nanoparticles exposure in the physiology of the common carp (*Cyprinus carpio*): Biochemical, histological and proteomic approaches. *Aquaculture and Fisheries*, 1, 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.aaf.2016.09.003>
64. Haider, A., i Kang, I.-K. (2015). Preparation of Silver Nanoparticles and Their Industrial and Biomedical Applications: A Comprehensive Review. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2015, 1–16. <https://doi.org/10.1155/2015/165257>
65. Hamed, H. S., i Abdel-Tawwab, M. (2021). Dietary pomegranate (*Punica granatum*) peel mitigated the adverse effects of silver nanoparticles on the performance, haemato-biochemical, antioxidant, and immune responses of Nile tilapia fingerlings. *Aquaculture*, 540, 736742. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.736742>
66. Hatami, M., Banaee, M., i Nematdoost Haghi, B. (2019). Sub-lethal toxicity of chlorpyrifos alone and in combination with polyethylene glycol to common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 219, 981–988. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.077>
67. Hazlerigg, C. R. E., Tyler, C. R., Lorenzen, K., Wheeler, J. R., i Thorbek, P. (2014). Population relevance of toxicant mediated changes in sex ratio in fish: An assessment using an individual-based zebrafish (*Danio rerio*) model. *Ecological Modelling*, 280, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.12.016>
68. Hogstrand, C., i Wood, C. M. (1998). Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: Implications for water quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(4), 547–561. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170405>
69. Hook, S. E. (2010). Promise and progress in environmental genomics: a status report on the applications of gene expression-based microarray studies in ecologically relevant fish species. *Journal of Fish Biology*, 77(9), 1999–2022. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.2010.02814.X>
70. Hope, B. K. (2006). An examination of ecological risk assessment and management practices. *Environment International*, 32(8), 983–995. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2006.06.005>
71. Huang, H., i Yang, Y. (2008). Preparation of silver nanoparticles in inorganic clay suspensions. *Composites Science and Technology*, 68(14), 2948–2953. <https://doi.org/10.1016/j.compscitech.2007.10.003>
72. Imani, M., Halimi, M., i Khara, H. (2015). Effects of silver nanoparticles (AgNPs) on hematological parameters of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative*

- Clinical Pathology*, 24(3), 491–495. <https://doi.org/10.1007/s00580-014-1927-5>
73. Islam, M. A., Jacob, M. V., i Antunes, E. (2021). A critical review on silver nanoparticles: From synthesis and applications to its mitigation through low-cost adsorption by biochar. *Journal of Environmental Management*, 281, 111918. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111918>
74. Jang, M.-H., Kim, W.-K., Lee, S.-K., Henry, T. B., i Park, J.-W. (2014). Uptake, tissue distribution, and depuration of total silver in common carp (*Cyprinus carpio*) after aqueous exposure to silver nanoparticles. *Environmental Science i Technology*, 48(19), 11568–11574. <https://doi.org/10.1021/es5022813>
75. Johari, S. A., Kalbassi, M. R., Yu, I. J., i Lee, J. H. (2015). Chronic effect of waterborne silver nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): histopathology and bioaccumulation. *Comparative Clinical Pathology*, 24(5), 995–1007. <https://doi.org/10.1007/S00580-014-2019-2/TABLES/5>
76. Kakakhel, M. A., Wu, F., Sajjad, W., Zhang, Q., Khan, I., Ullah, K., i Wang, W. (2021). Long-term exposure to high-concentration silver nanoparticles induced toxicity, fatality, bioaccumulation, and histological alteration in fish (*Cyprinus carpio*). *Environ Sci Eur*, 33, 14. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00453-7>
77. Kannan, R. R., Jerley, A. J. A., Ranjani, M., Prakash, V. S. G., Kannan, R. R., Jerley, A. J. A., Ranjani, M., i Prakash, V. S. G. (2011). Antimicrobial silver nanoparticle induces organ deformities in the developing Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 4(4), 248–254. <https://doi.org/10.4236/JBISE.2011.44034>
78. Kaplan, M. M. (1972). Alkaline Phosphatase. *Gastroenterology*, 62(3), 452–468. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(72\)80154-9](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(72)80154-9)
79. Khan, M. S., Qureshi, N. A., Jabeen, F., Shakeel, M., i Asghar, M. S. (2018). Assessment of waterborne amine-coated silver nanoparticle (Ag-NP)-induced toxicity in labeo rohita by histological and hematological profiles. *Biological Trace Element Research*, 182(1), 130–139. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1080-5>
80. Khan, Z., Al-Thabaiti, S. A., Al-Nowaiser, F. M., Obaid, A. Y., Al-Youbi, A. O., i Malik, M. A. (2012). Kinetics of silver nanoparticle growth in aqueous polymer solutions: 1st Nano Update. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(4), 453–459. <https://doi.org/10.1016/J.ARABJC.2010.12.024>
81. Khosravi-Katuli, K., Shabani, A., Paknejad, H., i Imanpoor, M. R. (2018). Comparative toxicity of silver nanoparticle and ionic silver in juvenile common carp (*Cyprinus*

- carpio*): Accumulation, physiology and histopathology. *Journal of Hazardous Materials*, 359, 373–381. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2018.07.064>
82. Kim, J., Kim, S., i Lee, S. (2011). Differentiation of the toxicities of silver nanoparticles and silver ions to the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and the cladoceran *Daphnia magna*. *Https://Doi.Org/10.3109/17435390.2010.508137*, 5(2), 208–214. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.508137>
83. Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., i Granqvist, C. G. (1999). Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13611. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.24.13611>
84. Kreuter, J. (2007). Nanoparticles—a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2006.10.021>
85. Kumar, N., Krishnani, K. K., i Singh, N. P. (2018). Comparative study of selenium and selenium nanoparticles with reference to acute toxicity, biochemical attributes, and histopathological response in fish. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(9), 8914–8927. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1165-x>
86. Kwok, K. W. H., Auffan, M., Badireddy, A. R., Nelson, C. M., Wiesner, M. R., Chilkoti, A., Liu, J., Marinakos, S. M., i Hinton, D. E. (2012). Uptake of silver nanoparticles and toxicity to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Effect of coating materials. *Aquatic Toxicology*, 120–121, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.04.012>
87. Lacave, J. M., Fanjul, Á., Bilbao, E., Gutierrez, N., Barrio, I., Arostegui, I., Cajaraville, M. P., i Orbea, A. (2017). Acute toxicity, bioaccumulation and effects of dietary transfer of silver from brine shrimp exposed to PVP/PEI-coated silver nanoparticles to zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology i Pharmacology*, 199, 69–80. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2017.03.008>
88. Lacave, J. M., Vicario-Parés, U., Bilbao, E., Gilliland, D., Mura, F., Dini, L., Cajaraville, M. P., i Orbea, A. (2018). Waterborne exposure of adult zebrafish to silver nanoparticles and to ionic silver results in differential silver accumulation and effects at cellular and molecular levels. *Science of The Total Environment*, 642, 1209–1220. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.06.128>
89. Lakshmanan, V. I., Roy, R., Ojaghi, A., i Gorain, B. (2019). The Future of Gold and Silver Industry. In *Innovations and Breakthroughs in the Gold and Silver Industries* (pp. 243–264). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030->

90. Lee, S., i Jun, B.-H. (2019). Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 865. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>
91. Lem, W. K., Choudhury, A., A. Lakhani, A., Kuyate, P., R. Haw, J., S. Lee, D., Iqbal, Z., i J. Brumlik, C. (2012). Use of Nanosilver in Consumer Products. *Recent Patents on Nanotechnology*, 6(1), 60–72. <https://doi.org/10.2174/187221012798109318>
92. León-Silva, S., Fernández-Luqueño, F., i López-Valdez, F. (2016). Silver Nanoparticles (AgNP) in the Environment: a Review of Potential Risks on Human and Environmental Health. *Water, Air, i Soil Pollution*, 227(9), 306. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3022-9>
93. Levard, C., Hotze, E. M., Lowry, G. V., i Brown, G. E. (2012). Environmental Transformations of Silver Nanoparticles: Impact on Stability and Toxicity. *Environmental Science i Technology*, 46(13), 6900–6914. <https://doi.org/10.1021/es2037405>
94. Li, Xiaomei, Schirmer, K., Bernard, L., Sigg, L., Pillai, S., i Behra, R. (2015). Silver nanoparticle toxicity and association with the alga *Euglena gracilis*. *Environmental Science: Nano*, 2(6), 594–602. <https://doi.org/10.1039/C5EN00093A>
95. Li, Xuan, i Lenhart, J. J. (2012). Aggregation and Dissolution of Silver Nanoparticles in Natural Surface Water. *Environmental Science i Technology*, 46(10), 5378–5386. <https://doi.org/10.1021/es204531y>
96. Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C., i Sridhar, R. (2014). Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, 32(4), 711–726. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.006>
97. Lionetto, M. G., Caricato, R., i Giordano, M. E. (2019). Pollution Biomarkers in Environmental and Human Biomonitoring. *The Open Biomarkers Journal*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.2174/1875318301909010001>
98. Liu, H., Wang, X., Wu, Y., Hou, J., Zhang, S., Zhou, N., i Wang, X. (2019). Toxicity responses of different organs of zebrafish (*Danio rerio*) to silver nanoparticles with different particle sizes and surface coatings. *Environmental Pollution*, 246, 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.034>
99. López-Barrera, E. A., Grötzner, S. R., Esquivel, L., Voigt, C. L., Campos, S. X., i Oliveira Ribeiro, C. A. (2021). Histopathological effects of silver nanoparticles in *Rhamdia quelen* after oral exposure. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*,

- 16(1), 83–89. <https://doi.org/10.5132/eec.2021.01.11>
100. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., i Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
101. Lu, C., Lv, Y., Kou, G., Liu, Y., Liu, Y., Chen, Y., Wu, X., Yang, F., Luo, J., i Yang, X. (2022). Silver nanoparticles induce developmental toxicity via oxidative stress and mitochondrial dysfunction in zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 243, 113993. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113993>
102. Mahboub, H. H., Khedr, M. H. E., Elshopakey, G. E., Shakweer, M. S., Mohamed, D. I., Ismail, T. A., Ismail, S. H., i Abdel Rahman, A. N. (2021). Impact of silver nanoparticles exposure on neuro-behavior, hematology, and oxidative stress biomarkers of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture*, 544, 737082. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2021.737082>
103. Mansour, W. A. A., Abdelsalam, N. R., Tanekhy, M., Khaled, A. A., i Mansour, A. T. (2021). Toxicity, inflammatory and antioxidant genes expression, and physiological changes of green synthesis silver nanoparticles on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology i Pharmacology*, 247, 109068. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2021.109068>
104. Marimuthu, S., Antonisamy, A. J., Malayandi, S., Rajendran, K., Tsai, P. C., Pugazhendhi, A., i Ponnusamy, V. K. (2020). Silver nanoparticles in dye effluent treatment: A review on synthesis, treatment methods, mechanisms, photocatalytic degradation, toxic effects and mitigation of toxicity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 205, 111823. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2020.111823>
105. Marinsek, G. P., Choueri, P. K. G., Choueri, R. B., de Souza Abessa, D. M., Gonçalves, A. R. N., Bortolotto, L. B., i de Britto Mari, R. (2022). Integrated analysis of fish intestine biomarkers: Complementary tools for pollution assessment. *Marine Pollution Bulletin*, 178, 113590. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113590>
106. McCarthy, J. F., i Shugart, L. R. (2018). Biomarkers of Environmental Contamination. In *Biomarkers of Environmental Contamination*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781351070263>
107. McClain, J. S., Oris, J. T., Burton, G. A., i Lattier, D. (2003). Laboratory and field validation of multiple molecular biomarkers of contaminant exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(2), 361–370.

<https://doi.org/10.1002/ETC.5620220217>

108. McGeer, J., Henningsen, G., Lanno, R., Fisher, N., Sappington, K., i Drexler, J. (2004). Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals. *US Environmental Protection Agency Risk Assessment Forum (Vol. 1200)*, 122.
109. McGillicuddy, E., Murray, I., Kavanagh, S., Morrison, L., Fogarty, A., Cormican, M., Dockery, P., Prendergast, M., Rowan, N., i Morris, D. (2017). Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of the Total Environment*, 575, 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>
110. McNeil, P. L., Boyle, D., Henry, T. B., Handy, R. D., i Sloman, K. A. (2014). Effects of metal nanoparticles on the lateral line system and behaviour in early life stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 152, 318–323. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.04.022>
111. McTeer, J., Dean, A. P., White, K. N., i Pittman, J. K. (2014). Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability. *Nanotoxicology*, 8(3), 305–316. <https://doi.org/10.3109/17435390.2013.778346>
112. Mehri, A. (2020). Trace Elements in Human Nutrition (II) - An Update. *International Journal of Preventive Medicine*, 11(Ii), 2. https://doi.org/10.4103/ijpvm.IJPVM_48_19
113. Melaiye, A., i Youngs, W. J. (2005). Silver and its application as an antimicrobial agent. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 15(2), 125–130. <https://doi.org/10.1517/13543776.15.2.125>
114. Minghetti, M., i Schirmer, K. (2016). Effect of media composition on bioavailability and toxicity of silver and silver nanoparticles in fish intestinal cells (RTgutGC). <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/17435390.2016.1241908>, 10(10), 1526–1534. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1241908>
115. Mohamed, F. (2009). Histopathological Studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qarun, Egypt. *January 2009*, 2013–2015.
116. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., i Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059>
117. Mota, D. R., Lima, G. A. S., Helene, G. B., i Pellosi, D. S. (2020). Tailoring Nanoparticle Morphology to Match Application: Growth under Low-Intensity Polychromatic Light Irradiation Governs the Morphology and Optical Properties of

- Silver Nanoparticles. *ACS Applied Nano Materials*, 3(5), 4893–4903. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c01078>
118. Mota, L., i Dinis-Oliveira, R. J. (2021). Clinical and Forensic Aspects of the Different Subtypes of Argyria. *Journal of Clinical Medicine* 2021, Vol. 10, Page 2086, 10(10), 2086. <https://doi.org/10.3390/JCM10102086>
119. Moustafa, E. M., Khalil, R. H., Saad, T. T., Amer, M. T., Shukry, M., Farrag, F., Elsayy, A. A., Lolo, E. E., Sakran, M. I., i Hamouda, A. H. (2021). Silver nanoparticles as an antibacterial agent in *Oreochromis niloticus* and *Sparus auratus* fish. *Aquaculture Research*, 52(12), 6218–6234. <https://doi.org/10.1111/ARE.15484>
120. Mukhopadhyay, I., Nazir, A., Saxena, D. K., i Kar Chowdhuri, D. (2003). Heat shock response: hsp70 in environmental monitoring. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17(5), 249–254. <https://doi.org/10.1002/JBT.10086>
121. Murali, M., Suganthi, P., Athif, P., Sadiq Bukhari, A., Syed Mohamed, H. E., Basu, H., i Singhal, R. K. (2017). Histological alterations in the hepatic tissues of Al₂O₃ nanoparticles exposed freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 44, 125–131. <https://doi.org/10.1016/J.JTEMB.2017.07.001>
122. Naguib, M., Mahmoud, U. M., Mekkawy, I. A., i Sayed, A. E. D. H. (2020). Hepatotoxic effects of silver nanoparticles on *Clarias gariepinus*; Biochemical, histopathological, and histochemical studies. *Toxicology Reports*, 7, 133–141. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2020.01.002>
123. Nakamura, H., Sezawa, K., Hata, M., Ohsaki, S., i Watano, S. (2019). Direct translocation of nanoparticles across a model cell membrane by nanoparticle-induced local enhancement of membrane potential. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 21(35), 18830–18838. <https://doi.org/10.1039/C9CP02935D>
124. Natsuki, J. (2015). A Review of Silver Nanoparticles: Synthesis Methods, Properties and Applications. *International Journal of Materials Science and Applications*, 4(5), 325. <https://doi.org/10.11648/j.ijmsa.20150405.17>
125. Nayak, R. R., Pradhan, N., Behera, D., Pradhan, K. M., Mishra, S., Sukla, L. B., i Mishra, B. K. (2011). Green synthesis of silver nanoparticle by *Penicillium purpurogenum* NPMF: The process and optimization. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3129–3137. <https://doi.org/10.1007/S11051-010-0208-8/FIGURES/8>
126. Nazdar, N., Imani, A., Noori, F., i Sarvi Moghanlou, K. (2018). Effect of Silymarin Supplementation on Nickel Oxide Nanoparticle Toxicity to Rainbow Trout

- (*Oncorhynchus mykiss*) Fingerlings: Pancreas Tissue Histopathology and Alkaline Protease Activity. *Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science*, 42(2), 353–361. <https://doi.org/10.1007/s40995-016-0052-5>
127. Nedyalkova, M., Dimitrov, D., Donkova, B., i Simeonov, V. (2019). Chemometric Evaluation of the Link between Acute Toxicity, Health Issues and Physicochemical Properties of Silver Nanoparticles. *Symmetry 2019, Vol. 11, Page 1159, 11(9)*, 1159. <https://doi.org/10.3390/SYM11091159>
128. Oberdörster, E. (2004). Manufactured nanomaterials (fullerenes, C60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1058–1062. <https://doi.org/10.1289/EHP.7021>
129. Ostaszewska, T., Śliwiński, J., Kamaszewski, M., Sysa, P., i Chojnacki, M. (2018). Cytotoxicity of silver and copper nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(1), 908–915. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0494-0>
130. Ottoni, C. A., Lima Neto, M. C., Léo, P., Ortolan, B. D., Barbieri, E., i De Souza, A. O. (2020). Environmental impact of biogenic silver nanoparticles in soil and aquatic organisms. *Chemosphere*, 239, 124698. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124698>
131. Paglia, D. E., i Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 70(1), 158–169. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:0022214367900765>
132. Panjang-Berat, H., Faktor, D., Populasi, K., Di, I., Temengor, E., Kesehatan, P., Sekitar, A., Muzzalifah,), Hamid, A., Mansor, M., Azizah, S., i Nor, M. (2015). Length-weight Relationship and Condition Factor of Fish Populations in Temengor Reservoir: Indication of Environmental Health. *Sains Malaysiana*, 44(1), 61–66.
133. Pecora, R. (2000). Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research*, 2(2), 123–131. <https://doi.org/10.1023/A:1010067107182>
134. Perry, S. F., Furimsky, M., Bayaa, M., Georgalis, T., Shahsavarani, A., Nickerson, J. G., i Moon, T. W. (2003). Integrated responses of Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters and V-type H⁺-ATPases in the fish gill and kidney during respiratory acidosis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1618(2), 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.09.015>

135. Pham, C. H., Yi, J., i Gu, M. B. (2012). Biomarker gene response in male Medaka (*Oryzias latipes*) chronically exposed to silver nanoparticle. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 239–245. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.034>
136. Pugazhenthiran, N., Anandan, S., Kathiravan, G., Udaya Prakash, N. K., Crawford, S., i Ashokkumar, M. (2009). Microbial synthesis of silver nanoparticles by *Bacillus* sp. *Journal of Nanoparticle Research*, 11(7), 1811–1815. <https://doi.org/10.1007/s11051-009-9621-2>
137. Pulit-Prociak, J., i Banach, M. (2016). Silver nanoparticles - A material of the future...? *Open Chemistry*, 14(1), 76–91. https://doi.org/10.1515/CHEM-2016-0005/ASSET/GRAPHIC/J_CHEM-2016-0005_FIG_004.JPG
138. Pulit, J., Banach, M., i Kowalski, Z. (2011). Nanosilver- making difficult decisions. *Ecological Chemistry and Engineering*, 18(2), 185–195.
139. Qian, C., Sun, Z., Fan, J., Ren, Y., Sun, B., Feng, Q., Yang, D., i Wang, Z. (2020). Characterization and reconstruction for stochastically distributed void morphology in nano-silver sintered joints. *Materials i Design*, 196, 109079. <https://doi.org/10.1016/J.MATDES.2020.109079>
140. Qiang, L., Arabeyyat, Z. H., Xin, Q., Paunov, V. N., Dale, I. J. F., Lloyd Mills, R. I., Rotchell, J. M., i Cheng, J. (2020). Silver Nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos: Uptake, Growth and Molecular Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1876. <https://doi.org/10.3390/ijms21051876>
141. Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M. S., i Tahir, M. B. (2017). A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7), 1272–1291. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792>
142. Rai, M., Yadav, A., i Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2008.09.002>
143. Rajkumar, K. S., Kanipandian, N., i Thirumurugan, R. (2016). Toxicity assessment on haematology, biochemical and histopathological alterations of silver nanoparticles-exposed freshwater fish *Labeo rohita*. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 6(1), 19–29. <https://doi.org/10.1007/S13204-015-0417-7/FIGURES/9>
144. Rana, S. V. S. (2014). Perspectives in Endocrine Toxicity of Heavy Metals—A Review. *Biological Trace Element Research*, 160(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0023-7>

145. Ranjan, S., Dasgupta, N., Singh, S., i Gandhi, M. (2019). Toxicity and regulations of food nanomaterials. *Environmental Chemistry Letters*, 17(2), 929–944. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-00851-z>
146. Ratte, H. T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1), 89. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1999\)018<0089:BATOSC>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1999)018<0089:BATOSC>2.3.CO;2)
147. Ravindran, A., Chandran, P., i Khan, S. S. (2013). Biofunctionalized silver nanoparticles: Advances and prospects. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 105, 342–352. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.036>
148. Regoli, F., Giuliani, M. E., Benedetti, M., i Arukwe, A. (2011). Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquatic Toxicology*, 105(3–4), 56–66. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2011.06.014>
149. Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K., i Lynch, I. (2013). Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials*, 6(6), 2295–2350. <https://doi.org/10.3390/ma6062295>
150. Restrepo, C. V., i Villa, C. C. (2021). Synthesis of silver nanoparticles, influence of capping agents, and dependence on size and shape: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring i Management*, 15(December 2020), 100428. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100428>
151. Roy, P., i Nath, D. (2022). Toxic effects of metal nanoparticles on fish models: A review. *Uttar Pradesh Journal of Zoology*, December, 25–36. <https://doi.org/10.56557/upjz/2022/v43i233247>
152. Roy, S., Shankar, S., i Rhim, J.-W. (2019). Melanin-mediated synthesis of silver nanoparticle and its use for the preparation of carrageenan-based antibacterial films. *Food Hydrocolloids*, 88, 237–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.013>
153. Salamat, N., i Zarie, M. (2012). Using of Fish Pathological Alterations to Assess Aquatic Pollution: A Review. *World Journal of Fish and Marine Sciences*, 4(3), 223–231.
154. Samim, A. R., Arshad, M., i Vaseem, H. (2022). An insight into various biomarkers to study toxicological impact of nanoparticles in fishes: explored and missing information. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s13762-022-04488-y>

155. Schloesser, R. W., i Fabrizio, M. C. (2017). Condition Indices as Surrogates of Energy Density and Lipid Content in Juveniles of Three Fish Species. *Transactions of the American Fisheries Society*, *146*(5), 1058–1069. <https://doi.org/10.1080/00028487.2017.1324523>
156. Schrader, M., i Fahimi, H. D. (2006). Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1763*(12), 1755–1766. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2006.09.006>
157. Sekine, R., Moore, K. L., Matzke, M., Vallotton, P., Jiang, H., Hughes, G. M., Kirby, J. K., Donner, E., Grovenor, C. R. M., Svendsen, C., i Lombi, E. (2017). Complementary Imaging of Silver Nanoparticle Interactions with Green Algae: Dark-Field Microscopy, Electron Microscopy, and Nanoscale Secondary Ion Mass Spectrometry. *ACS Nano*, *11*(11), 10894–10902. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b04556>
158. Seyedi, J., Tayemeh, M. B., Esmailbeigi, M., Joo, H. S., Langeroudi, E. K., Banan, A., Johari, S. A., i Jami, M. J. (2021). Fatty acid alteration in liver, brain, muscle, and oocyte of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to silver nanoparticles and mitigating influence of quercetin-supplemented diet. *Environmental Research*, *194*, 110611. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.110611>
159. Sharma, S., Jain, S., i Tripathi, G. (2019). Effects of silver nanoparticle toxicity on histoarchitecture and acid and alkaline phosphatase activities in a freshwater fish. *Biochemical and Cellular Archives*, *19*(1), 13–18.
160. Shaw, B. J., Al-Bairuty, G., i Handy, R. D. (2012). Effects of waterborne copper nanoparticles and copper sulphate on rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Physiology and accumulation. *Aquatic Toxicology*, *116–117*, 90–101. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2012.02.032>
161. Shenashen, M. A., El-Safty, S. A., Elshehy M A Shenashen, E. A., El-Safty, S. A., i Elshehy, E. A. (2013). *Synthesis, Morphological Control, and Properties of Silver Nanoparticles in Potential Applications*. <https://doi.org/10.1002/ppsc.201300181>
162. Shobana, C., Rangasamy, B., Poopal, R. K., Renuka, S., i Ramesh, M. (2018). Green synthesis of silver nanoparticles using Piper nigrum: tissue-specific bioaccumulation, histopathology, and oxidative stress responses in Indian major carp Labeo rohita. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(12), 11812–11832. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1454-z>
163. Sibiya, A., Gopi, N., Jeyavani, J., Mahboob, S., Al-Ghanim, K. A., Sultana, S.,

- Mustafa, A., Govindarajan, M., i Vaseeharan, B. (2022). Comparative toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate in freshwater fish *Oreochromis mossambicus*: A multi-biomarker approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology i Pharmacology*, 259, 109391. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2022.109391>
164. Silver, S., Phung, L. T., i Silver, G. (2006). Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33(7), 627–634. <https://doi.org/10.1007/S10295-006-0139-7>
165. Slawson, R. M., Trevors, J. T., i Lee, H. (1992). Silver accumulation and resistance in *Pseudomonas stutzeri*. *Archives of Microbiology* 1992 158:6, 158(6), 398–404. <https://doi.org/10.1007/BF00276299>
166. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., i Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. <https://doi.org/10.1111/J.1469-185X.2007.00030.X>
167. Syafiuddin, A., Salmiati, S., Hadibarata, T., Kueh, A. B. H., Salim, M. R., i Zaini, M. A. A. (2018). Silver Nanoparticles in the Water Environment in Malaysia: Inspection, characterization, removal, modeling, and future perspective. *Scientific Reports*, 8(1), 986. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19375-1>
168. Szudrowicz, H., Kamaszewski, M., Adamski, A., Skrobisz, M., Frankowska-Łukawska, J., Wójcik, M., Bochenek, J., Kawalski, K., Martynow, J., Bujarski, P., Pruchniak, P., Latoszek, E., Bury-Burzymiski, P., Szczepański, A., Jaworski, S., Matuszewski, A., i Herman, A. P. (2022). The Effects of Seven-Day Exposure to Silver Nanoparticles on Fertility and Homeostasis of Zebrafish (*Danio rerio*). *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 11239, 23(19), 11239. <https://doi.org/10.3390/IJMS231911239>
169. Szyrkowska, M. I., Pawlaczyk, A., i Maćkiewicz, E. (2017). Bioaccumulation and Biomagnification of Trace Elements in the Environment. *Recent Advances in Trace Elements*, 251–276. <https://doi.org/10.1002/9781119133780.ch13>
170. Tokatli, C., Çiçek, A., Köse, E., i Emiroğlu, Ö. (2013). Uptake of silver from large silver deposits on biotic and abiotic components of the closest lotic system: Felent stream, Turkey. *Pakistan Journal of Zoology*, 45(3), 701–707.
171. Tsang, B., Zahid, H., Ansari, R., Lee, R. C.-Y., Partap, A., i Gerlai, R. (2017). Breeding Zebrafish: A Review of Different Methods and a Discussion on Standardization. *Zebrafish*, 14(6), 561–573. <https://doi.org/10.1089/zeb.2017.1477>

172. Tsuji, T., Iryo, K., Watanabe, N., i Tsuji, M. (2002). Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution: influence of laser wavelength on particle size. *Applied Surface Science*, 202(1–2), 80–85. [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(02\)00936-4](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(02)00936-4)
173. Turner, A., Brice, D., i Brown, M. T. (2012). Interactions of silver nanoparticles with the marine macroalga, *Ulva lactuca*. *Ecotoxicology*, 21(1), 148–154. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0774-2>
174. Valerio-García, R. C., Carbajal-Hernández, A. L., Martínez-Ruíz, E. B., Jarquín-Díaz, V. H., Haro-Pérez, C., i Martínez-Jerónimo, F. (2017). Exposure to silver nanoparticles produces oxidative stress and affects macromolecular and metabolic biomarkers in the goodeid fish *Chapalichthys pardalis*. *Science of The Total Environment*, 583, 308–318. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.070>
175. Vali, S., Mohammadi, G., Tavabe, K. R., Moghadas, F., i Naserabad, S. S. (2020). The effects of silver nanoparticles (Ag-NPs) sublethal concentrations on common carp (*Cyprinus carpio*): Bioaccumulation, hematology, serum biochemistry and immunology, antioxidant enzymes, and skin mucosal responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194(December 2019), 110353. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110353>
176. van der Oost, R., Beyer, J., i Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
177. Van Leeuwen, C. J., Verhaar, H. J. M., i Hermens, J. L. M. (1996). Quality criteria and risk assessment for mixtures of chemicals in the aquatic environment. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 2(3), 419–425. <https://doi.org/10.1080/10807039609383623>
178. Vega-Baudrit, J., Gamboa, S. M., Rojas, E. R., i Martinez, V. V. (2019). Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their application as an antibacterial agent. *International Journal of Biosensors i Bioelectronics, Volume 5*(Issue 5). <https://doi.org/10.15406/IJBSBE.2019.05.00172>
179. Verma, P., i Maheshwari, S. K. (2019). Applications of Silver nanoparticles in diverse sectors. *Int. J. Nano Dimens*, 10(1), 18–36.
180. Verma, S. K., Nandi, A., Sinha, A., Patel, P., Jha, E., Mohanty, S., Panda, P. K., Ahuja, R., Mishra, Y. K., i Suar, M. (2021). Zebrafish (*Danio rerio*) as an ecotoxicological model for Nanomaterial induced toxicity profiling. *Precision*

- Nanomedicine*, 4(1). <https://doi.org/10.33218/001c.21978>
181. Wang, P., Ng, Q. X., Zhang, H., Zhang, B., Ong, C. N., i He, Y. (2018). Metabolite changes behind faster growth and less reproduction of *Daphnia similis* exposed to low-dose silver nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.080>
182. Webb, N. A., i Wood, C. M. (2000). Bioaccumulation and distribution of silver in four marine teleosts and two marine elasmobranchs: Influence of exposure duration, concentration, and salinity. *Aquatic Toxicology*, 49(1–2), 111–129. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00063-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00063-6)
183. Wood, C. M., Playle, R. C., i Hogstrand, C. (1999). Physiology and modeling of mechanisms of silver uptake and toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(1), 71–83. [https://doi.org/10.1897/1551-5028\(1999\)018<0071:PAMOMO>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1897/1551-5028(1999)018<0071:PAMOMO>2.3.CO;2)
184. Wooliams, J. A., Wiener, G., Anderson, P. H., i McMurray, C. H. (1983). Variation in the activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood in various breed crosses of sheep. *Research in Veterinary Science*, 34(3), 253–256. [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32219-7](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32219-7)
185. Wu, Y., Zhou, Q., Li, H., Liu, W., Wang, T., i Jiang, G. (2010). Effects of silver nanoparticles on the development and histopathology biomarkers of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) using the partial-life test. *Aquatic Toxicology*, 100(2), 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.11.014>
186. Xiao, B., Wang, X., Yang, J., Wang, K., Zhang, Y., Sun, B., Zhang, T., i Zhu, L. (2020). Bioaccumulation kinetics and tissue distribution of silver nanoparticles in zebrafish: The mechanisms and influence of natural organic matter. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194(December 2019), 110454. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110454>
187. Yancheva, V. (2016). Histological Biomarkers in fish as a tool in ecological risk assessment and monitoring programs: A review. *Applied Ecology and Environmental Research*, 14(1), 47–75. https://doi.org/10.15666/aeer/1401_047075
188. Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., i Chu, C. H. (2020). The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, 2555–2562. <https://doi.org/10.2147/IJN.S246764>
189. Yin, Y., Yu, S., Yang, X., Liu, J., i Jiang, G. (2015). Source and pathway of silver

- nanoparticles to the environment. *Silver Nanoparticles in the Environment*, 43–72. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46070-2_3/FIGURES/9
190. Yoo-iam, M., Chaichana, R., i Satapanajaru, T. (2014). Toxicity, bioaccumulation and biomagnification of silver nanoparticles in green algae (*Chlorella sp.*), water flea (*Moina macrocopa*), blood worm (*Chironomus spp.*) and silver barb (*Barbonymus gonionotus*). *Chemical Speciation i Bioavailability*, 26(4), 257–265. <https://doi.org/10.3184/095422914X14144332205573>
191. Younas, W., Khan, F. U., Zaman, M., Lin, D., Zuberi, A., i Wang, Y. (2022). Toxicity of synthesized silver nanoparticles in a widespread fish: A comparison between green and chemical. *Science of The Total Environment*, 845, 157366. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.157366>
192. Zeumer, R., Hermsen, L., Kaegi, R., Kühr, S., Knopf, B., i Schleichriem, C. (2020). Bioavailability of silver from wastewater and planktonic food borne silver nanoparticles in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Science of The Total Environment*, 706, 135695. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135695>
193. Zhang, Y., Yang, M., Portney, N. G., Cui, D., Budak, G., Ozbay, E., Ozkan, M., i Ozkan, C. S. (2008). Zeta potential: A surface electrical characteristic to probe the interaction of nanoparticles with normal and cancer human breast epithelial cells. *Biomedical Microdevices*, 10(2), 321–328. <https://doi.org/10.1007/S10544-007-9139-2/FIGURES/6>
194. Zhu, J., Liao, X., i Chen, H.-Y. (2001). Electrochemical preparation of silver dendrites in the presence of DNA. *Materials Research Bulletin*, 36(9), 1687–1692. [https://doi.org/10.1016/S0025-5408\(01\)00600-6](https://doi.org/10.1016/S0025-5408(01)00600-6)

Wyrażam zgodę na udostępnianie mojej pracy w czytelniach Biblioteki SGGW.

.....

(czytelny podpis autora)