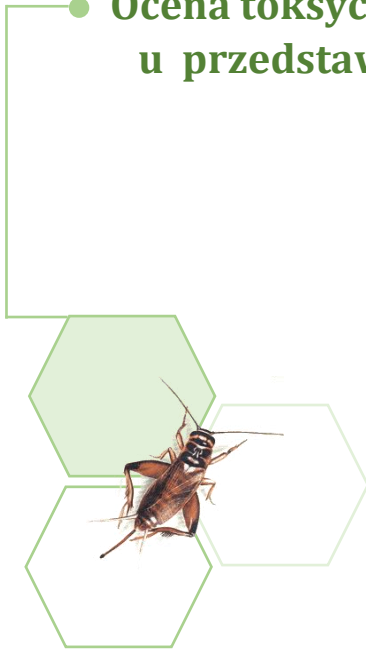


**UNIwersytet Śląski w Katowicach**

**Wydział Biologii i Ochrony Środowiska**

*mgr Marta Dziewięcka*

- **Ocena toksyczności *in vivo* tlenku grafenu (GO) u przedstawiciela bezkręgowców z gatunku *Acheta domesticus***



*Rozprawa na stopień doktora wykonana  
w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii  
pod kierunkiem  
dr. hab. Marii Augustyniak, prof. UŚ*

**KATOWICE 2017**



*Serdecznie dziękuję mojej Promotor  
Profesor UŚ Marii Augustyniak  
za cierpliwość i poświęcony czas na interesujące dyskusje,  
które zaszczepiły we mnie pasję do nauki oraz  
motywowały do ciągłego pogłębiania wiedzy*



*Podziękowania składam również*

*Pani dr. hab. Magdalenie Rost-Roszkowskiej, prof. UŚ  
z Katedry Histologii i Embriologii Zwierząt UŚ  
za wykonanie profili histologicznych tkanek  
oraz pomoc w interpretacji wyników*

*Pani dr. hab. Marii Augustyniak-Jabłokow  
z Instytutu Fizyki Molekularnej PAN w Poznaniu  
oraz*

*Pracownikom i Doktorantom  
ze Śląskiego Międzyuczelnianego Centrum  
Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych w Chorzowie  
za wykonane analizy fizykochemiczne tlenku grafenu  
oraz cenne uwagi merytoryczne*

*Dziękuję wszystkim  
Koleżankom i Kolegom  
z Katedry Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii  
za pomoc, wsparcie i miłą atmosferę pracy*



**Spis treści**

<b>I. WSTĘP</b> .....	<b>6</b>
1. Wprowadzenie .....	6
2. Jak to się wszystko zaczęło? Czyli od grafitu do grafenu.....	7
3. Charakterystyka materiałów z rodziny grafenu .....	8
3.1. Grafen.....	9
3.2. Grafit.....	10
3.3. Nanorurki węglowe .....	11
3.4. Fulereny .....	12
3.5. Diament .....	13
4. Metody modyfikacji nanozwiązków .....	14
4.1. Funkcjonalizacja powierzchni grafenu .....	15
4.1.1. Funkcjonalizacja niekowalencyjna .....	16
4.1.2. Funkcjonalizacja kowalencyjna.....	16
4.1.2.1. Otrzymywanie tlenku grafenu.....	17
4.1.2.2. Właściwości fizykochemiczne tlenku grafenu .....	18
5. Perspektywy zastosowania tlenku grafenu.....	19
6. Metody charakterystyki grafenu i jego pochodnych.....	23
7. Nanotoksykologia .....	24
7.1. Mechanizmy potencjalnej toksyczności GO - wiodące koncepcje.....	25
8. Koncepcja nasilonego stresu oksydacyjnego. Mechanizmy obrony antyoksydacyjnej.....	28
8.1. Uniwersalne markery stresu oksydacyjnego.....	30
8.2. Uszkodzenia DNA .....	31
8.2.1. Mechanizm genotoksyczności pierwotnej .....	32
8.2.2. Mechanizm genotoksyczności wtórnej .....	33
8.2.3. Metody oceny i identyfikacji uszkodzeń DNA.....	34



9.	Modele badań toksykologicznych - badania <i>in vitro</i> oraz <i>in vivo</i> .....	34
9.1.	Ocena skutków toksyczności GO na różnych poziomach organizacji biologicznej .....	36
10.	<i>Acheta domesticus</i> w badaniach toksykologicznych.....	39
<b>II.</b>	<b>CELE BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE .....</b>	<b>40</b>
11.	Uzasadnienie tematu badań oraz cele badawcze .....	41
11.1.	Hipotezy badawcze .....	43
<b>III.</b>	<b>CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....</b>	<b>46</b>
<b>12.</b>	<b>MODEL I: Ocena wybranych wskaźników odpowiedzi antyoksydacyjnej u <i>Acheta domesticus</i> wskutek krótkoterminowego narażenia na tlenek grafenu podany iniekcyjnie .....</b>	<b>46</b>
12.1.	Hodowla <i>Acheta domesticus</i> .....	46
12.2.	Otrzymywanie i charakterystyka fizykochemiczna tlenku grafenu .....	46
12.3.	Przebieg eksperymentu .....	48
12.4.	Przygotowanie próbek biologicznych do analizy biochemicznej .....	50
12.5.	Wskaźniki stresu oksydacyjnego.....	51
12.5.1.	Pomiar stężenia białka.....	51
12.5.2.	Katalaza .....	51
12.5.3.	Peroksydaza glutationowa .....	52
12.5.4.	Całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC).....	52
12.5.5.	Poziom białek szoku cieplnego HSP 70.....	52
12.6.	Opracowanie statystyczne wyników .....	53
<b>13.</b>	<b>MODEL II: Określenie stopnia nasilenia stresu oksydacyjnego, uszkodzeń komórkowych oraz zmian histologicznych u <i>A. domesticus</i> wskutek krótkoterminowego narażenia na obecność tlenku grafenu (GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>) w pokarmie.....</b>	<b>54</b>
13.1.	Hodowla <i>Acheta domesticus</i> .....	54
13.2.	Otrzymywanie i charakterystyka fizykochemiczna tlenku grafenu .....	54



13.3. Schemat eksperymentu.....	54
13.4. Przygotowanie pokarmu zawierającego nanocząsteczki .....	56
13.5. Wskaźniki stresu oksydacyjnego.....	56
13.6. Ocena stopnia uszkodzeń DNA.....	57
13.7. Analiza cytometryczna komórek.....	58
13.8. Ocena histologiczna tkanek .....	59
13.8.1. Utrwalenie i zatopienie tkanek.....	59
13.8.2. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) .....	59
13.8.3. Mikroskopia świetlna (mikroskopia jasnego pola) .....	59
13.9. Opracowanie statystyczne wyników .....	60
<b>14. MODEL III: Ocena wpływu długoterminowej ekspozycji na nanocząsteczki tlenku grafenu (GO) w kontekście potencjału reprodukcyjnego badanych owadów oraz zmian komórkowych.....</b>	<b>61</b>
14.1. Hodowla <i>Acheta domesticus</i> .....	61
14.2. Charakterystyka fizykochemiczna tlenku grafenu .....	61
14.3. Przygotowanie pokarmu z dodatkiem nanocząsteczek .....	64
14.4. Model eksperymentu.....	64
14.5. Ocena sukcesu reprodukcji.....	66
14.6. Oznaczanie zawartości ATP.....	66
14.7. Analiza cytometryczna komórek.....	67
14.8. Ocena stopnia apoptozy oraz uszkodzeń DNA metodą TUNEL.....	67
14.9. Opracowanie statystyczne wyników .....	68
<b>IV. WYNIKI .....</b>	<b>69</b>
15. MODEL I.....	69
15.1. Wskaźniki stresu oksydacyjnego.....	70
16. MODEL II .....	74
16.1. Wskaźniki stresu oksydacyjnego.....	74



16.2. Stopień uszkodzeń DNA.....	76
16.3. Ocena cytometryczna uszkodzeń komórkowych.....	78
16.4. Ocena histologiczna .....	80
16.4.1. Jelito przednie .....	80
16.4.1.1. Tlenek grafenu GO .....	81
16.4.1.2. Tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu GO+Mn <sup>2+</sup> .....	81
16.4.2. Jelito środkowe .....	83
16.4.2.1. Tlenek grafenu GO .....	83
16.4.2.2. Tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu GO+Mn <sup>2+</sup> .....	83
16.4.3. Jelito tylne .....	83
16.4.3.1. Tlenek grafenu GO oraz tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu GO+Mn <sup>2+</sup> .....	83
16.4.4. Gonady męskie.....	86
16.4.4.1. Tlenek grafenu GO .....	86
16.4.4.2. Tlenek grafenu GO oraz tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu GO+Mn <sup>2+</sup> .....	86
17. MODEL III.....	88
17.1. Sukces reprodukcji.....	88
17.2. Zawartość ATP.....	89
17.3. Ocena cytometryczna uszkodzeń komórkowych.....	90
17.4. Ocena stopnia apoptozy oraz uszkodzeń DNA metodą TUNEL.....	91
<b>V. DYSKUSJA.....</b>	<b>94</b>
18. Ocena wybranych wskaźników odpowiedzi antyoksydacyjnej u <i>A. domesticus</i> po krótkotrwałym narażeniu na chemicznie czysty tlenek grafenu (GO) oraz GO zanieczyszczony jonami manganu (GO+Mn <sup>2+</sup> ) .....	94
19. Określenie stopnia stresu oksydacyjnego, analiza uszkodzeń komórkowych oraz zmian histologicznych u <i>A. domesticus</i> wskutek krótkoterminowego narażenia na obecność tlenku grafenu (GO oraz GO+Mn <sup>2+</sup> ) w pokarmie .....	100



20.	Wpływ długoterminowego narażenia na nanocząsteczki tlenku grafenu (GO) w kontekście zmian komórkowych oraz potencjału reprodukcyjnego <i>A. domesticus</i> .....	104
21.	Toksyczność tlenku grafenu u <i>Acheta domesticus</i> - podsumowanie.....	108
<b>VI.</b>	<b>WNIOSKI.....</b>	<b>109</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>110</b>
<b>VIII.</b>	<b>SPIS ILUSTRACJI .....</b>	<b>130</b>
<b>IX.</b>	<b>SPIS TABEL .....</b>	<b>135</b>

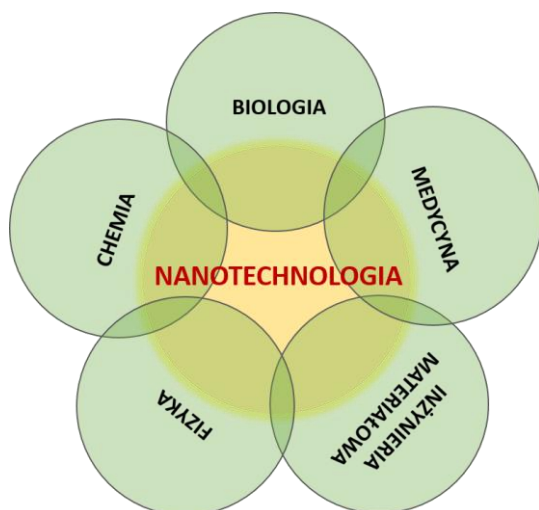




## I. WSTĘP

### 1. Wprowadzenie

Nanotechnologia, technologia informatyczna i biotechnologia uważane są za nauki perspektywiczne, ponieważ ich rozwój może znacząco wpłynąć na życie ludzi [1]. Nanotechnologia jest nowoczesną i dynamicznie rozwijającą się dziedziną nauki, która tworzy rozmaite materiały z pojedynczych atomów. Innymi słowy, umożliwia tworzenie układów funkcjonalnych w skali nanometrycznej, na poziomie molekularnym. Początek rozwoju nanotechnologii datuje się na lata 50 - te XX-go wieku, gdy amerykański fizyk Richard Feynman, podczas spotkania Amerykańskiego Towarzystwa Fizycznego w Caltech, zaprezentował wykład pt. *There's Plenty of Room at the Bottom* (w wolnym tłumaczeniu *Tam na dole jest jeszcze dużo miejsca*). Przedstawione przez naukowca wizjonerskie pomysły miniaturyzacji oraz możliwości manipulacji na poziomie nanometrów dostarczyły wielu inspiracji dla nanotechnologii i w znacznym stopniu przyczyniły się do jej popularyzacji [2]. Cząstki w skali nanometrycznej są trudne do zdefiniowania, ponieważ właściwości materii (zachowanie, wielkość i geometria cząsteczek) na tym poziomie są kontrolowane przez mechanikę kwantową i mogą ulegać zmianom specyficznym dla substancji [3]. Zgodnie ze standardami przyjętymi przez Komisję Europejską za nanomateriał przyjmuje się materiał, który przynajmniej w jednym wymiarze posiada rozmiar od 1 do 100 nm [4].



*Rysunek 1. Doprecyzowanie problemów stawianych przez nanotechnologię wymaga współpracy badaczy z wielu dziedzin nauki (rys. własny na podstawie [5]).*

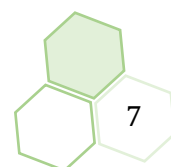
Obecnie różnorodne nanomateriały są stale wytwarzane, a następnie badane pod kątem ich właściwości i przydatności w przemyśle. Jednakże ich wpływ na środowisko, wszelkie organizmy oraz zdrowie człowieka ciągle jest wyjątkowo słabo poznany. Całkowite zrozumienie natury nanocząsteczek wymaga interdyscyplinarnego podejścia i wiedzy nie tylko z dziedziny inżynierii materiałowej, lecz także z zakresu fizyki, chemii, biologii i medycyny (Rys. 1) [5].

Pomimo złożoności problemu, struktury wytworzone przez nanotechnologię zaczynają być powszechnie stosowane. Istnieje wiele korzystnych aspektów rozwoju nanotechnologii. Naukowcy przewidują możliwość tworzenia organów zastępczych (nanomedycyna), sztucznych czerwonych krwinek (nanoinżynieria), ultraszybkich procesorów (informatyka kwantowa) oraz nowych ogniw słonecznych i paliwowych, które pozwolą na osiągnięcie wysokiej wydajności przy niskich kosztach. Nanotechnologia może być katalizatorem dla rozwoju gospodarczego i naukowego, a także przyczynić się do stworzenia nowych miejsc pracy i możliwości rozwoju [6]. Szacuje się, że w ciągu kilku najbliższych lat znaczny odsetek produktów obecnych na rynkach światowych będzie wytworzony w oparciu o nanotechnologię [7]. Z tego powodu wydaje się wręcz oczywiste, że organizmy mogą mieć kontakt z nanocząsteczkami za pośrednictwem wielu dróg wnikania. Wśród naukowców pojawiły się więc pytania dotyczące wpływu nowych technologii i powstających produktów „nano” na ludzkie zdrowie oraz środowisko. Ze względu na swoje niewielkie rozmiary nanocząsteczki mają szereg trudnych do przewidzenia właściwości i mogą wnikać do komórek powodując wiele niekorzystnych dla organizmu efektów. Do najczęściej wzmiankowanych zjawisk powstających na skutek narażenia na nanocząsteczki należą reakcje zapalne oraz nasilony stres oksydacyjny. Niektórzy badacze sugerują, że oddziaływanie nanocząsteczek może być podobnie do toksycznego oddziaływania azbestu [8]. Obecnie brakuje wystarczających danych aby w pełni zrozumieć zdrowotne i środowiskowe skutki dostępności nanotechnologii.

## **2. Jak to się wszystko zaczęło? Czyli od grafitu do grafenu**

Gdy w 1564 roku w angielskim Borrowdale znaleziono czysty grafit, nikt nie przypuszczał, że setki lat później skupi się na nim uwaga naukowców i przedsiębiorców. Nazwa „grafit” pochodzi od gr. *graphein* czyli pisać i nawiązuje do jego tradycyjnego zastosowania. Z powodu swoich właściwości grafit zastąpił używany wcześniej ołów w artykułach kreślarskich. Do dnia dzisiejszego grafit wraz z kaolinem jest niezbędnym elementem ołówka [9].

Zainteresowanie niezwykłymi cechami tego minerału nie malało, a przez lata nie zdawano sobie sprawy z faktu, że podczas ścierania grafitu na drewnie



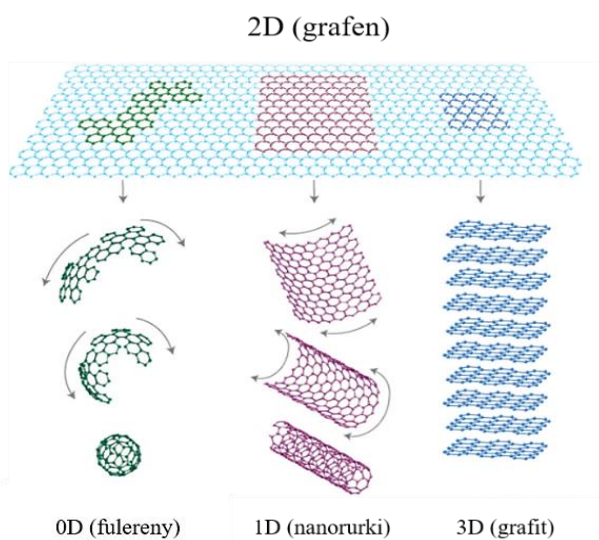
lub papierze, oprócz tworzenia szkiców lub tekstów, przyczyniano się do produkcji grafenu: najcieńszego materiału na świecie, który może zrewolucjonizować niemal każdą dziedzinę życia codziennego [10].

Dwuwymiarowy kryształ grafenu istniał od zawsze, jednakże nikt nie pracował nad tym jak wydobyć go z grafitu. Przełom nastąpił w 2003 roku, kiedy dwóch fizyków wyizolowało grafen z bloku grafitowego przy pomocy taśmy samoprzylepnej. Praca wymagała cierpliwości i wytrwałości ale zaowocowała nowym materiałem, który jest mocniejszy niż diament, milion razy cieńszy niż papier i lepszy w przewodzeniu prądu od miedzi [3]. Za badania nad grafenem Andriej Gejm i Konstantin Nowosiołow z Uniwersytetu w Manchesterze otrzymali w 2010 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki [11].

### 3. Charakterystyka materiałów z rodziny grafenu

Naturalnym podziałem nanostruktur jest podział w zależności od wymiarów podawanych w nanoskali. Wyróżnia się materiały zerowymiarowe (0D), jednowymiarowe (1D), dwuwymiarowe (2D) oraz trójwymiarowe (3D). W ciągu ostatnich dwóch dekad uzyskano szereg nowych nanomateriałów w związku z tym stale wzrasta potrzeba doprecyzowania lub rozszerzenia ich klasyfikacji [12]. Biorąc pod uwagę pochodzenie i skład chemiczny można podzielić nanocząsteczki na te, które powstają naturalnie oraz te, które zostały wytworzone przez człowieka. Pewna część nanocząsteczek powstaje w sposób niezamierzony, jako produkty uboczne procesów technologicznych [10].

Węgiel znajduje się w grupie pierwiastków najczęściej występujących we Wszechświecie, zaraz po wodorze, helu i tlenie. Jest obecny we wszystkich organizmach żywych. W przyrodzie znany jest pod postacią izotopów ( $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  – formy stabilne,  $^{14}\text{C}$  – forma

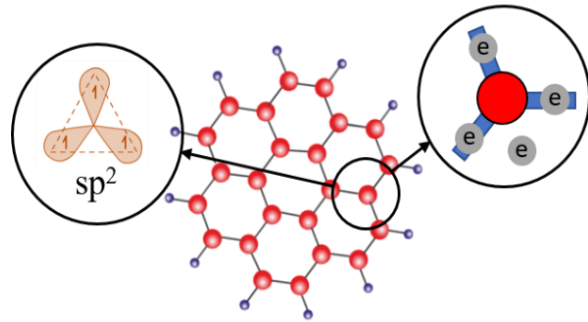


Rysunek 2. Grafen jest "matką" materiałów węglowych o różnych wymiarach [14].

promieniotwórcza) oraz odmian alotropowych, które wykazują bardzo różne właściwości [13]. Wśród odmian alotropowych węgla wyróżnia się: grafit, nanorurki węglowe, fulereny, diament oraz grafen, który stanowi podstawowy element budowy dla innych struktur węglowych [14] (Rys. 2). Z tego powodu odmiany alotropowe węgla określane są czasem materiałami należącymi do rodziny grafenu (ang. graphene family materials - GFMs) [15].

### 3.1. Grafen

Grafen jest „wschodzącą gwiazdą” na horyzoncie inżynierii materiałowej oraz fizyki fazy skondensowanej. Mimo swojej krótkiej historii ujawnił on już szereg nowych możliwości zastosowań w inżynierii nanokompozytów i biomateriałów



Rysunek 3. Struktura grafenu (rys. własny).

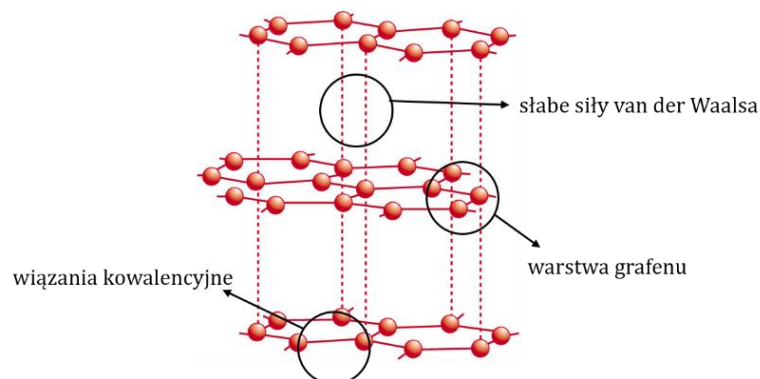
(procesory, cienkie wyświetlacze LCD, kondensatory energii, nośniki leków), które wynikają z budowy i geometrii determinującej jego unikalne właściwości fizykochemiczne [16]. Grafen jest dwuwymiarową (2D) strukturą zbudowaną z pojedynczej warstwy atomów połączonych w sześciokąty wiązaniami o hybrydyzacji  $sp^2$ . Odległości między sąsiednimi atomami węgla w warstwie wynoszą  $1,42 \text{ \AA}$  (czyli  $0,142 \text{ nm}$ ). Ułożenie atomów przypomina kształtem plaster miodu (Rys. 3). Wiązania pomiędzy atomami w strukturze są kowalencyjne i bardzo silne. Grafen posiada migrujący, niesparowany elektron który decyduje o cechach doskonałego przewodnika ciepła i elektryczności [3].

Grafen jest materiałem przezroczystym lecz wydajnie absorbującym światło, cienkim ale niezwykle wytrzymałym na uszkodzenia mechaniczne i rozciąganie. Jego wytrzymałość jest 324 razy większa od kevlaru (grafen  $130 \text{ GPa}$ , kevlar  $0,4 \text{ GPa}$  (gigapaskali)). Z powodu wysokiej ruchliwości elektronów w temperaturze pokojowej ( $\mu \approx 200\,000 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) może z powodzeniem w wielu zastosowaniach zastąpić krzem, na przykład do produkcji bardzo szybkich procesorów (dla porównania krzem:  $\mu \approx 1500 \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Całkowicie uwodorniony grafen w wyniku zmiany hybrydyzacji atomów (z hybrydyzacji  $sp^2$

na hybrydyzację  $sp^3$ ) staje się z przewodnika izolatorem i nazywany jest grafanem [17].

### 3.2. Grafit

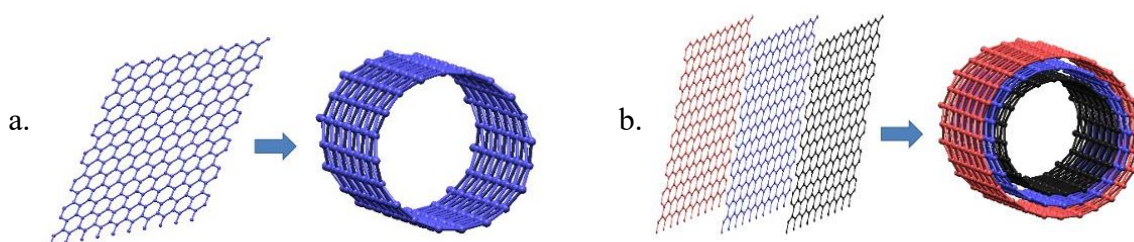
Grafit jest krystaliczną postacią węgla. Należy do szeroko rozpowszechnionego minerału z gromady pierwiastków rodzimych. W przyrodzie rzadko można spotkać dobrze wykształcone kryształy grafitu. Najczęściej występuje on jako składowy element skał metamorficznych i magmowych. Bywa znajdowany wśród granitów, porfirów i granulitów. Uważany jest za minerał wielu skrajności. Jest bardzo miękki i zarazem kruchy, odporny na wysoką temperaturę i wykazujący cechy doskonałego przewodnika prądu i ciepła [18]. W standardowych warunkach grafit jest bardzo stabilną chemicznie postacią węgla. Te ekstremalne właściwości nadają mu szeroki zakres zastosowań w przemyśle, między innymi do wyrobów materiałów ogniotrwałych, środków polerskich, pantografów oraz elektrod. Struktura grafitu jest płaska i zbudowana z wielu pojedynczych warstw grafenu (3D). Atomy w płaszczyźnie są związane ze sobą kowalencyjnie. Jak wspomniano w podrozdziale 3.1, jeden z elektronów w strukturze jest niesparowany i może swobodnie migrować w płaszczyźnie, dzięki czemu grafit przewodzi prąd elektryczny. Nie przewodzi go jednak w kierunku pod kątem prostym do płaszczyzny. Pomiędzy warstwami grafenu oddziałują słabe siły van der Waalsa, które umożliwiają oddzielanie (ścieranie się) i przesuwanie warstw grafitu względem siebie (Rys. 4) [19].



**Rysunek 4.** Schemat budowy grafitu (rys. własny).

### 3.3. Nanorurki węglowe

Nanorurki są cylindryczną strukturą o unikalnych właściwościach. Ich nazwa pochodzi od długiej, pustej w środku konstrukcji, której ściany utworzone są z warstwy grafenu. W zależności od ilości warstw, która buduje ich ściany nanorurki są kategoryzowane na nanorurki jednościenne (SWNT, z ang. single-walled nanotubes) lub nanorurki wielościenne (MWNT, z ang. multi-walled nanotubes) (Rys. 5) [20]. Występują również pod postacią fulerytów – bardzo twardych, polimeryzowanych nanorurek oraz nanotorusów, czyli nanorurek zwiniętych w postać torusa o zaskakujących własnościach magnetycznych (1000 razy większy moment magnetyczny na wybranym obszarze od spodziewanego). Najcieńsze nanorurki węglowe mają średnicę około 1 nm a ich długość może być nawet milion razy większa. Podobnie jak grafen, nanorurki są znakomitymi przewodnikami ciepła. Dobrze przewodzą ciepło wzdłuż ale słabiej w poprzek struktury. Wykazują unikalne właściwości elektryczne. Mogą przewodzić prąd o 1000-krotnie większym natężeniu od przewodów metalowych o tej samej masie. Cechują się również wyjątkową wytrzymałością na rozciąganie i związane z nim uszkodzenia mechaniczne [21]. Nanorurki uważane są za jeden z najsztwniejszych znanych materiałów. Nie są jednak wytrzymałe na ściskanie i zgniatanie, za co odpowiada przestrzeń pusta w środku.



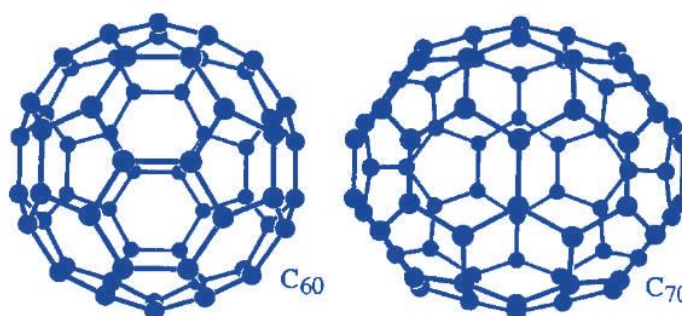
Rysunek 5. Budowa nanorurek, (a) nanorurki jednościenne (SWNT), (b) nanorurki wielościenne (MWNT) [202].

Ze względu na wspomniane właściwości fizykochemiczne nanorurki węglowe mogą być dobrym materiałem do budowy elementów maszyn i rozmaitych konstrukcji. Przypuszcza się, że mogą one być podstawą przyszłych układów elektrycznych. Warto zaznaczyć, że z ich udziałem stworzono już tranzystory przełączające się przy użyciu jednego elektronu oraz wzmocniono nimi konstrukcje rowerów startujących podczas wyścigu kolarskiego

Tour de France 2016 aby obniżyć ich masę i zwiększyć wytrzymałość [22]. Najambitniejszym pomysłem zastosowania nanorurek jest koncepcja budowa windy kosmicznej. Plan wymaga jednak znacznego postępu nauki oraz jakości materiałów budowanych z nanorurek. Należy wspomnieć, że nanorurki są szczególnymi izomerami strukturalnymi fulerenów [23].

### 3.4. Fulereny

Fulerenami nazywamy klastry węglowe ( $C_n$ ) o zamkniętej klatkowej budowie pustej w środku. Średnio, cząsteczki fulerenów mogą zawierać od 28 aż do około 1500 atomów. Nazwa „fuleren” pochodzi od nazwiska amerykańskiego architekta R. Buckminster Fullera, który był pomysłodawcą formy architektonicznej, tak zwanych kopuł geodezyjnych w kształcie wielokątów foremnych. Co ciekawe, na tej formie oparty był także zatwierdzony przez Międzynarodową Federację Piłki Nożnej (fr. Fédération Internationale de Football Association, FIFA) wzór piłki nożnej (tzw. Buckminster Ball) [24]. Powierzchnia fulerenów zbudowana jest z układu pierścieni składających się z pięciu i sześciu atomów węgla. Do grupy fulerenów zalicza się: fulereny właściwe ( $C_{60}$ ,  $C_{70}$ ), nanocebulki (fulereny wielowarstwowe), fulereny olbrzymie (ponad 500 atomów węgla) oraz opisane wcześniej nanorurki. Najpopularniejszy jest fuleren  $C_{60}$  o strukturze zbudowanej z 12 pierścieni pentagonalnych oraz 20 pierścieni heksagonalnych tworzących 32- ścienną bryłę [25](Rys. 6).



Rysunek 6. Budowa fulerenu  $C_{60}$  i  $C_{70}$  [203].

Teoretycznie najmniejszym fulerenem może być cząsteczka  $C_{20}$ , jest ona jednak dosyć nietrwała. Fulereny są mniej stabilne od innych odmian alotropowych węgla i źle rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. Ich własności chemiczne są zbliżone do węglowodorów aromatycznych i ulegają specyficznym dla nich reakcjom, jak na przykład reakcja addycji Friedla-Craftsa [24].

Początkowo fulereny traktowane były przez badaczy jako rodzaj ciekawostki naukowej, jednak szybko okazało się, że mogą one znaleźć wiele praktycznych zastosowań. Fulereny chętnie łączą się z polimerami, dzięki czemu tworzą układy o bardzo rozwiniętej powierzchni. Niezwykle przydatną cechą jest możliwość zamknięcia w ich wnętrzu niemal wszystkich pierwiastków układu okresowego oraz odpowiednio małych cząsteczek związków chemicznych (fulereny endohedralne). Można je także modyfikować powierzchniowo (fulereny egzohedralne) i zastępować obecne w strukturze atomy węgla innymi atomami (heterofulereny). Dlatego fulereny wydają się być dobrym rozwiązaniem dla farmaceutyki i inżynierii materiałowej [26,27].

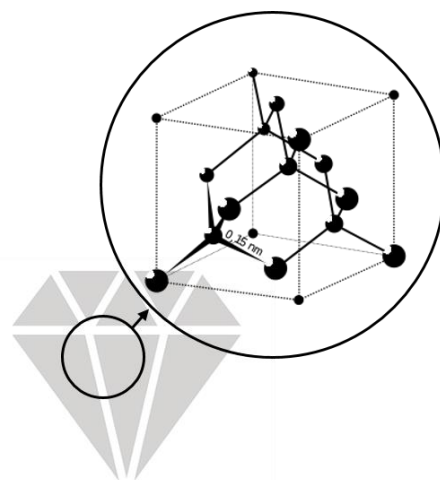
Za odkrycie fulerenów w 1996 roku przyznana została Nagroda Nobla w dziedzinie chemii dla naukowców z Uniwersytetu Rice w Huston (zespół R.E. Smalley i R.F. Curl, USA) oraz Uniwersytetu Sussex w Brighton (H. Kroto, Wielka Brytania) [28].

### 3.5. Diament

Ostatnią odmianą alotropową węgla, o której należy wspomnieć jest diament. Nazwa tego minerału nawiązuje do jego specyficznych właściwości (łac. „*diamentum*” czyli „niezniszczalny”). Diament zalicza się do najtwardszych znanych substancji występujących w przyrodzie, ale pomimo tej wyjątkowej twardości jest bardzo kruchy [29].

W XVIII wieku francuski chemik A. Lavoisier udowodnił, że diament to czysty węgiel spalając go pod kloszem z użyciem promieni

słonecznych i soczewki [30]. Diament posiada regularną strukturę krystaliczną powierzchniowo centrowaną (Rys. 7). Wykazuje bardzo dobre przewodnictwo cieplne, jest odporny na działanie kwasów i zasad oraz jest izolatorem [31]. Co ciekawe, jego powierzchnię można zarysować tylko i wyłącznie innym diamentem. Wszystkie te cechy stanowią o jego szerokich zastosowaniach. Diament jest używany przy produkcji materiałów ściernych, narzędzi tnących oraz



Rysunek 7. Struktura diamentu (rys. własny).



past termoprzewodzących (syntetyczny diament). Wykorzystywany jest także jako element w aparaturze naukowej i medycznej oraz, ze względu na atrakcyjny wygląd, w jubilerstwie do wyrobu biżuterii. Odpowiednio oszlifowane diamenty nazywane są brylantami [32].

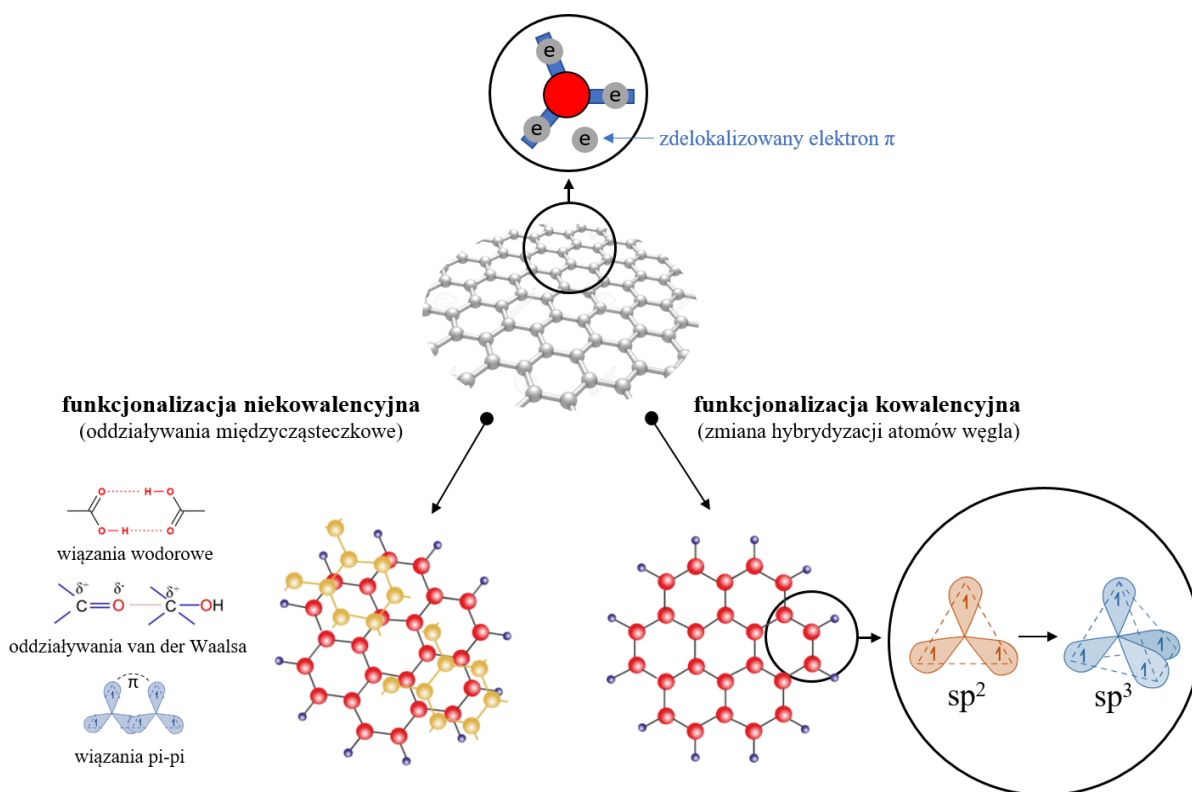
Cząsteczki diamentu w skali nano zostały po raz pierwszy wyprodukowane w 1960 roku w Związku Socjalistycznych Republik Radzieckich (ZSRR) poprzez detonację. Obecnie koloidalne zawiesiny pojedynczych cząstek diamentowych (4 – 5 nm) są znane na całym świecie pod postacią nanodiamentów [33].

#### **4. Metody modyfikacji nanozwiązków**

Dynamiczny rozwój nanotechnologii sprzyja zapotrzebowaniu na materiały o ściśle zdefiniowanych właściwościach. Przede wszystkim wzrasta popyt na związki chemiczne, które, poprzez zmodyfikowaną powierzchnię różnymi podstawnikami, mogą tworzyć wiązania kowalencyjne, jonowe lub niekowalencyjne z innymi cząsteczkami lub powierzchnią materiałów [34,35]. Przyłączanie dowolnych grup funkcyjnych do struktury związków nie stanowi obecnie większego problemu syntetycznego. Opracowano metody pozwalające na osadzenie warstw rozmaitych związków chemicznych radykalnie zmieniających właściwości powierzchni nanomateriałów. W ostatnim czasie sporą popularnością cieszą się takie pojęcia jak funkcjonalizacja, modyfikacja czy immobilizacja chemiczna. Pojęcia te pochodzą z obszaru inżynierii materiałowej i znalazły szerokie zastosowanie w nanotechnologii, w tak zwanym „dekorowaniu nanomateriałów”. Funkcjonalizacja chemiczna to cykl przemian chemicznych przeprowadzony na niewielkiej części materiału, cząsteczki chemicznej lub polimeru. Poprzez taką przemianę struktura pierwotna zostaje zachowana, ale całość uzyskuje nowe właściwości. Modyfikacja chemiczna to liczne przemiany chemiczne, które w odróżnieniu od funkcjonalizacji zasadniczo zmieniają budowę wyjściowego materiału i nadają mu nowe właściwości. Immobilizacja, inaczej nazywana „unieruchomieniem” to zespół technik, które prowadzą do połączenia rozpuszczalnej cząsteczki chemicznej do nierozpuszczalnego nośnika, ciała stałego w danym środowisku. W procesie tym wykorzystuje się adsorpcję, tworzenie wiązań kowalencyjnych, fizyczne uwięzienie w strukturze nośnika czy mikrokapsułkowanie [36].

#### 4.1. Funkcjonalizacja powierzchni grafenu

Wśród wszystkich materiałów węglowych grafen przyciąga uwagę naukowców ze względu na swoje unikalne cechy strukturalne i stosunkowo niskie koszty produkcji w porównaniu do innych nanomateriałów. Jest materiałem wysoce reaktywnym, a modyfikacje jego powierzchni mają kluczowe znaczenie w potencjalnych aplikacjach [37]. Funkcjonalizacja grafenu może zachodzić na całej powierzchni lub/i na jego krawędziach. Hybrydyzacja  $sp^2$  pomiędzy atomami węgla w płaszczyźnie grafenu ma wpływ na silne wiązania kowalencyjne oraz delokalizację elektronów  $\pi$ . Oddziaływanie płaszczyzny grafenu z obcymi atomami lub cząsteczkami powoduje zmianę rozkładu gęstości elektronów (modyfikację sprzężenia  $\pi - \pi$ ), a w konsekwencji zmianę jego właściwości fizycznych i chemicznych [38]. Wyróżnia się niekowalencyjne oraz kowalencyjne metody funkcjonalizacji grafenu (Rys. 8).



Rysunek 8. Funkcjonalizacja niekowalencyjna i kowalencyjna grafenu (rys. własny na podstawie [37,38]).

#### 4.1.1. Funkcjonalizacja niekowalencyjna

Funkcjonalizacja niekowalencyjna grafenu jest jedną z najłatwiejszych do przeprowadzenia ponieważ zachodzi w wyniku tworzenia się słabych oddziaływań międzycząsteczkowych, którymi są oddziaływania van der Waalsa, wiązania  $\pi-\pi$  lub wiązania wodorowe pomiędzy grafenem a czynnikiem modyfikującym. Podczas tej funkcjonalizacji hybrydyzacja atomów węgla  $sp^2$  pozostaje niezmienną i zachowane zostają wiązania typu  $\pi$  w sieci, dzięki czemu materiał jest przewodnikiem. W trakcie gdy cząsteczki jakiejś substancji zostają zaabsorbowane na powierzchnię grafenu silnie wpływają na zdelokalizowane elektrony  $\pi$ , zmieniając miejscowe stężenie nośników ładunku. Przerwa elektryczna grafenu zostaje otwarta, a ładunek pomiędzy adsorbentem a adsorbentem przeniesiony [39]. Funkcjonalizację niekowalencyjną grafenu oraz innych nanomateriałów stosuje się głównie w celu zwiększenia ich rozpuszczalności w wodzie. Kontrolowana adsorpcja cząsteczek wody pozwala na niewielkie manipulacje przerwą energetyczną grafenu bez ingerencji w jego strukturę  $\pi$ . W tym celu stosuje się funkcjonalizację związkami powierzchniowo czynnymi, które posiadają grupy hydrofilowe obdarzone ładunkiem. Aby polepszyć dyspergowalność grafenu w wodzie oraz rozpuszczalnikach organicznych wykorzystuje się takie środki powierzchniowo czynne jak na przykład dodecylosulfonian sodu (SDS), dodecylobenzenosulfonian sodu (SDBS) lub 4- (1,1,3,3- tetrametylobutylo)- fenyl- glikol polietylenowy (Triton- X) [40,41]. W tego typu funkcjonalizacji grafenu dobrze sprawdzają się również ciecze jonowe oraz związki, które zawierają w swojej strukturze pierścienie aromatyczne [42]. Innym rodzajem funkcjonalizacji niekowalencyjnej jest „dekorowanie” grafenu nanocząstkami metali, cząsteczkami biologicznymi oraz polimerami i różnymi związkami organicznymi [43,44].

#### 4.1.2. Funkcjonalizacja kowalencyjna

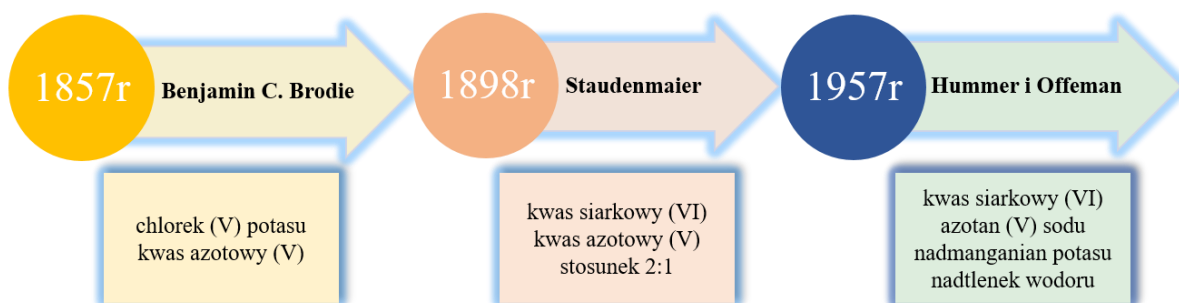
Zadaniem funkcjonalizacji kowalencyjnej jest trwałe przyłączenie cząsteczek innych substancji do powierzchni adsorbentu. Dzięki modyfikacji grafenu tą metodą istnieje możliwość uzyskania materiału o zadanych właściwościach fizykochemicznych. Wadą tego typu funkcjonalizacji jest zmiana hybrydyzacji atomów węgla z  $sp^2$  do  $sp^3$ , która wiąże się ze zmianą struktury elektronowej [45].

Zabieg taki wpływa często negatywnie na przewodnictwo elektryczne materiału oraz niektóre właściwości mechaniczne [46]. Ponadto, funkcjonalizacja kowalencyjna wymaga dużego nakładu energii oraz użycia bardzo reaktywnych grup chemicznych. Do tej metody zalicza się addycję (procesy uwodornienia), odwodornienia, utlenienia, fluorowania czy diazowania [36,47–50].

#### 4.1.2.1. Otrzymywanie tlenku grafenu

W literaturze można znaleźć przykłady utleniania grafenu różnymi metodami. Utlenianie może zachodzić jednoetapowo, przez bezpośrednie utlenianie grafenu silnymi utleniaczami ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KMnO}_4$ ) [51], lub wieloetapowo, gdzie najpierw utlenieniu ulegają płatki grafitu a następnie otrzymany tlenek grafitu poddawany jest eksfoliacji i obróbce termicznej prowadzącej do powstania tlenku grafenu [52,53].

Pierwszy w historii tlenek grafitu (prekursor tlenku grafenu) został otrzymany w 1859 roku przez chemika Benjamin C. Brodiego jako produkt utleniania grafitu chlorkiem (V) potasu oraz kwasem azotowym (V) [54,55]. Obecnie najpopularniejszą metodą otrzymywania tlenku grafenu (ang. graphene oxide, GO) na skalę przemysłową jest metoda Hummers'a - Offemana, która pierwotnie została opracowana w 1957 roku i jest stosowana z pewnymi modyfikacjami (Rys. 9) [56]. Metoda Hummers'a - Offemana jest szybsza od zaproponowanych uprzednio metod, bezpieczniejsza i pozwala na uzyskanie produktu o dobrych właściwościach. Polega ona na wykorzystaniu mieszaniny kwasu siarkowego (VI), azotanu (V) sodu, nadmanganianu potasu oraz 30% nadtlenu wodoru.

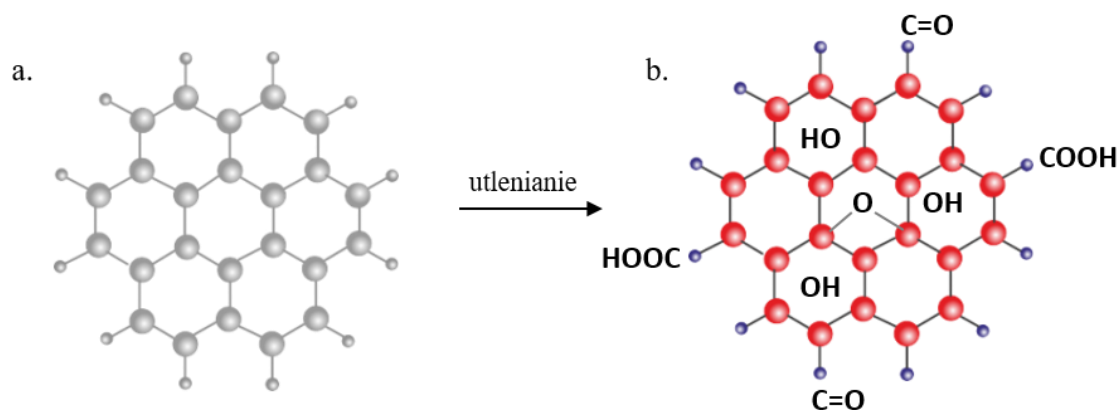


Rysunek 9. Metody otrzymywania tlenku grafitu (rys. własny na podstawie [54,55,56]).

Bardzo ważne jest końcowe oczyszczanie produktu 10% kwasem solnym. Niedokładne przeprowadzenie tego procesu skutkuje zanieczyszczeniem tlenku grafenu substancjami pochodzącymi od utleniaczy (np. jonami manganu) i może mieć niekorzystny wpływ na jego właściwości [57,58].

#### 4.1.2.2. Właściwości fizykochemiczne tlenku grafenu

Tlenek grafenu (GO) jest pochodną grafenu, w związku z tym podobnie jak on zbudowany jest z węglowych pierścieni heksagonalnych. Wskutek utleniania posiada w swojej strukturze wiele grup funkcyjnych zawierających tlen. Szacuje się, że około 30% składu tlenku grafenu stanowi tlen. Grupy hydroksylowe i epoksydowe znajdują się wewnątrz płaszczyzny GO a karboksylowe i karbonylowe zlokalizowane są głównie na jego krawędziach (Rys. 10) [59].



Rysunek 10. Schemat grafenu (a) oraz tlenku grafenu wraz z grupami funkcyjnymi (b) (rys. własny na podstawie [59]).

Hybrydyzacja  $sp^2$  tworzona jest pomiędzy atomami węgla lub atomem węgla i atomem tlenu w postaci grup karboksylowych lub karbonylowych. Wiązania o hybrydyzacji  $sp^3$  występują pomiędzy atomem węgla i tlenu w grupach epoksydowych i hydroksylowych. Tlenek grafenu może być izolatorem lub półprzewodnikiem, co jest zależne od ilości wiązań o hybrydyzacji  $sp^3$ , jak również atomów tlenu o ujemnym ładunku oraz defektów w strukturze, które odpowiadają za wzrost energii tego nanomateriału [54,60]. Redukcja tlenku grafenu (na przykład hydrazyną) prowadzi do przywrócenia hybrydyzacji  $sp^2$  i na powrót czyni z niego izolator [61]. Ponadto, po redukcji pojawia się wiele defektów strukturalnych, które są korzystne przy dekorowaniu struktury różnymi atomami i tlenkami np. Ag, Au, Pt, Ni, Cu, TiO<sub>2</sub>, ZnO, MnO<sub>2</sub>, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> i Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [14]. Tlenek grafenu posiada znacznie większe zdolności sorpcyjne dla jonów metali niż

wyjściowy grafen [62,63]. Właściwości mechaniczne tlenku grafenu zależą od ilości tlenowych grup funkcyjnych oraz uporządkowania struktury. Dowiedziono, że uporządkowana struktura w porównaniu ze strukturą amorficzną wykazuje większą wytrzymałość na uszkodzenia mechaniczne. Grupy tlenowe przyczyniają się do zmniejszenia wytrzymałości z powodu naruszenia hybrydyzacji  $sp^2$ , która jest korzystniejsza energetycznie. Jednakże grupy te warunkują dyspersję w wodzie oraz dalszą funkcjonalizację kowalencyjną [14,59,64,65]. Jedną z metod takiej funkcjonalizacji jest substytucja nukleofilowa, która umożliwia przyłączanie związków posiadających grupy aminowe – na przykład wiele grup leków [66]. Pogłębianie wiedzy na temat właściwości fizycznych i chemicznych tlenku grafenu ma kluczowe znaczenie w projektowaniu przyszłych zastosowaniach tego nanomateriału.

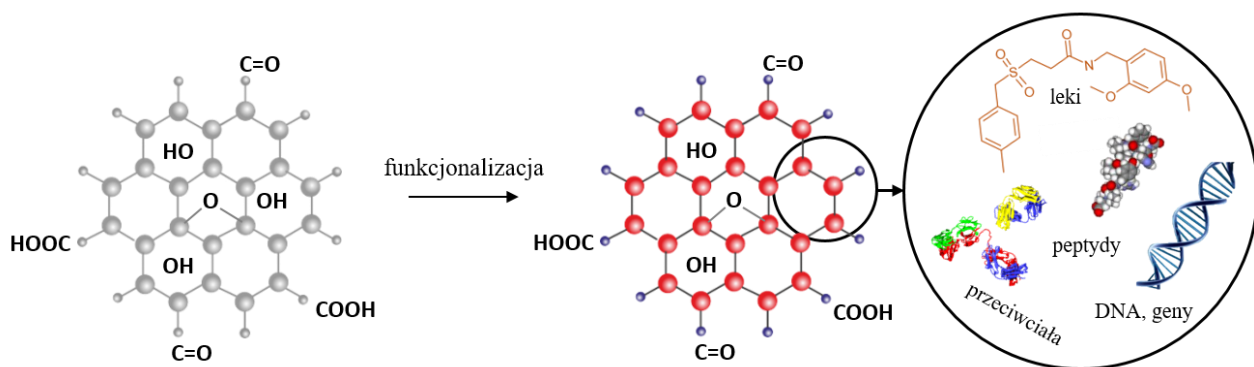
## 5. Perspektywy zastosowania tlenku grafenu

Nanocząsteczki, ze względu na swoje atrakcyjne właściwości są materiałami badanymi pod kątem wielu zastosowań i w krótkim czasie stały się nadzieją inżynierii materiałowej, elektroniki oraz biomedycyny [67]. Bardzo dobre przewodnictwo cieplne, unikatowe własności elektryczne oraz mechaniczna trwałość sprawiają, że tlenek grafenu ma duży potencjał jako materiał wykorzystywany do budowy urządzeń magazynujących energię. Są to na przykład kondensatory lub baterie litowe. Dowiedziono, że dodatek GO powoduje zwiększenie przewodnictwa, szybkości ładowania oraz pojemności elektrycznej takich urządzeń. Ma to związek ze zwiększoną adsorpcją jonów [68]. Duża pojemność elektryczna następuje w wyniku redukcji termicznej lub chemicznej tlenku grafenu. Jak wspomniano w rozdziale 4, redukcja powoduje wiele defektów strukturalnych nanocząsteczki, które stają się dodatkowymi miejscami wiązania jonów. Funkcjonalizacja grafenu różnymi pierwiastkami, na przykład żelazem, polepsza właściwości elektrochemiczne, co ma duże znaczenie w konstruowaniu elektrod [69,70]. Nanokompozyty na bazie grafenu są obiecujące dla technologii wytwarzania rozmaitych materiałów używanych w przemyśle, ponieważ warunkują uzyskanie przez produkt dobrych właściwości mechanicznych, strukturalnych i cieplnych [71]. Przewiduje się, że grafen i jego pochodne, dzięki imponującej ruchliwości elektronów, mają szansę zastąpić krzem

wykorzystywany dotychczas do budowy procesorów i urządzeń informatycznych [72].

Tlenek grafenu, z uwagi na swą wysoką reaktywność, dyspersję w roztworach oraz szerokie możliwości funkcjonalizacji skupia uwagę przede wszystkim jako potencjalny nośnik środków terapeutycznych [59]. W ocenie przydatności w zastosowaniach biologicznych brane są pod uwagę: powierzchnia, liczba warstw, rozmiary, reaktywność chemiczna oraz stabilność. Stosunek reaktywnej powierzchni do wielkości tlenku grafenu jest prawie czterokrotnie większy niż u innych materiałów, które konkurują z nim o pozycję najefektywniejszych systemów dostarczania leków. Fakt, że zbudowany jest z pojedynczej warstwy atomów również ma istotne znaczenie, ponieważ wzrost ilości warstw zmniejsza pojemność transportową takiego nośnika [35]. Innym, ważnym parametrem jest sztywność materiału, która związana jest pośrednio z ilością warstw. Im nanocząsteczka posiada więcej warstw tym jej struktura jest bardziej integralna, niestety staje się również mało elastyczna i może w trakcie penetracji do komórki uszkadzać jej komponenty [73].

Warto wspomnieć, że sama wielkość poprzeczna też ma znaczenie – im większa struktura tym gorsze przyswajanie przez organizm. Istotnymi zagadnieniami są tutaj bariera krew-mózg, klirens nerkowy albo tempo samej degradacji nanonośnika w organizmie [14,74]. Dlatego ważne jest aby dokonać takich manipulacji strukturą nanocząsteczki aby maksymalnie zminimalizować ewentualne przeszkody, które mogłyby negatywnie wpłynąć na aplikację medyczną substancji terapeutycznej. Dotychczas pojawiły się w literaturze opracowania układów nośnik grafenowy-lek. Badania *in vitro* oraz *in vivo*



**Rysunek 11.** Zastosowanie tlenku grafenu jako nośnika różnych środków terapeutycznych i biomolekuł (rys. własny na podstawie [14]).

potwierdziły, że tlenek grafenu (GO) może być wysoce skuteczny w dostarczaniu leków przeciwnowotworowych, takich jak doksorubicyna (DOX) lub analogi kamptotecyny (SN38) oraz leków trudno rozpuszczalnych, antybiotyków, przeciwciał, peptydów a nawet i fragmentów DNA lub RNA (Rys. 11) [71,75– 78].

W przypadku doksorubicyny (lek podawany w terapii onkologicznej dożylnie) możliwe jest spore „obciążenie” nośnika (około  $1,08 \text{ mg} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) GO przy wcześniejszej jego funkcjonalizacji nanocząsteczkami  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Taka hybryda wykazywała powinowactwo do kwaśnego środowiska oraz zdolność do ponownego, odwracalnego zdyspergowania w roztworze o charakterze zasadowym [79]. Ta obserwacja jest cenna ponieważ pH wokół komórek zmienionych nowotworowo jest lekko kwaśne, w związku z tym uwalnianie leku jest przez takie środowisko promowane. Obecna skuteczność terapii w znacznym stopniu ograniczona jest brakiem zdolności osiągnięcia wysokiej koncentracji substancji leczniczej w miejscu docelowym. Lek nie jest kierowany bezpośrednio w miejsce zmienione nowotworowo i kumuluje się w zdrowych tkankach prowadząc do licznych, czasem bardzo negatywnych skutków ubocznych. Terapia osiąga przez to małą wydajność, a stosowanie niektórych leków staje się klinicznie ograniczone. Dlatego bardzo ważne jest opracowanie skutecznego systemu dostarczania leku z możliwością specjalnego jego wychwytu przez komórkę oraz „inteligentnego” stopniowego uwalniania - tak zwana „terapia celowana”. Transportery leków są tak projektowane aby uwalniać lek w odpowiedzi na stosowne bodźce wewnętrzne (temperatura ciała, pH, reakcje chemiczne) oraz bodźce dostarczone z zewnątrz w postaci ultradźwięków, pola magnetycznego lub elektrycznego [80–82]. Zespół Zhang’a opracował nośnik GO wzbogacony jonami sulfonowymi (odpowiadają one za stabilność w roztworze fizjologicznym), kwasem foliowym oraz dwoma lekami przeciwnowotworowymi: doksorubicyną (DOX) i kamptotecyną (CPT). Tak zaprojektowana struktura została skierowana przeciwko komórkom ludzkiego nowotworu sutka (MCF-7). Wyniki pokazały swoiste kierowanie się nośnika wraz z lekami prosto do komórek raka a oba leki zastosowane jednocześnie działały bardzo cytotoksycznie [44]. Inny zespół wykazał, że odpowiednia kombinacja fotosensybilizatora, kwasu foliowego oraz leku jest niezwykle skuteczna w terapii fotodynamicznej i hamuje rozwój komórek raka wątroby HepG2. Na ten sam nowotwór równie skutecznie działa



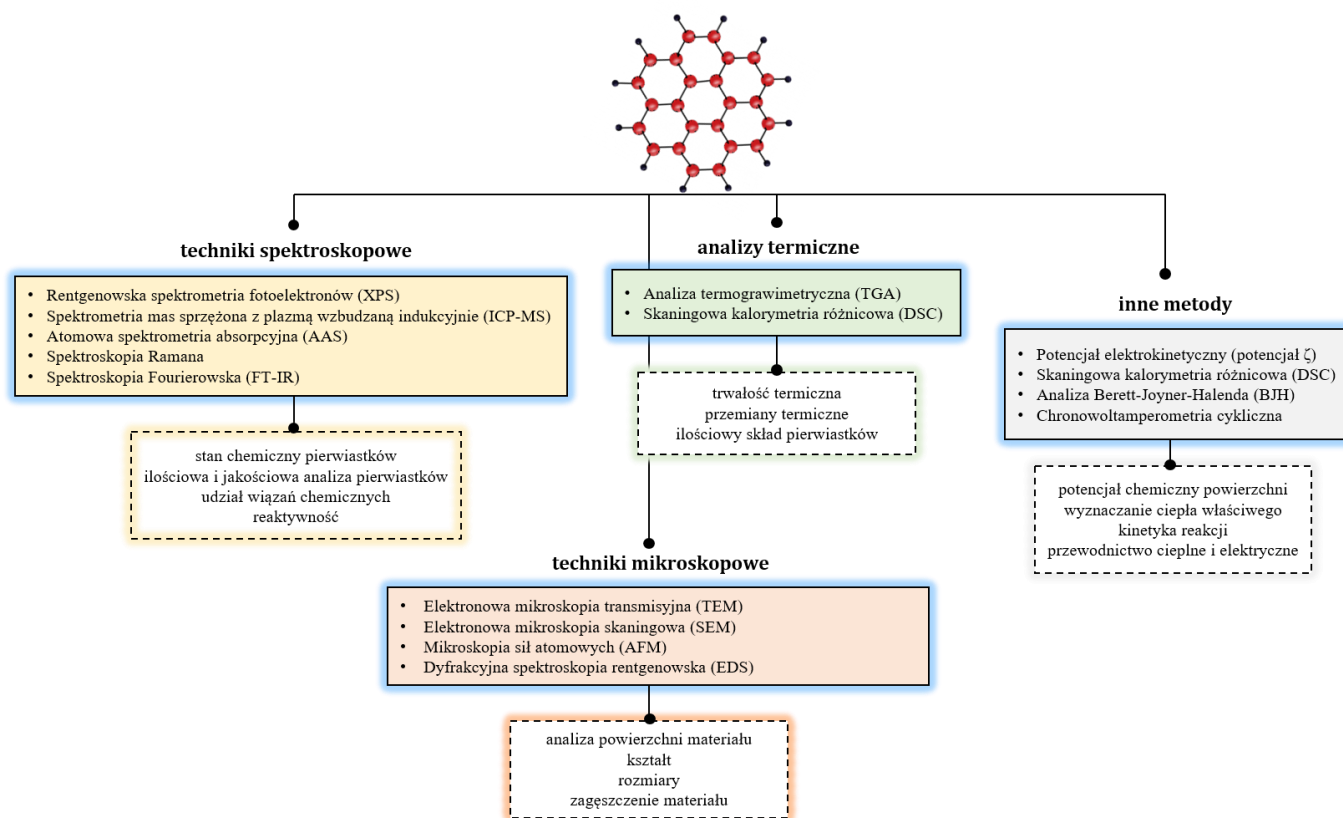
funkcjonalizacja nośnika nanocząsteczkami złota (Au) i doksorubicyny (DOX) [83]. GO może być również połączony dodatkowo z fluorochromem i służyć jako skuteczny biosensor w obrazowaniu medycznym [84]. Stosowanie wielofunkcyjnych platform nośnikowych połączonych z kilkoma środkami farmaceutycznymi jednocześnie nazywane jest „terapią skojarzoną” i może być skuteczniejszym rozwiązaniem w leczeniu chorób [85].

Obiecującym podejściem do leczenia rozmaitych schorzeń, w tym też i raka jest terapia genowa [86]. Oparta jest na stosowaniu wektorów genetycznych, które wprowadzają odpowiednią sekwencję DNA do komórki. Sekwencja ta jest utrzymywana podczas kolejnych podziałów komórkowych. Można w ten sposób także przeprowadzić klonowanie właściwego genu. Dla inżynierii genetycznej wyzwaniem jest użycie bezpiecznego transportera tego wektora. Doświadczenia pokazały, że hybryda nanonośnika zbudowana z tlenku grafenu, kationowego polimeru (polieteroimid, PEI) i odpowiedniego wektora wykazywała stosunkowo niską toksyczność oraz dobrą wydajność [87]. Innym sposobem zmniejszenia toksyczności nośnika jest na przykład pokrycie jego struktury glikolem polietylenowym (PEG) lub dekstranem [88,89].

Aplikacje przemysłowe jak i biomedyczne cząstek powstałych nie tylko na bazie tlenku grafenu ale także innych nanocząsteczek wymagają rozwiązania jeszcze wielu problemów. Kluczowe jest poznanie i zrozumienie aspektu ich biodegradowalności, biogodności oraz szeroko pojętej toksyczności przed wprowadzeniem ich do komercyjnego użytku i kontaktem z organizmem oraz środowiskiem [35].

## 6. Metody charakterystyki grafenu i jego pochodnych

Charakterystyka fizykochemiczna nowego materiału jest niezbędna nie tylko w celu określenia jego przydatności w rozwiązaniach technologicznych i medycznych, ale również w ocenie mechanizmu potencjalnej toksyczności. Istnieje wiele metod analitycznych, które są powszechnie stosowane do oceny właściwości nanocząsteczek. Różnorodność i wielość tych metod nie jest przypadkowa [90]. Użycie odpowiedniej techniki instrumentalnej lub chemicznej w ocenie nanomateriału umożliwia kompleksową analizę struktury powierzchni, symetrii, rozmiarów płaszczyzny, kształtu, reaktywności, powierzchniowego rozkładu ładunku elektrycznego, udziału poszczególnych wiązań chemicznych oraz ilościowego i jakościowego składu chemicznego. Każda technika ma wiele zalet i ograniczeń, dlatego jej wybór podyktowany jest konkretnym zadaniem (Rys. 12) [66,91,92].



Rysunek 12. Metody analityczne wykorzystywane w charakterystyce grafenu i jego pochodnych (rys. własny na podstawie [91]).

Dobór właściwej metody zależy przede wszystkim od właściwości analizowanego materiału (ilość i postać próbki, zachowanie fizykochemiczne w warunkach metody) jak również czułości i możliwości aparatury [92]. Warto dodać, że analizy instrumentalne są powszechne w badaniach jakościowej i ilościowej obecności nanocząsteczek w próbkach środowiskowych oraz w jakościowej ocenie grafenu i jego pochodnych w materiale biologicznym. Ilościowe oznaczenie związków na bazie węgla w próbkach biologicznych stanowi duży problem, który jest związany ze specyficnością metody badawczej. Węgiel to główny pierwiastek budujący organizmy. Ilość analizowanej nanocząsteczki nie może zostać jednoznacznie określona, ponieważ sygnał analityczny należący do grafenu jest zakłócony licznymi interferencjami pochodzącymi od innych składników organicznych towarzyszących mu w próbce.

## **7. Nanotoksykologia**

Wszystkie organizmy były i są narażone na cząsteczki bardzo małych rozmiarów (<100 nm) właściwie podczas całego rozwoju ewolucyjnego, jednakże ekspozycja na nie nasiliła się w ciągu ostatniego stulecia w wyniku działań antropogenicznych [93]. Nanotechnologia jako nauka czyni bardzo szybkie postępy. Wiąże się to z opracowywaniem nowych materiałów i wprowadzaniem ich do środowiska. Jak wspomniano w rozdziale 5, zarówno nanocząsteczki na bazie grafenu oraz wiele innych struktur „nano” będą coraz powszechniej wykorzystywane. Przewiduje się, że produkcja towarów zawierających nanocząsteczki wzrośnie do 2020 roku z około 2 300 ton produkowanych obecnie do około 58 000 ton [8]. Ekspozycja na nanocząstki staje się więc nieunikniona nie tylko poprzez ich wdychanie z powietrzem atmosferycznym, ale również poprzez pożyczenie (dodatki do żywności, farmaceutyka), kontakt skórny lub nawet iniekcję (terapię medyczną) [94]. Nie można pominąć faktu, iż rosnący udział nanocząsteczek w różnych produktach przyczyni się do ich emisji do środowiska w postaci odpadów przemysłowych i domowych [91]. Ochrona bezpieczeństwa środowiska naturalnego oraz zdrowia organizmów jest niezwykle istotna, dlatego podstawowe zrozumienie toksykologii nanomateriałów (nanotoksykologii) stanowi dla naukowców spore wyzwanie [95]. Badanie szkodliwości jest trudnym zadaniem bo wymaga poznania złożonych mechanizmów kinetyki i interakcji

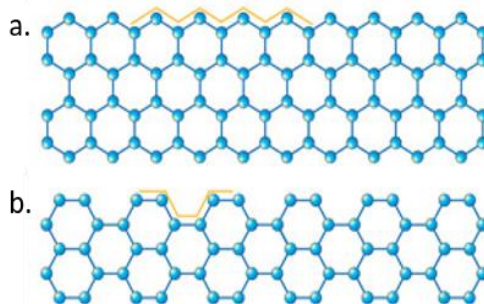
wewnątrzkomórkowych, takich jak na przykład zaburzenia szlaków biochemicznych lub uszkodzenia organelli lub/oraz uszkodzenia genomu [96,97]. Nanocząsteczki mają wiele różnych cech, które mogą przyczynić się do ich skomplikowanych interakcji z komórkami, tkankami i narządami, dlatego informacje na temat potencjalnego zagrożenia płynącego ze strony nanotechnologii są ciągle fragmentaryczne.

### **7.1. Mechanizmy potencjalnej toksyczności GO - wiodące koncepcje**

Właściwości fizykochemiczne nanocząsteczek mają silny związek z ich aktywnością biologiczną, a wiele z nich może być przyczyną negatywnego oddziaływania na organizmy [98]. Nadal nie poznano, która z tych właściwości odgrywa dominującą rolę w indukowaniu cytotoksyczności, tym bardziej, że nanocząstki są bardzo czułe na zmiany środowiska (medium), w którym się znajdują. Analizując dane literaturowe możemy przypuszczać, że kluczową cechą jest wielkość, kształt, struktura, właściwości powierzchniowe, rozpuszczalność, zdolność do agregacji oraz skład chemiczny [91,96]. Warheit i wsp. sugerują, że podczas analizowania mechanizmu toksyczności należy brać pod uwagę także reaktywność powierzchni, metodę syntezy oraz czystość chemiczną nanomateriału [99].

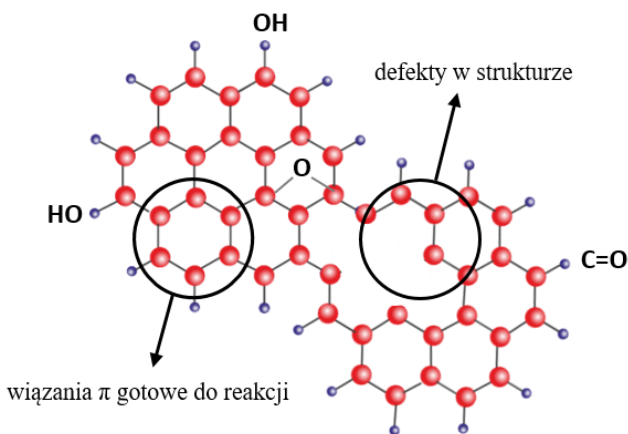
Podczas omawiania szczegółowych właściwości fizyko-chemicznych tlenku grafenu nadmieniono, że ma on dużą powierzchnię adsorpcji względem swoich bardzo małych rozmiarów. Warto zatem dodać, że liczba atomów na powierzchni tlenku grafenu wzrasta wykładniczo wraz ze zmniejszaniem się jego wielkości. W rezultacie jest on bardzo reaktywny w układach biologicznych, ma wysoką energię powierzchniową i jest bardziej toksyczny w porównaniu z dużymi cząsteczkami o podobnym składzie chemicznym [98]. Rozproszone po organizmie nanocząsteczki chętnie wchodzą w reakcje z innymi biomolekułami wewnątrz i na powierzchni komórek oraz łatwiej penetrują bariery komórkowe [98,100]. Wraz ze zmniejszaniem rozmiarów nanocząstki przewodnictwo elektryczne, twardość powierzchni oraz reaktywność chemiczna dynamicznie się zmieniają wpływając pośrednio na jej aktywność biologiczną [101]. Liao i wsp. udowodnili, że im mniejsza wielkość płatków GO tym większa jego aktywność hemolityczna względem czerwonych krwinek [102].

Kształt oraz skład chemiczny cząsteczki także nie pozostają bez znaczenia w ocenie potencjału cytotoksycznego. Płaszczyzna tlenku grafenu oraz jej zakończenia ulegają modyfikacjom strukturalnym, a wraz z nimi zmienia się również zdolność adsorpcji atomów, jonów i cząsteczek przez obecne



Rysunek 14. (a) ostre krawędzie grafenu - typu "zigzag", (b) krawędzie typu "armchair" (na podstawie [104, 105])

na krawędziach tlenowe grupy funkcyjne [45]. Tak zwane „ostre krawędzie – „zigzag” powstają zazwyczaj podczas procesu syntezy [103] i mogą być odpowiedzialne za mechaniczne uszkodzenia barier komórkowych oraz organelli zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych (Rys. 14) [104,105]. W tym miejscu należy również przypomnieć (podrozdział 4.1.2.1), że właściwe przeprowadzenie procesu syntezy tlenku grafenu ma ogromny wpływ na jego czystość chemiczną. Niedokładne końcowe oczyszczanie produktu skutkuje jego zanieczyszczeniem jonami manganu, które przy dużej koncentracji mogą negatywnie oddziaływać na homeostazę komórki [106]. Duży wpływ na toksyczność ma funkcjonalizacja powierzchni nanocząsteczki. Tlenek grafenu



Rysunek 13. Schemat zredukowanego tlenku grafenu (rGO) (rys. własny).

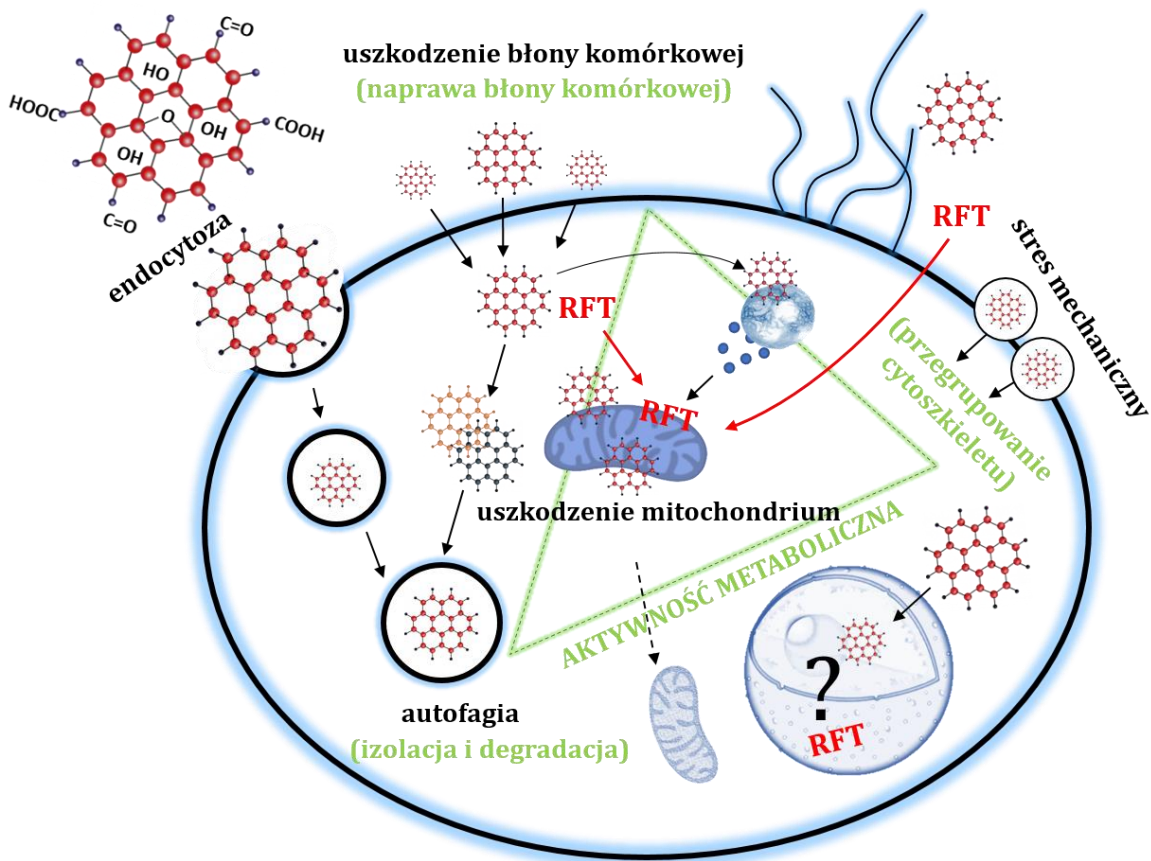
wykazuje tendencje do tworzenia agregatów w buforach fizjologicznych, w związku z tym jego dyspersje bywają niestabilne. Wzrost rozpuszczalności oraz dyspersji skutkuje wzrostem biokompatybilności, dlatego naukowcy podjęli się licznych prac nad modyfikacją powierzchniowego składu chemicznego tego nanomateriału. Zredukowany tlenek grafenu (rGO) (Rys. 13) działa silnie cytotoksycznie z uwagi na liczne defekty w strukturze i dużą reaktywność. Jego funkcjonalizacja (na przykład żelatyną lub PEG) podnosi stabilność oraz dyspergowalność w roztworach [107,108]. Naukowcy zaobserwowali, że na ujemną biozgodność nanocząsteczek mają wpływ

wykazuje tendencje do tworzenia agregatów w buforach fizjologicznych, w związku z tym jego dyspersje bywają niestabilne. Wzrost rozpuszczalności oraz dyspersji skutkuje wzrostem biokompatybilności, dlatego naukowcy podjęli się licznych prac nad modyfikacją

zarówno właściwości fizykochemiczne reagentów używanych do eksperymentów, jak też same warunki reakcji (pH, temperatura, obecność zanieczyszczeń lub promieniowania) [90,109,110]. Rozpuszczone nanocząsteczki tlenku grafenu mogą zachowywać się bardzo różnie w różnych ośrodkach. Oznacza to, że po emisji do środowiska naturalnego (wody powierzchniowe, gleba, wody gruntowe) lub przyswojenia przez organizm (środowisko płynów fizjologicznych) mogą ulegać spontanicznym, trudnym do przewidzenia reakcjom. Zespół Wang'a ocenił wpływ toksyczności tlenku grafenu na bakterie *Shewanella oneidensis*, które w normalnych warunkach żyją w wodach i uczestniczą w redukcji jonów metali. Badania wykazały, że czysty tlenek grafenu w wodzie nie oddziałuje toksycznie, ale po 12 godzinach inkubacji zostaje przez obecne tam bakterie zredukowany do cytotoksycznego rGO [111]. Na tych samych mikroorganizmach powtarzalne wyniki otrzymał zespół Salas'a [112], natomiast zespół Akhavan'a, dowiódł zdolności redukcji tlenku grafenu przez *Escherichia coli* [113]. Inne z hipotez zakładają, że nanozwiązki mogą zostać otoczone przez różne cząsteczki biologiczne takie jak białka lub lipidy i przyczynić się do stresu oksydacyjnego w komórce oraz uszkodzeń materiału genetycznego komórki [114,115].

## 8. Koncepcja nasilonego stresu oksydacyjnego. Mechanizmy obrony antyoksydacyjnej

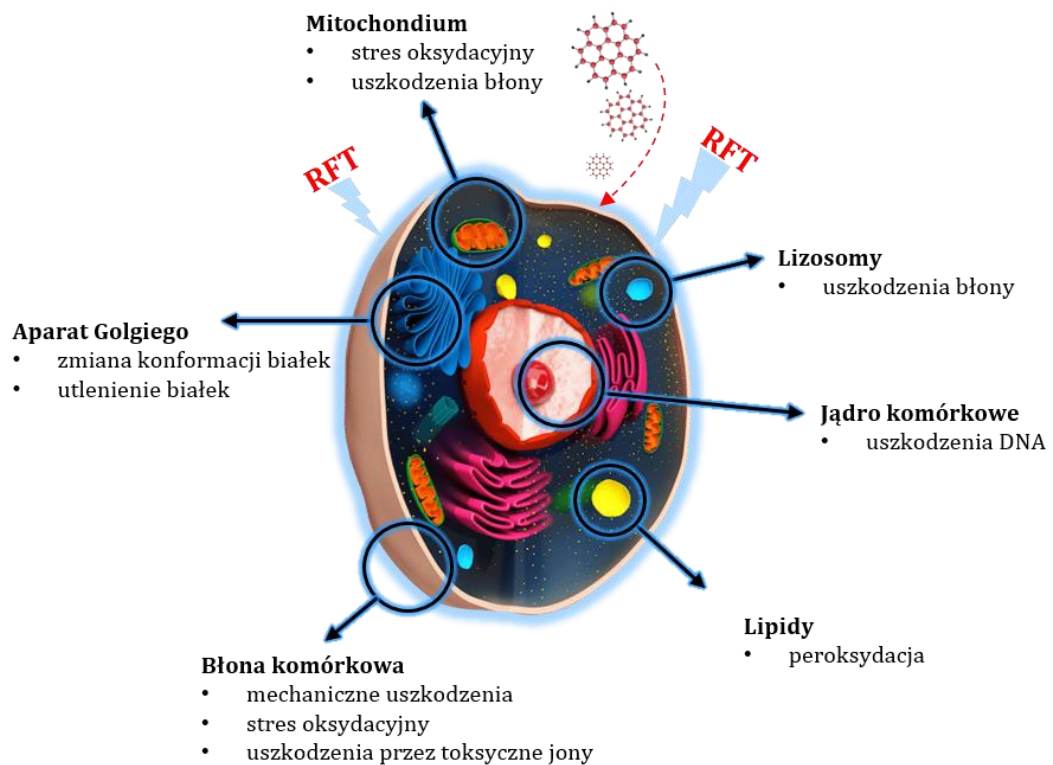
W układach biologicznych ważnym elementem podczas rozpatrywania potencjalnej cytotoksyczności i genotoksyczności nanocząsteczek jest droga ich podania, stężenie, dawka oraz czas trwania ekspozycji [74,116–119]. Również typ organizmu (różnice międzysobnicze/filogenetyczne) i typ traktowanych komórek nie jest bez znaczenia. Mogą one bowiem zasadniczo różnić się między



**Rysunek 15.** Prawdopodobne scenariusze zdarzeń w komórce podczas kontaktu z nanocząsteczkami (rys. własny na podstawie [122]).

sobą aktywnością procesów metabolicznych, rodzajem receptorów na powierzchni komórki, zdolnościami przeciwutleniającymi (np. aktywnością i rodzajem enzymów antyoksydacyjnych), mechanizmami naprawczymi DNA oraz obecnością wielu innych enzymów i hormonów [90]. Wszystkie te czynniki wpływają na los i interakcje nanocząsteczek. Dlatego badania nanotoksykologiczne prowadzone na zwierzętach lub hodowlach komórkowych nie dają pełnych informacji o ostatecznym oddziaływaniu jakie dana cząsteczka będzie mieć na dany organizm. Dotychczas zaprezentowane mechanizmy

toksyczności tlenu grafenu także nie są wystarczające do oceny ryzyka niesionego przez kontakt z tym materiałem [8]. Nanozwiązki mają zdolność przenikania przez błonę komórkową do cytozolu komórki. Odbywa się to na drodze endocytozy (najczęściej pinocytozy), dyfuzji lub poprzez uszkodzenie błony w sposób mechaniczny (konceptcja „ostrych krawędzi”) [108]. Uruchomienie procesów naprawczych błony komórkowej pociąga za sobą wzrost aktywności metabolicznej i zaburzenie homeostazy [44,120,121]. Na skutek obecności obcych cząsteczek we wnętrzu komórki obserwuje się zwiększoną liczbę autofagosomów, uszkodzenia mechaniczne lizosomów oraz liczne zaburzenia w strukturze i funkcji mitochondriów. Indukuje to wytwarzanie reaktywnych form tlenu (RFT), których konsekwencją jest nasilenie wewnątrzkomórkowego stresu oksydacyjnego (Rys. 15, 16) [122]. Wiele badań wskazuje, że stres oksydacyjny stanowi strategiczny mechanizm potencjalnej toksyczności nanocząsteczek [123–125]. Wytwarzanie i eliminowanie RFT równoważą mechanizmy homeostazy komórkowej, które wyciszają bądź intensyfikują aktywność układów antyoksydacyjnych.

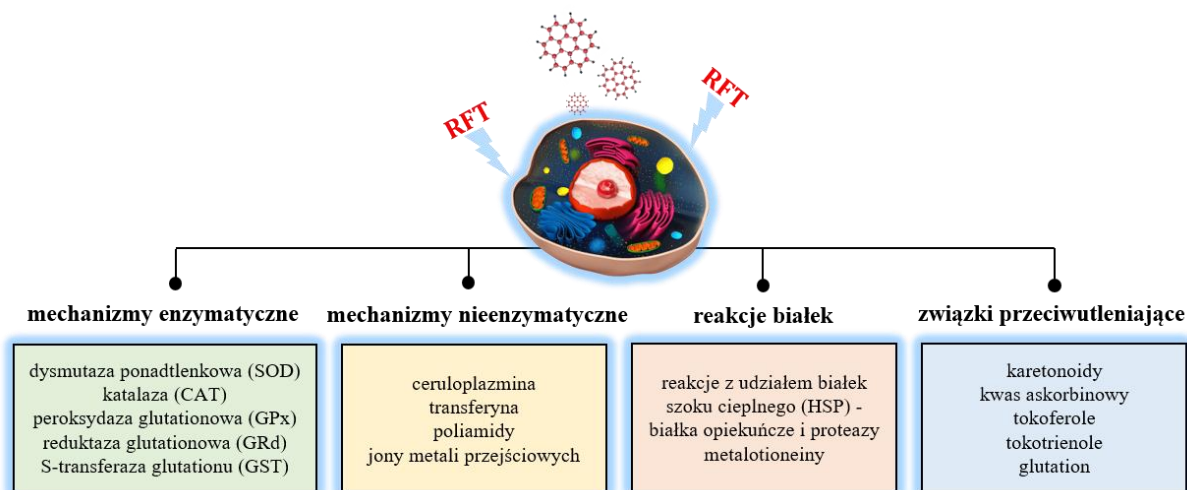


Rysunek 16. Wpływ nanocząsteczek na poszczególne komponenty komórki (rys. własny na podstawie [73]).



## 8.1. Uniwersalne markery stresu oksydacyjnego

Organizmy tlenowe wytworzyły różne obronne mechanizmy metaboliczne, które chronią integralność komórek przed szkodliwym wpływem reaktywnych form tlenu (Rys. 17).



*Rysunek 17. Mechanizmy przeciwdziałające reaktywnym formom tlenu w komórce (rys. własny na podstawie [126]).*

Wśród mechanizmów obronnych wyróżnionych na rysunku 17 najlepiej poznane są naturalne enzymy antyoksydacyjne takie jak: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza glutationowa (GPx), reduktaza glutationowa (GR), S-transferaza glutationu (GST), jak i również reakcje niektórych białek opiekuńczych [126]. Mechanizmy enzymatyczne oraz białka szoku cieplnego (HSP) stanowią uniwersalne wskaźniki stresu oksydacyjnego w organizmie [127– 131]. Monitorowanie ich aktywności w tkankach narażonych na działanie substancji potencjalnie toksycznej (na przykład nanocząsteczki) [132] oraz w trakcie przebiegu chorób dostarcza istotnych informacji o rozwoju stresu oksydacyjnego w organizmie. Pozwala to nie tylko oszacować stopień produkcji reaktywnych form tlenu, ale również wskazać skalę narażenia organizmu na niebezpieczeństwo [133]. W chwili gdy działanie układów antyoksydacyjnych i proteolitycznych nie jest wystarczająco wydajne dochodzi do kumulacji utlenionych produktów białkowych [134]. Modyfikacja białek (agregacja, denaturacja) zachodząca pod wpływem reaktywnych form tlenu odgrywa istotną rolę w wielu niekorzystnych procesach biologicznych, jak na przykład peroksydacja lipidów. Poprzez kaskadowe utlenianie obecnych w lipidach nienasyconych kwasów tłuszczowych powstaje wiele nadtlenków, które stanowią

ciągłą dostawę nowych wolnych rodników inicjujących kolejne reakcje peroksydacji [125]. Zintensyfikowany i długo utrzymujący się stres oksydacyjny jest bardzo szkodliwy dla komórek i może być przyczyną nieodwracalnych zmian w strukturze ważnych biologicznie makromolekuł, takich jak cukry, białka oraz DNA. Wolne rodniki mogą niszczyć praktycznie wszystkie występujące w organizmie biomolekuły oraz uczestniczyć w transporcie sygnału, migracji lub proliferacji komórek [126,135]. Takie procesy powodują najpierw zaburzenia w metabolizmie komórki (mogą prowadzić do przedwczesnej aktywacji szlaków apoptotycznych i stymulacji śmierci komórki), co z kolei prowadzić może do licznych degeneracyjnych zmian w tkankach, które przejawiają się nieprawidłową funkcją narządów i ostatecznie - całego organizmu. Patofizjologiczne zmiany w tkankach oraz narządach stanowią przyczynę wielu chorób, a w skrajnych przypadkach doprowadzają do śmierci organizmu [136].

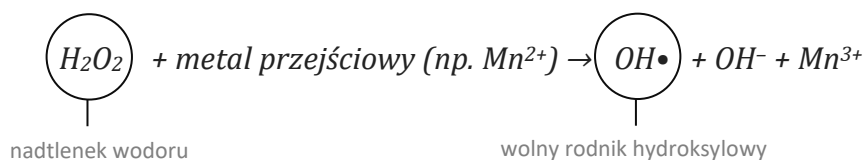
## **8.2. Uszkodzenia DNA**

Zarówno stres oksydacyjny jak i genotoksyczność uważane są za podstawowe mechanizmy toksyczności cząsteczek w skali nanometrycznej [137]. Mechanizm uszkodzenia materiału genetycznego powodowanego przez nanocząsteczki wciąż jeszcze nie jest do końca dobrze poznany. Przyjmuje się, że uszkodzenie DNA może być indukowane na drodze pierwotnej bądź wtórnej. Genotoksyczność pierwotna polega na bezpośrednim oddziaływaniu nanocząsteczki z materiałem genetycznym, natomiast wtórna to atakowanie i niszczenie DNA w wyniku nasilonego stresu oksydacyjnego [138]. Znane z literatury następstwa uszkodzeń DNA u podłoża których leży stres oksydacyjny to, oprócz mutacji strukturalnych cząsteczki DNA, również liczne mutacje genów cyklu komórkowego oraz dysfunkcja wewnątrzkomórkowych szlaków przekazywania informacji [139]. Wskutek reakcji kwasów nukleinowych z RFT dochodzi do pęknięcia nici DNA (pęknięcia pojedyncze lub podwójne) oraz przegrupowania sekwencji zasad. DNA uszkodzony przez ROS jest silnie immunogenny [138]. Wolne rodniki mogą stymulować aktywność endonukleaz, a to skutkuje fragmentacją nici DNA. Opisano już przypadek mutacji genu p-53 czyli genu supresji nowotworów [140]. Mutacja była spowodowana wolnymi rodnikami zawartymi w składnikach dymu tytoniowego i przyczyniała się do raka płuc. Podobna mutacja była obserwowana

w genomie chorych na raka jelita grubego oraz skóry, gdzie wolne rodniki indukowane zostały promieniowaniem ultrafioletowym [141].

### **8.2.1. Mechanizm genotoksyczności pierwotnej**

Jak wykazują badania, najmniejsze nanocząsteczki (do 10 nm) są zdolne przedostać się przez błonę jądrową na drodze dyfuzji bądź poprzez liczne kompleksy porów jądrowych i oddziaływać bezpośrednio z DNA. Większe (do 60 nm), dostają się do wnętrza jądra komórkowego podczas podziałów komórkowych (mitozy), kiedy błona jądrowa zanika. Wewnątrz jądra komórkowego znalezione zostały agregaty nanocząsteczek ZnO rzędu 285 nm [142]. Obecność tak dużych cząstek jest w stanie doprowadzić do zdeformowania jądra za pośrednictwem powstających w cytoplazmie pęcherzyków komórkowych. Takie odkształcenia wpływają ujemnie na podziały komórkowe [138]. Dane literaturowe pokazują również, że nanozwiązki, aby indukować toksyczność, nie muszą wcale znajdować się w bezpośrednim kontakcie z DNA ale mogą wchodzić w interakcje z białkami jądrowymi, które biorą udział w replikacji, transkrypcji oraz naprawach uszkodzonego materiału genetycznego. Takie interakcje z białkami zostały udowodnione na przykładzie cząsteczki fulerenu C<sub>60</sub>, który jest zdolny do wiązania się z topoisomerezą DNA lub białkami szlaku naprawy DNA [27,143]. Ważne jest również, że nanozwiązki, zaburzając punkty kontrolne cyklu komórkowego i działając na kinazę białek, destabilizują replikację DNA. Istotnym procesem jest też sama inaktywacja kinaz. Obserwuje się także oddziaływanie nanocząsteczek z aparatem mitotycznym a długotrwała ekspozycja może prowadzić do nieprawidłowej segregacji chromosomów w komórkach potomnych [144]. Jak już wspomniano wcześniej, nanocząsteczki mogą przyczyniać się do generacji ROS w komórkach, które mogą wchodzić w interakcje z licznymi biomolekułami komórkowymi, w tym z DNA. Taki stres oksydacyjny jest przyczyną na przykład uszkodzeń jąderka [110,145]. Jony uwolnione ze zdyspergowanych w roztworach nanocząsteczek, zwykle jony metali przejściowych (na przykład Fe<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cr<sup>5+</sup> i Ni<sup>2+</sup>) mogą przyczyniać się do tworzenia wewnątrzkomórkowych ROS w reakcji Fentona [146]:



Oddziaływanie nanocząsteczek z organelami komórkowymi, na przykład z błoną mitochondrium, również może indukować silny stres prowadzący do produkcji wolnych rodników tlenowych. Zaburzenia w mitochondrium powodują rozregulowanie łańcucha oddechowego, przerwania syntezy ATP a w konsekwencji uszkodzenia kwasu deoksyrybonukleinowego [147]. Ponadto nanocząsteczki mają zdolność hamowania aktywności związków przeciwutleniających w komórce oraz mogą wpływać na szlaki enzymatycznej obrony antyoksydacyjnej, chociażby poprzez wygaszenie aktywności dysmutazy ponadtlenkowej lub reduktazy glutationowej [145].

### 8.2.2. Mechanizm genotoksyczności wtórnej

Istnieją obecnie pewne hipotezy, które zakładają, iż nanocząsteczki mogą aktywować komórki fagocytyjające przyczyniając się do rozwoju stanu zapalnego. Rozwinięta reakcja zapalna przyczynia się do nadprodukcji wolnych rodników generujących wybuchy tlenowe, które inicjują reakcje oksydacyjne materiału genetycznego [148]. Uszkodzenia DNA mogą być również wynikiem połączenia łańcucha zdarzeń mechanizmów pierwotnych i wtórnych wynikających z narażenia na ksenobiotyk. Nanocząstki uszkadzając DNA przyczyniają się do zwiększenia fotogenotoksyczności. Promieniowanie UVA promuje szybką produkcję ROS uszkadzających mitochondria oraz limfocyty, a to uruchamia reakcję zapalną, apoptozę i uszkodzenia nici DNA. Co więcej, gdy zajdzie już taka reakcja, postępuje ona niezależnie od obecności nanocząsteczek w organizmie i kolejna taka kaskada jest już stymulowana tylko obecnością światła [149,150].

Ponieważ integralność genomu jest bardzo ważna, komórki wytworzyły wiele specjalnych mechanizmów naprawczych, które chronią go przed utratą prawidłowej informacji genetycznej. Dzięki temu większość uszkodzeń może zostać naprawiona bez szkody dla organizmu [126]. Czasem jednak zdarza się, że pewne uszkodzenia podczas procesu naprawy są pomijane. Taka sytuacja ma miejsce w kilku przypadkach. Jednym z nich mogą być rozległe uszkodzenia DNA i nie dość skuteczne mechanizmy naprawcze. W drugim przypadku uszkodzenia

mogą zostać nierozpoznane przez właściwe mechanizmy. Inną prawdopodobną wersją wydarzeń jest zmiana pewnych funkcji enzymów naprawczych przez nanocząsteczki. Wadliwy mechanizm naprawy prowadzi do licznych mutacji będących konsekwencją nieprawidłowej replikacji DNA. Mutacje w rejonach genów kodujących prowadzą do licznych błędów w ekspresji tychże genów i do powstawania wadliwych białek. Nagromadzone w ten sposób mutacje mogą w efekcie prowadzić do śmierci komórek albo ich transformacji w komórki nowotworowe [138,145].

### 8.2.3. Metody oceny i identyfikacji uszkodzeń DNA

Istnieje wiele metod oceny stopnia uszkodzenia materiału genetycznego przez czynnik genotoksyczny. Odpowiednie techniki można przeprowadzić zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* a ich dobór jest zależny od przypuszczalnego mechanizmu genotoksyczności oraz badanego materiału. Techniki *in vitro* są odpowiednie jako testy podstawowe i raczej są wykorzystywane w celu oceny uszkodzeń DNA, które powstały w efekcie genotoksyczności pierwotnej. Do tego typu badań zalicza się test Ames, który pozwala w prosty sposób odpowiedzieć na pytanie, czy dany czynnik ma potencjał do wywołania mutacji [151]. Testy *in vivo* są właściwe przy ocenie ilościowej i jakościowej zmian w genomie oraz towarzyszących temu efektów ubocznych, takich jak na przykład rozwijający się stan zapalny lub postępująca śmierć komórek [152]. Popularnymi metodami tego typu są: test kometowy (ang. comet assay), metoda TUNEL, test mikrojądrowy, test aberracji chromosomowych lub metoda FISH (ang. fluorescent in situ hybridization). Niekiedy w badaniach stosuje się różne kombinacje tych metod [138,153–155].

## 9. Modele badań toksykologicznych - badania *in vitro* oraz *in vivo*

Zaplanowanie i przeprowadzenie interdyscyplinarnych, szczegółowych badań jest kluczowe w poznaniu krótko i długoterminowej toksyczności nanocząsteczek. Jak wspomniano wcześniej, zachowanie nanocząsteczek w organizmie wielokomórkowym jest trudne do przewidzenia a mechanizm toksyczności może mieć bardzo skomplikowany przebieg. W literaturze odnaleźć można całkiem sporo informacji na temat cytotoxyczności tlenku grafenu. W większości są to badania, które przeprowadzono w ostatnich latach. Tlenek grafenu jest

atrakcyjnym obiektem badań, ponieważ ulega dyspersji w roztworze wodnym i wykazuje wiele możliwości modyfikacji, które czynią go stabilnym w buforach fizjologicznych [40]. Jednakże wyniki tych badań są dwoiste, gdyż sugerują jednocześnie dużą biokompatybilność tej nanocząsteczki jak i również dużą jej szkodliwość [138]. Warto zwrócić uwagę na fakt, że znaczna część eksperymentów przeprowadzana jest w warunkach *in vitro*, czyli z użyciem specjalnie wyhodowanych/wyselekcjonowanych linii komórkowych, które traktowane są odpowiednimi dawkami substancji w ściśle kontrolowanych warunkach. Należy zatem pamiętać, że badanie odbywa się poza organizmem i nie pozwala poznać skomplikowanych mechanizmów odpowiedzi fizjologicznej na daną substancję na poziomie całego organizmu. Oczywiście badania tego typu mają wiele zalet. Przede wszystkim pozwalają w szybki sposób dokonać analizy jakościowej i ilościowej komórek bezpośrednio po kontakcie z nanocząsteczką [116]. Ponadto, nie wymagają one poświęcenia życia zwierząt, co jest ważne ze względów etycznych.

W eksperymentach *in vivo* substancja wprowadzana jest do organizmu wziewnie, przez skórę, przewód pokarmowy lub wstrzyknięcie. Symuluje to potencjalny kontakt z ksenobiotykiem w środowisku. Losy nanocząsteczki w ustroju mogą być śledzone za pomocą różnych technik (na przykład fluorescencyjnych), zatem w pewnych przypadkach możliwe jest określenie ich fizjologicznego stężenia lub akumulacji w określonych tkankach/narządach. Możliwa jest również ocena szybkości metabolizmu i wydalania aplikowanej substancji [156]. Zespół Wanga oceniał wpływ tlenku grafenu na komórki ludzkiego naskórka (*in vitro*) i myszy (*in vivo*). Zarówno badania *in vitro* jak i *in vivo* potwierdziły wzrost cytotoksyczności wodnej dyspersji GO wraz ze wzrostem jego stężenia. Ludzkie fibroblasty traktowane tlenkiem grafenu o najwyższej koncentracji (50 mg/mL) wykazywały nasiloną apoptozę oraz uszkodzenia organelli. Wyniki eksperymentu *in vivo* pokazały, że GO wstrzykiwane myszom przyczynia się do zwiększenia ich śmiertelności oraz wytworzenia ziarniaka płuc. Ponadto tlenek grafenu ulegał akumulacji w płucach, wątrobie, śledzionie oraz nerkach, z których nie był usuwany [157]. Co ważne, dawka wysoce toksyczna w warunkach *in vivo* była kilka rzędów niższa niż w warunkach *in vitro*. Dlatego aby ustalić wszystkie charakterystyczne cechy toksyczności

nanocząsteczek niezbędne jest kompleksowe przeprowadzenie badań *in vitro* oraz *in vivo*. Niestety możliwość wykonania obu eksperymentów jednocześnie jest często utrudniona wieloma ograniczeniami, nie tylko technicznymi ale także etycznymi i finansowymi.

### **9.1. Ocena skutków toksyczności GO na różnych poziomach organizacji biologicznej**

Określenie potencjalnych zagrożeń nowych substancji dla organizmów na wczesnym etapie rozwoju technologicznego jest bardzo istotne [137,158]. Tlenek grafenu jest nowym nanomateriałem, dlatego mechanizm jego szkodliwości w wielu aspektach pozostaje jeszcze zagadką. Ze względu na rosnące zainteresowanie nanotechnologią, badacze postulują zwrócenie większej uwagi na potencjalny wpływ grafenu i jego pochodnych na środowisko [91]. Wciąż niewiele wiadomo o skutkach długotrwałego narażenia na GO a dane epidemiologiczne nie są jeszcze dostępne. Najważniejszym, globalnym problemem wydaje się być wniknięcie nanocząsteczek do ekosystemu oraz ich akumulacja w łańcuchach troficznych [73,91,124]. Przegląd literatury pokazuje, że toksykolodzy i ekotoksykolodzy podejmują nieśmiało próby oceny stopnia toksyczności tlenku grafenu zarówno w badaniach *in vitro* jak i *in vivo*. Wykorzystuje się do tego celu kilka rodzajów bakterii, komórek ssaków oraz modeli zwierzęcych [159]. Podejrzewa się, że pierwszy toksyczny efekt wprowadzenia tlenku grafenu do środowiska może być zaobserwowany w populacjach mikroorganizmów żyjących w wodzie lub glebie (bakterie, algi), które znajdują się w dolnej części łańcucha pokarmowego i są zjadane na przykład przez bezkręgowce. Pretti i wsp. testowali wpływ płatków grafenu na zielenicę (*Dunaliella tertiolecta*) powszechną w wodach morskich oraz na skorupiaki *Artemia salina*. Obrazy mikroskopowe pokazały, że po 72 h ekspozycji na nanocząsteczki, *D. tertiolecta* cechowała się utratą wici oraz obrzękiem komórki spowodowanym mechanicznymi uszkodzeniami ściany komórkowej. Z powodu ostrych krawędzi tlenek grafenu również mechanicznie uszkadzał błonę komórkową u *Staphylococcus aureus* [105]. W przypadku *A. salina* odnotowano wzrost biomarkerów stresu oksydacyjnego a także liczne uszkodzenia oksydacyjne [160]. Niekorzystny wpływ GO, objawiający się

wzrostem aktywności enzymów antyoksydacyjnych (lub też ich hamowaniem) zaobserwowano także w badaniach na pierwotniakach *Euglena gracilis* [95]. Bardzo ciekawych wniosków dostarczyła obserwacja kolonii mikroorganizmów obecnych w wodach ściekowych. Wskutek wzrostu stężenia GO ich aktywność malała. W konsekwencji zauważono pogorszenie się jakości ścieków, zwiększenie mętności i obniżoną biodegradację osadów. Penetracja i akumulacja GO w osadzie doprowadziła do powstania zalegających agregatów [7]. Toksyczność GO, zależną od dawki oraz czasu ekspozycji, potwierdza również spadek aktywności słodkowodnych skorupiaków *Amphibalanus amphitrite*. Po 72 h narażenia na GO w stężeniu 0,75 mg/mL zmniejszyła się ich ruchliwość oraz zwiększyła śmiertelność [161].

Negatywny wpływ tlenku grafenu na organizmy roślinne, żyjące w warunkach lądowych także został potwierdzony wieloma badaniami. Begum i wsp. ocenili wpływ zdyspergowanego w wodzie GO na rośliny uprawne takie jak szpinak, kapusta czerwona i pomidory. Po 20 dniowej ekspozycji na nanocząstki w glebie zaobserwowano zależne od dawki negatywne skutki jego działania w postaci nekrozy liści i nasilonego stresu oksydacyjnego. Ten sam zespół śledził za pomocą mikroskopu skaningowego (SEM) efekty narażenia na GO na modelowym gatunku *Arabidopsis thaliana*. Tlenek grafenu zaaplikowany został w stężeniu od 0-80 mg/L. Wykazano liczne zmiany cytologiczne u tej rośliny, takie jak fragmentacja jąder, uszkodzenia błony komórkowej czy dysfunkcja mitochondriów, które nasilały się wraz ze wzrostem stężenia GO. Potwierdzono również, że reaktywne formy tlenu są kluczowymi mediatorami w szlaku sygnalizacyjnym śmierci komórki [162,163]. Obecność tlenku grafenu hamuje także rozwój grzybnia *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus Niger* oraz *Fusarium oxysporum*. Szkodliwe oddziaływanie nanocząsteczek, w tym tlenku grafenu, na niepatogenne mikroorganizmy, takie jak *Aspergillus oryzae* może być ważnym problemem dla środowiska [164]. Z drugiej strony warto dodać, że tlenek grafenu otrzymany metodą Hummers'a w warunkach *in vitro* wykazuje działanie antybakteryjne, które może być korzystne. Dowiedziono, że płatki grafenowe (300-600 nm) działają zabójczo na *Xanthomonas oryzae*. Fitopatogenną bakterie, która atakuje zboża [165].



Wiele badań dotyczących wpływu nanocząsteczek na organizmy wodne oraz lądowe opartych jest o modele zwierzęce. Zespół Zhanga w badaniach *in vivo* ocenił, że tlenek grafenu ulega bardzo dobrej biodystrybucji w ciele nicieni *Caenorhabditis elegans* ale nie powoduje negatywnych skutków ubocznych. Co ciekawe, naukowcy nie odnotowali uszkodzeń tkanek, zmian w żywotności czy ruchliwości tych bezkręgowców. Naukowcy ci pokazali, że GO, działając pośrednio, znacznie osłabia tolerancję tych bezkręgowców na pestycydy obecne w glebie [166].

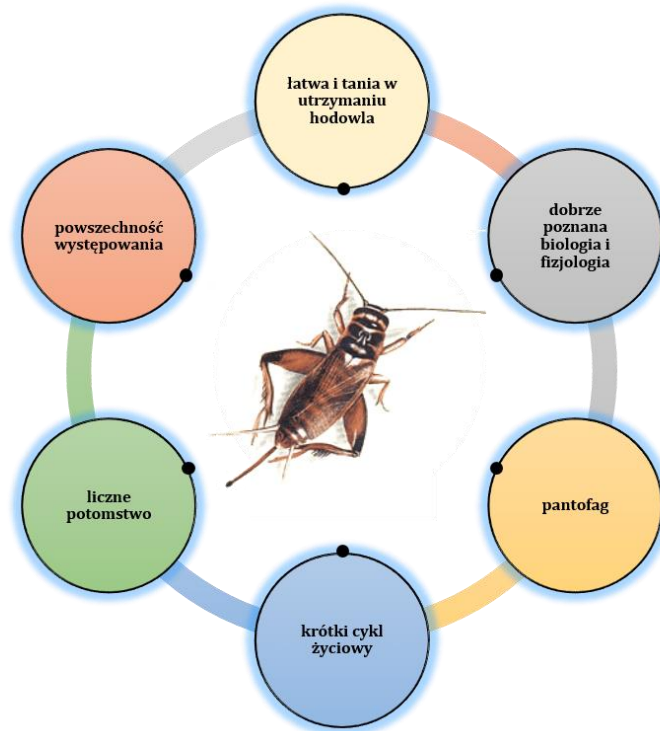
Ocena toksyczności nanomateriałów z użyciem wyższych organizmów wykorzystywana jest głównie w badaniach przedklinicznych i klinicznych. Testy tego typu są niezbędne przed wprowadzeniem nanocząsteczek do produktów komercyjnych. Popularnym organizmem w badaniach *in vivo* jest danio pręgowane (*Danio rerio*), słodkowodna, drobna ryba z rodziny karpiowatych. *Danio* jest chętnie używany w ocenie toksyczności nanomateriałów, ponieważ wykazuje bliską homologię z ludzkim genomem. Ponadto, zarodki *D. rerio* są bardziej wrażliwe na działanie czynników chemicznych w porównaniu z osobnikami dorosłymi [167]. Korzystając z zarodków *Danio* zbadano toksyczność funkcjonalizowanego (kwasem mlekowym i fluoresceiną) tlenku grafenu podanego poprzez iniekcję. Autorzy nie zaobserwowali znaczących zmian w przeżywalności zarodków pomimo faktu, że nanocząsteczki uległy dobrej biodystrybucji w ciele ryb [168]. Podobne badanie przeprowadzono używając grafenu sfunkcjonalizowanego PEG, kurkumą i doksorubicyną (DOX). Kompleksy nanocząsteczki cechowały się brakiem toksyczności w zakresie rozwoju zarodków *D. rerio*. Biogodność prawdopodobnie była spowodowana powleczeniem powierzchni nanocząsteczki PEG, który, jak wspomniano wcześniej, wpływa dodatnio na jej właściwości i zmniejsza szkodliwość [169]. Brak szkodliwości tlenku grafenu z PEG odnotowano także w badaniach na myszach. Po podaniu doustnym nanocząsteczki były w ograniczonym stopniu wchłaniane w układzie pokarmowym a następnie były wydalane. Natomiast po podaniu dożylnym wykazały doskonałą biodystrybucję oraz charakterystyczne dla związków grafenu odkładanie się w narządach, głównie wątrobie i śledzionie [170]. Funkcjonalizacja powierzchni GO grupami aminowymi wykazywała mniejszą biogodność i przyczyniała się do powstania licznych zakrzepów w płucach myszy po aplikacji

dożylniej [171]. Toksyczność płucna jest ważnym problemem z punktu widzenia rozwoju przemysłu i ryzyka wdychania zanieczyszczonego powietrza. Długoterminowy kontakt z nanocząsteczkami może doprowadzić do licznych uszkodzeń narządów oraz chorób. Wykazano, że tlenek grafenu przyswajany wziewnie akumuluje się w płucach i jest przyczyną zatorów. Znaczące zmiany patologiczne w postaci nacieków zapalnych, obrzęku płuc oraz formowania się ziarniniaków stwierdzono po podaniu tlenku grafenu w dawce  $10\text{mg kg}^{-1}$  masy ciała zarówno myszom jak i szczurom [15].

Analiza przytoczonych danych zawiera poukazywaną dawkę informacji dotyczących oceny toksyczności tlenku grafenu. Pomimo znacznej liczby badań (*in vitro* oraz *in vivo*) na różnych modelach roślinnych i zwierzęcych, naukowcy nadal nie są w stanie przewidzieć potencjalnych zagrożeń nanotechnologii dla człowieka [73]. W celu zdobycia dodatkowych danych wykonywane są równocześnie eksperymenty *in vitro* na tkankach ludzkich, na przykład fibroblastach, komórkach płuc lub rozmaitych komórkach zmienionych nowotworowo [76,96,116,172]. Wiele informacji wymaga jeszcze uzupełnienia. Należy pamiętać, aby w ocenie biologicznego wpływu związków powstałych na bazie grafenu bezwzględnie unikać uogólniania informacji, a także stale mieć na uwadze ich właściwości fizykochemiczne oraz bogate możliwości funkcjonalizacji.

## **10. *Acheta domesticus* w badaniach toksykologicznych**

Postępowanie w ocenie ryzyka ekologicznego jakie niesie za sobą nanotechnologia jest bardzo złożone. Wymaga opracowania wielu metod badawczych oraz doboru szeregu różnych wskaźników narażenia na oceniany ksenobiotyk. Niezwykle istotny jest trafny wybór obiektu do eksperymentu, który umożliwi jakościową i ilościową weryfikację biochemicznych, fizjologicznych i histologicznych biomarkerów ekspozycji na nanocząsteczki [173]. Znanych jest bardzo wiele organizmów modelowych, a każdy z nich posiada inne walory predysponujące go do wykorzystania w eksperymentach naukowych. Powszechnymi organizmami w badaniach podstawowych z zakresu biologii molekularnej, rozwoju, fizjologii i ekologii są owady [124,174].



Rysunek 18. Cechy organizmu modelowego na przykładzie *Acheta domesticus* (rys. własny).

Ostateczny wybór gatunku owada podyktowany jest jego cechami biologicznymi, które zmniejszają prawdopodobieństwo błędnej interpretacji wyników (Rys. 18) [173].

***Acheta domesticus*, Fabricius, 1775 (Gryllidae, Orthoptera, Insecta)** to polifagiczny, szeroko rozpowszechniony w przyrodzie gatunek świerszcza. Jest owadem synantropijnym, dlatego doskonale sprawdza się jako organizm wskaźnikowy w rozmaitych badaniach stopnia zanieczyszczenia środowiska [175,176]. Cechuje się krótkim cyklem życiowym (około 3-4 miesiące) i dużą płodnością, co czyni go atrakcyjnym w ocenie wielopokoleniowego wpływu ksenobiotyków na organizm oraz umożliwia wykonanie wielu powtórzeń eksperymentu. Postać dorosła *A. domesticus* osiąga rozmiary w przedziale około 15 – 25 mm [177]. Taka wielkość umożliwia pozyskanie odpowiedniej ilości materiału do badań oraz wykonania drobnych zabiegów chirurgicznych, jak na przykład preparacja tkanek, iniekcja lub wszczepianie elektrod. Warto nadmienić, że w warunkach laboratoryjnych owad ten nie jest kłopotliwy w hodowli a jego użycie w eksperymentach nie wymaga akceptacji ze strony komisji etycznej, dlatego jest chętnie wykorzystywany w rozmaitych testach, zanim zaprojektowane zostaną badania na ssakach.

## II. CELE BADAŃ I HIPOTEZY BADAWCZE

### 11. Uzasadnienie tematu badań oraz cele badawcze

Bezpośrednim powodem podjęcia badań opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej jest fragmentaryczny stan wiedzy o biogodności tlenku grafenu oraz jego, jak dotąd, nie dość dobrze określone oddziaływanie na bezkręgowce, zwłaszcza te zamieszkujące środowisko naturalne. Przedmiotem badań jest ocena krótko- oraz długoterminowej toksyczności *in vivo* tlenku grafenu na owada z gatunku *Acheta domestica*.

Prezentowane w dysertacji wyniki badań są efektem realizacji celów badawczych, które realizowano w trzech różnych modelach eksperymentalnych:

**MODEL I. Cel główny:** Określenie stopnia nasilenia wybranych wskaźników odpowiedzi antyoksydacyjnej u *A. domestica* wskutek krótkoterminowego narażenia na czysty chemicznie tlenek grafenu (GO) oraz zanieczyszczony w wyniku syntezy jonami manganu (GO+Mn<sup>2+</sup>). Nanocząsteczki podano poprzez iniekcję bezpośrednio do jamy ciała owada.

#### **Cele szczegółowe:**

- Sprawdzenie czy nanocząsteczki tlenku grafenu (GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>), podane iniekcyjnie bezpośrednio do jamy ciała *A. domestica* (w dawce 0,1 µL na 100 mg masy ciała) aktywują mechanizmy obrony antyoksydacyjnej.
- Określenie jak poziom aktywności parametrów stresu oksydacyjnego (całkowitej pojemności antyoksydacyjnej - TAC, katalazy - CAT, peroksydazy glutationowej - GPx) oraz poziom białek szoku cieplnego HSP 70 zmieniają się w czasie 72 godzin od iniekcji. Sprawdzenie, czy forma podania nanocząsteczek (iniekcja) wpływa na wartość parametrów stresu oksydacyjnego.
- Określenie, czy stopień toksyczności (GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>) jest zależny od budowy chemicznej tych związków i czy intensyfikuje się wraz z obecnością jonów manganu w składzie.

**MODEL II. Cel główny:** Określenie stopnia nasilenia stresu oksydacyjnego, analiza uszkodzeń komórkowych oraz zmian histologicznych u *A. domestica* wskutek

krótkoterminowego narażenia na obecność tlenku grafenu (GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>) w pokarmie.

***Cele szczegółowe:***

- Sprawdzenie czy podanie owadom GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> wraz z pożywieniem (200 µg · g<sup>-1</sup> pokarmu) przez okres 10 dni doprowadzi do intensyfikacji mechanizmów obrony antyoksydacyjnej, zaburzeń w fizjologii komórek oraz zmian w strukturze tkanki jelita, które znajduje się w bezpośrednim kontakcie z nanocząstkami.
- Określenie czy nanocząsteczki tlenku grafenu cechują się genotoksycznością względem DNA *A. domesticus*.
- Zbadanie, w sposób pośredni, czy tlenek grafenu ulega biodystrybucji i przyczynia się do zmniejszenia żywotności/ śmierci komórek oraz zmian histologicznych w strukturze męskich gonad.
- Sprawdzenie czy obecność jonów manganu w składzie tlenku grafenu ma wpływ na poziom cytotoxyczości/ genotoksyczości tego nanomateriału. Określenie dynamiki zmian parametrów cytotoxyczości/ genotoksyczości tlenku grafenu w czasie 10 dni eksperymentu.

**MODEL III. Cel główny:** Określenie wpływu długoterminowej ekspozycji na nanocząsteczki tlenku grafenu (GO) w kontekście dwupokoleniowych zmian komórkowych oraz potencjału reprodukcyjnego badanych owadów. Nanocząsteczki podano w dwóch różnych stężeniach wraz z pokarmem, przez cały cykl życiowy *A. domesticus* - w dwóch następujących po sobie pokoleniach.

***Cele szczegółowe:***

- Ustalenie czy długoterminowa ekspozycja na tlenek grafenu (GO) w dwóch stężeniach (20 oraz 200 µg · g<sup>-1</sup>) w pokarmie wpływa negatywnie na zdolności reprodukcyjne owadów względem grupy kontrolnej.
- Określenie czy tlenek grafenu wpływa na morfologię oraz ilość jaj składanych przez samice.

- Zbadanie czy przewlekłe narażenie na GO może powodować negatywne konsekwencje w drugim pokoleniu owadów, przejawiające się uszkodzeniami komórek oraz zmniejszeniem przeżywalności młodych osobników.
- Sprawdzenie czy istnieje zależność między toksycznością tlenku grafenu a jego stężeniem w pokarmie.

### 11.1. Hipotezy badawcze

Do nadmienionych celów badawczych wysunięto szczegółowe hipotezy, które zweryfikowano realizując zaplanowane eksperymenty:

#### **MODEL I:**

**H1,0:** Iniekcyjne podanie GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> w dawce 0,1 μL na 100 mg masy ciała owada nie spowoduje nasilenia stresu oksydacyjnego u badanej grupy owadów. Odpowiedź enzymów antyoksydacyjnych nie pozostaje w związku z nasileniem stresu oksydacyjnego, który nie leży u podłoża toksyczności GO. Ewentualny wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych w pierwszej dobie od aplikacji może być spowodowany czynnikiem stresowym jakim jest sama iniekcja.

**H1,1:** Zarówno GO jak i GO+Mn<sup>2+</sup> spowoduje znaczące nasilenie stresu oksydacyjnego, co przejawia się wzrostem wartości badanych parametrów. Nanocząstki ulegną biodystrybucji w organizmie prowadząc do zmian degeneracyjnych. Poziom ocenianych enzymów antyoksydacyjnych ulegnie podwyższeniu w grupach narażonych już w pierwszej dobie od podania i będzie wykazywał tendencję wzrostową lub będzie utrzymywał się na stałym, relatywnie wysokim poziomie aż do zakończenia eksperymentu.

**H1,2:** Wzrost parametrów stresu oksydacyjnego nasili się jedynie w grupie owadów traktowanych tlenkiem grafenu poprodukcyjnie zanieczyszczonym jonami manganu GO+Mn<sup>2+</sup>. Nieprecyzyjnie przeprowadzona technika otrzymywania GO i kompleksowanie struktury jonami manganu nasilił potencjał oksydacyjny tego związku.

**H1,3:** Generowanie wolnych rodników w ciele owadów będzie indukowane jedynie przez czysty chemicznie tlenek grafenu (GO), który na skutek obecności wielu tlenowych grup funkcyjnych doprowadzi do zapoczątkowania reakcji rodnikowych w organizmie. Podanie czystego GO i jego biodystrybucja spowodują

wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych w czasie u owadów narażonych względem grupy referencyjnej.

### **MODEL II:**

**H2,0:** Podanie owadom GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> wraz z pożywieniem przez okres 10 dni (200 µg · g<sup>-1</sup> pokarmu) nie spowoduje znaczących zmian degeneracyjnych w organizmie owadów. Będzie się to objawiało niezmienną, względem grupy kontrolnej, strukturą tkanki jelita, niskim poziomem uszkodzeń DNA a także zbliżoną do grupy kontrolnej aktywnością enzymów antyoksydacyjnych. Również męskie gonady nie zostaną uszkodzone, co prawdopodobnie będzie mogło miało związek z ograniczoną dystrybucją nanocząsteczek w organizmie.

**H2,1:** GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> spożywane przez owady zadziałają podobnie, powodując znaczny wzrost aktywności parametrów stresu, poważne zmiany degeneracyjne w jelicie oraz wysoki procent uszkodzeń materiału genetycznego. Nanocząsteczki ulegną szybkiej biodystrybucji w organizmie powodując liczne zmiany histologiczne w tkance męskich gonad.

**H2,2:** W obu grupach owadów intoksykowanych tlenkiem grafenu odnotuje się znaczne zmiany histologiczne jelita, jako tkanki bezpośrednio narażonej na uszkodzenia mechaniczne spowodowane nanocząsteczkami. W konsekwencji wzrosną uszkodzenia DNA oraz parametry stresu oksydacyjnego. Jednakże tlenek grafenu nie zostanie rozprowadzony po organizmie lub, na drodze enzymatycznej, zostanie zredukowany (ulegnie dezaktywacji) i nie spowoduje uszkodzeń struktury gonad.

**H2,3:** Tylko jeden typ spożywanych nanocząsteczek (GO lub GO+Mn<sup>2+</sup>) zainicjuje wzrost stresu oksydacyjnego w organizmie owadów i/ lub wzrost uszkodzeń DNA i/ lub zmiany histologiczne struktury jelita i/ lub struktury męskich narządów rozrodczych względem grupy kontrolnej. Wyjaśnienia takiego rezultatu należy upatrywać w różnicach związanych z synergistycznym/ antagonistycznym oddziaływaniem jonów Mn<sup>2+</sup> z nanocząstkami.

### **MODEL III:**

**H3,0:** Podaż osobnikom świerszcza domowego czystego chemicznie tlenku grafenu (GO) w stężeniach 20 oraz 200 µg · g<sup>-1</sup> pokarmu przez cały cykl życiowy

nie wpłynie ujemnie na procesy rozrodcze badanego gatunku. GO będzie miał bardzo ograniczoną zdolność przenikania do struktur rozrodczych i/ lub uruchomione zostaną mechanizmy kompensacyjne w ciele matki, znoszące efekty nasilonego stresu oksydacyjnego. Zmiany histologiczne w gonadach będą obecne w niewielkim stopniu, jako następstwo uszkodzeń mechanicznych, ale reprodukcja owadów narażonych na działanie nanocząsteczek nie będzie znacząco niższa w porównaniu z grupą kontrolną.

**H3,1:** Na skutek znacznych uszkodzeń histologicznych narządów rozrodczych oraz podwyższonego poziomu stresu oksydacyjnego w obu badanych grupach zaobserwuje się znaczny spadek ilości składanych jaj przez samice oraz związany z tym niski odsetek kłujących się młodych osobników. Efektywność rozrodu owadów narażonych na GO będzie znacznie niższa w porównaniu z grupą kontrolną. Embriony nie będą rozwijały się prawidłowo lub/ i osobniki po wykluciu nie będą zdolne do przeżycia pierwszej doby.

**H3,2:** Tylko nanocząsteczki podawane w wyższym stężeniu ( $200 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  pokarmu) wpłyną ujemnie na zdolności reprodukcyjne *A. domesticus*. Niższa z zastosowanych dawek może zostać uznana za „bezpieczną” w kontekście reprodukcji badanego gatunku. W grupie otrzymującej pokarm zanieczyszczony GO w wyższym stężeniu samice będą składały mniej jaj lub/ i jaja będą składane w dużych ilościach ale odsetek kłujących się osobników będzie niski. Utrzymujący się stres oksydacyjny spowoduje zmniejszenie nakładów energetycznych przeznaczonych na rozmnażanie i produkcję pełnowartościowych jaj. Zaobserwowane zostaną zmiany w wyglądzie jaj, co może przemawiać za zdolnością tlenku grafenu do odkładania się w jajach i/ lub osłonkach jajowych (chorionach).



### III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

#### 12. MODEL I: Ocena wybranych wskaźników odpowiedzi antyoksydacyjnej u *Acheta domesticus* wskutek krótkoterminowego narażenia na tlenek grafenu podany iniekcyjnie

##### 12.1. Hodowla *Acheta domesticus*

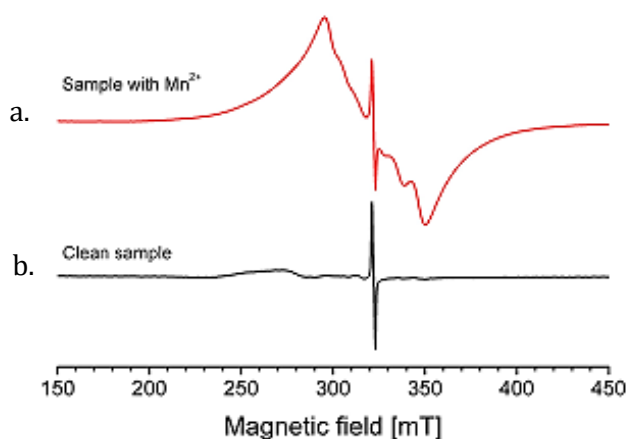
Owady użyte w eksperymencie pochodziły z hodowli laboratoryjnej Katedry Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Program hodowli jest prowadzony w Katedrze od 1988 roku a owady pochodzące z tej hodowli są wykorzystywane jako organizmy modelowe w projektach od wielu lat. Wybrane do doświadczenia osobniki *A. domesticus* były przetrzymywane w plastikowych insektariach o rozmiarach 15 cm x 20 cm w optymalnych dla tego gatunku, stale monitorowanych warunkach (temperatura:  $28,8 \pm 0,88$  °C; fotoperiod L:D 12:12, wilgotność: 20-45%). Przez cały czas trwania eksperymentu zwierzęta miały nieograniczony dostęp do schronienia, świeżej wody i pożywienia. Paszę owadów stanowił granulát (KanisanQ, Sano, Polska) zawierający białko i komponenty roślinne.

##### 12.2. Otrzymywanie i charakterystyka fizykochemiczna tlenku grafenu

Użyty w doświadczeniach tlenek grafenu został wyprodukowany z użyciem zmodyfikowanej metody Hummers'a, z płatków grafitowych (Lonza KS 5 - 75  $\mu\text{m}$ ). Manipulując techniką syntezy uzyskano dwa stopnie czystości tlenku grafenu. Aby oczyścić produkt z jonów manganu i otrzymać czysty chemicznie tlenek grafenu (GO), powstałą w reakcji zawiesinę wielokrotnie mieszano z dużą objętością 1,5% kwasu solnego a następnie płukano wodą w celu ustalenia neutralnego pH. Końcowy produkt filtrowano i suszono w eksykatorze. Powyższe procedury zostały wykonane w Instytucie Fizyki Politechniki Poznańskiej.

Jakościową i ilościową ocenę obecności manganu w obu próbkach wykonano za pomocą spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) w Instytucie Fizyki Molekularnej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Analiza próbki zanieczyszczonej wykazała dominujący sygnał pochodzący od jonów  $\text{Mn}^{2+}$  (Rys. 19). Założono, że jony manganu są osadzone na

powierzchni płatków GO w postaci związków kompleksowych  $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ , które są rozpuszczalne w wodzie i mogą swobodnie przechodzić do roztworów. Na tej podstawie, porównując otrzymany wynik z widmem próbki wzorcowej oszacowano zawartość jonów manganu na około 0,23% udziału masowego. W próbce czystego chemicznie tlenku grafenu udział tych jonów był około dwa rzędy mniejszy, dlatego, w analizie EPR, mogły one zostać wykryte tylko w niskich temperaturach (4,2 – 40 K). Stężenia molowe dla  $\text{Mn}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$  w próbkach określono na  $\sim 1.940 \cdot 10^{-2}$  %mol dla GO+ $\text{Mn}^{2+}$  oraz  $\sim 1.260 \cdot 10^{-4}$  %mol dla GO. Spektroskopia EPR została wykonana przy użyciu spektrometru X-band RADIOPAN SX z kriostatem umożliwiającym pomiary w temperaturze od 4,2 – 300 K [58].

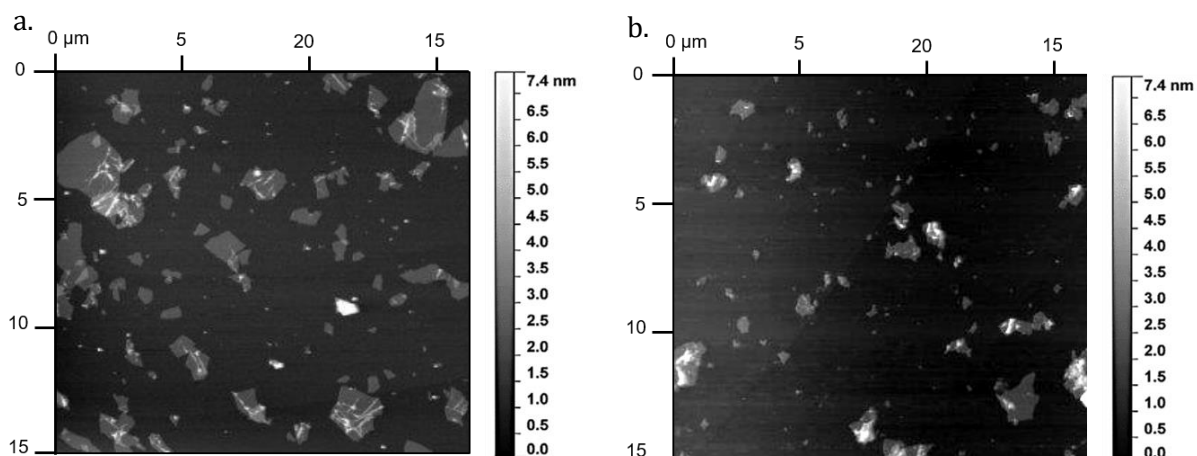


Rysunek 19. Widmo EPR (a) widmo GO+Mn<sup>2+</sup> (b) widmo GO.



Rysunek 20. Zdyspergowany tlenek grafenu

W celu uzyskania roztworów do iniekcji (Rys. 20), tlenek grafenu został zdyspergowany w roztworze do iniekcji (Fresenius-Kabi, Polska) i poddany pięciogodzinnej sonikacji homogenizatorem ultradźwiękowym (model UP-100H, DONSERV) a następnie dwugodzinnej kąpieli w myjce ultradźwiękowej (PROCLEAN, Ulsonix). Wielkość płatków GO oraz GO+ $\text{Mn}^{2+}$  w roztworze została oceniona przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM) (Agilent 5500 system, AC mode). Obrazowanie wykazało obecność wyłącznie jednowarstwowych płatków tlenku grafenu o wysokości około  $(1,04 \pm 0,05 \text{ nm})$  oraz dwie frakcje płatków o różnych wymiarach krawędzi bocznych (od kilku  $\mu\text{m}$  do kilkunastu nm) (Rys. 21).



**Rysunek 21.** Zdjęcia płatków tlenku grafenu wykonane techniką mikroskopii sił atomowych (AFM); (a) czysty tlenek grafenu GO (b) tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu GO+Mn<sup>2+</sup>. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015.

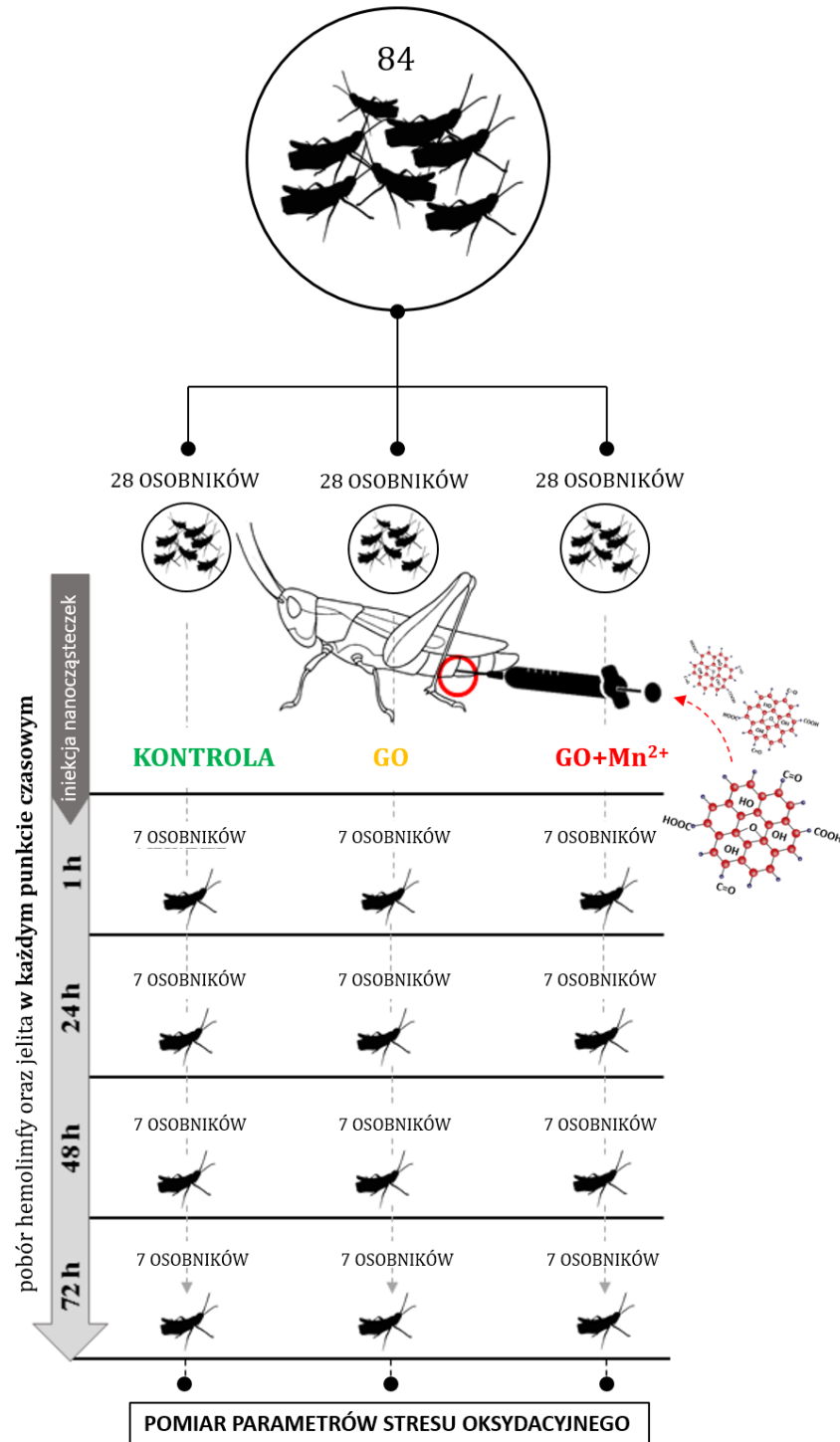
Proces syntezy tlenku grafenu oraz wspomniane analizy instrumentalne (EPR, AFM) zostały przeprowadzone w Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii w Poznaniu oraz Instytucie Fizyki Molekularnej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Sonikacja materiału została wykonana w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii.

### 12.3. Przebieg eksperymentu

W celu uzyskania jak najbardziej jednorodnej grupy do badań wyeliminowano samice ze względu na ich zmienną gospodarkę hormonalną związaną z cyklem rozrodczym oraz produkcję jaj. Do eksperymentu wyselekcjonowano 84 dorosłe samce *A. domesticus*. Zwierzęta zostały podzielone na trzy grupy eksperymentalne po 28 osobników w każdej: grupę kontrolną (K) i dwie grupy traktowane tlenkiem grafenu – o wysokim stopniu czystości oraz zanieczyszczonym jonami manganu (GO i GO+Mn<sup>2+</sup>). Przed aplikacją nanocząsteczek, owady zostały znieczulone dwutlenkiem węgla (CO<sub>2</sub>). Następnie, roztwory tlenku grafenu były wstrzykiwane do jamy ciała poprzez przebicie powłok ciała pomiędzy sternitami części brzusznej owadów z użyciem zestawu do iniekcji (Intraocular Injection Kit, World Precision Instruments). Osobnikom zaklasyfikowanym do grupy kontrolnej (K) podano wyłącznie obojętny roztwór do wstrzykiwań (Fresenius-Kabi, Polska).

Ustalenie optymalnej dawki nanocząsteczek polegało na przeprowadzeniu szeregu eksperymentów pilotażowych. Owadom aplikowano różne stężenia tlenku grafenu (od 1 do 0,4 mg · μL<sup>-1</sup>) monitorując ich przeżywalność oraz podstawowe parametry fizjologiczne po wstrzyknięciu. Podczas doboru stężenia

pod uwagę brana była także masa ciała i rozmiar owada. Wykazano, że najwyższa dawka przy której obserwuje się 100% przeżywalności osobników wynosi  $0,1 \mu\text{L}$  na  $100 \text{ mg}$  masy ciała przy stężeniu  $0,4 \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ . W konsekwencji wartości te zostały przyjęte w doświadczeniu.



Rysunek 22. Schemat eksperymentu I.

Ocenę aktywności enzymatycznej oraz ocenę poziomu białek stresu HSP 70 przeprowadzono w punktach czasowych – 1 h, 24 h, 48 h, 72 h po iniekcji. W każdym z tych punktów losowo wybrano siedem osobników i przygotowano materiał do oznaczeń (Rys. 22). Wszystkie oznaczenia biochemiczne zostały wykonane w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska (WBIOS) Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

#### 12.4. Przygotowanie próbek biologicznych do analizy biochemicznej

Owady unieruchomiono na lodzie, a następnie pobrano hemolimfę oraz przewód pokarmowy w całości. Homogenat do oznaczeń każdej z prób przygotowywano z tkanki uzyskanej z pojedynczego osobnika (łącznie 7 osobników na każdy punkt czasowy). Pobraną hemolimfę (40  $\mu$ L) zawieszono w buforze antykoagulacyjnym (NaOH, NaCl, Na<sub>2</sub>EDTA, kwas cytrynowy) w stosunku 1:1. Przewód pokarmowy oczyszczono w medium homogenizacyjnym z treści pokarmowej a następnie homogenizowano (homogenizator mechaniczny OMNI INTERNATIONAL) na lodzie w 500  $\mu$ L 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,4) (Rys. 23).



**Rysunek 23.** Schemat poboru tkanek (a) pobór hemolimfy, (b) preparacja jelita (fot. własna).

Przygotowane w ten sposób homogenaty wirowano w celu uzyskania frakcji postmitochondrialnej (4°C, 10 minut, 15000  $\times g$ ). Po procesie wirowania roztwór nad osadu (supernatant) rozlewano do próbek typu Eppendorf

i przechowywano w zamrażarce niskotemperaturowej w temperaturze  $-70^{\circ}\text{C}$  aż do chwili przeprowadzenia oznaczeń.

Przed wykonaniem pomiarów przeprowadzono standaryzację metody dla *A. domesticus* dla wszystkich testowanych wskaźników stresu oksydacyjnego. Sprawdzone również kinetykę reakcji nieenzymatycznej dla próbek bez zawartości analitu. Pomiary wszystkich wybranych parametrów wykonano na spektrofotometrze UV-VIS (TECAN Infinite M200, Austria).

## 12.5. Wskaźniki stresu oksydacyjnego

### 12.5.1. Pomiar stężenia białka

Stężenie białka oznaczono korzystając z metody Bradford [178]. Metoda opiera się na zjawisku wiązania cząsteczek barwnika Coomassie Brilliant Blue G-250 z białkiem wskutek przyciągania grup sulfonowych przez aminokwasy. Konsekwencją tego jest zmiana barwy roztworu z ciemnoczerwonej na niebieską. Intensywność niebieskiej barwy zależy od stężenia białka w próbce. Procedurę oznaczania wykonano na płytce 96-dołkowej. Kolejno, do  $5\ \mu\text{L}$  homogenatu dodawano  $250\ \mu\text{L}$  5-krotnie rozcieńczonego odczynnika białkowego ( $50\ \text{mg}$  CBB G-250 w  $25\ \text{mL}$  96% alkoholu etylowego i  $50\ \text{mL}$   $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%), uzupełnione do  $100\ \text{mL}$  wodą dejonizowaną) i dokładnie mieszano. Absorbancję prób oznaczano po 10 minutach inkubacji płytki w ciemności spektrofotometrycznie przy długości fali  $595\ \text{nm}$ . Końcowe stężenie białka w próbce określano względem krzywej wzorcowej o znanych stężeniach ( $y = 0,068x + 0,4629$ ,  $R^2 = 0,9959$ ), która została przygotowana z użyciem surowiczej albuminy bydlęcej

### 12.5.2. Katalaza

Pomiar aktywności katalazy (CAT) [EC 1.11.1.6], enzymu odpowiadającego za reakcję rozkładu nadtlenu wodoru ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) do wody i tlenu mierzono zgodnie z metodyką podaną przez Aebi [179]. Zmiany absorbancji mierzono na płytce 96 dołkowej. Mieszaninę składającą się z  $100\ \mu\text{L}$  homogenatu oraz  $0,05\ \text{M}$  buforu fosforanowego (pH 7,4) inkubowano przez 10 minut w  $37^{\circ}\text{C}$ . Następnie, do każdej próbki dodano ( $50\ \mu\text{L}$ )  $10\ \text{mM}$  roztwór  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Oznaczenia prowadzono na spektrofotometrze przy długości fali  $230\ \text{nm}$  w temperaturze  $25^{\circ}\text{C}$  przez 40 sekund (z 8 sekundowymi interwałami czasowymi). Specyficzną aktywność enzymu wyrażono w  $\mu\text{mol}\ \text{H}_2\text{O}_2\ \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}\ \text{białka}^{-1}$ .

### 12.5.3. **Peroksydaza glutationowa**

Peroksydaza glutationowa selenoniezależna (GSTPX) to powszechnie przyjęta nazwa dla enzymu neutralizującego zarówno nadtlenek wodoru jak i nadtlenuki organiczne (na przykład nadtlenek kumenu -  $C_9H_{12}O_2$ ). Jest ona transferazą o funkcji peroksydazowej, która powszechnie występuje u bezkręgowców [180]. Mieszanina reakcyjna składała się z (50  $\mu$ L) 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,4) z dodatkami (2 mM EDTA, 2 mM  $NaN_3$ ), (10  $\mu$ L) reduktazy glutationowej ( $1.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), (10  $\mu$ L) 10 mM zredukowany glutation (GSH), (10  $\mu$ L) 2,5 mM NADPH oraz (10  $\mu$ L) odpowiedniego supernatantu. Reakcję inicjowano poprzez dodanie (10  $\mu$ L) 15 mM tlenku kumenu. Absorbancję mierzono przy użyciu spektrofotometru na płytce 96 dołkowej przy długości fali 340 nm przez 180 sekund (z 15 sekundowymi interwałami czasowymi). Aktywność enzymu wyrażono w  $\mu\text{molach kumenu} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg białka}^{-1}$ .

### 12.5.4. **Całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC)**

Całkowita pojemność antyoksydacyjna jest miarą zdolności przeciwutleniającej wszystkich mechanizmów obrony antyoksydacyjnej w organizmie. Jest parametrem bardzo ogólnym, biorącym pod uwagę wiele składowych [181]. Parametr TAC oznaczano zgodnie z procedurą zaproponowaną przez Re i wsp. [182]. Metoda opiera się na redukcji kationorodnika ABTS<sup>•+</sup> (2,20-azyno-bis (3-etylobenzotiazoliny-kwasu 6-sulfonowego)) przez małowcząsteczkowy antyoksydant (TROLOX). Rodnik ABTS utworzono na drodze reakcji z nadsiarczanem potasu w środowisku buforu sodowo-fosforanowego (pH 7,4) przez 12-16 h chroniąc przed obecnością światła. Otrzymany niebiesko-zielony roztwór znajdował się przed użyciem w temperaturze 20°C. Odbarwienie ABTS (45  $\mu$ L) w obecności supernatantu (5  $\mu$ L) było mierzone na płytce 96-dołkowej przy długości fali 734 nm. Wyniki przedstawiono w  $\mu\text{M TROLOXu} \cdot \text{mg}^{-1}$  białka.

### 12.5.5. **Poziom białek szoku cieplnego HSP 70**

Białka szoku cieplnego HSP są grupą białek, których ekspresja wzrasta w przypadku narażenia komórek na rozmaite czynniki stresowe, na przykład także nadmiar reaktywnych form tlenu (RTF) [131]. Określenie poziomu tych białek przeprowadzono wykorzystując immunoenzymatyczną metodę ELISA. Płytki 96 - dołkowe opłaszczono homogenatem wraz z buforem fosforanowym

(pH 7,4 z dodatkami: PMSF,  $\text{NaN}_3$ , merkaptoetanol) w proporcji indywidualnie przeliczonej dla każdej próby. Pozostawiono na 16 h. Następnie próby usunięto i dołki trzykrotnie przepłukano 0,1 M (pH 7,4) buforem fosforanowym z dodatkiem Tween 20. Do każdego dołka dodano 100  $\mu\text{L}$  roztworu 1% albuminy bydlęcej (BSA) w buforze fosforanowym z dodatkami i inkubowano przez 1 h w 37°C w celu zablokowania miejsc niespecyficznego wiązania. Po kolejnym cyklu płukania próbki inkubowano przez kolejne 2,5 h (37°C) z przeciwciałem pierwszorzędowym (100  $\mu\text{L}$ ; przeciwciało monoklonalne anti-HSP 70 otrzymane po immunizacji myszy (Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 70 antibody produced in mouse, Sigma), rozcieńczenie 1:1000) a następnie z przeciwciałem drugorzędowym (100  $\mu\text{L}$ ; anti-IgG (Anti-Mouse IgG – Alkaline Phosphatase antibody produced in goat, Sigma), rozcieńczenie 1:1000) przez 2 h w tych samych warunkach temperaturowych (37°C). Po dokładnym przepłukaniu buforem z Tween 20, kompleks białko-przeciwciało wizualizowano dodając substrat kolorymetryczny. Każdą studzienkę inkubowano z zawartością (100  $\mu\text{L}$ ) Phosphate substrate, Sigma a następnie mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 405 nm. Stężenie HSP 70 w próbach obliczono przy użyciu standardowej krzywej wzorcowej ( $y=4,0338x + 0,1118$ ,  $R^2 = 0,9876$ ) przygotowanej tuż przed odczytem z użyciem białka HSP70-A1 (mouse) (recombinant), Enzo jako standardu. Wynik wyrażono w  $\mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1}$  całkowitego białka.

## 12.6. Opracowanie statystyczne wyników

Test Kołmogorowa–Smirnowa z poprawką Lillieforsa, a także testy oceniające jednorodność wariancji w grupach (test Levene’a oraz test Browna – Forsyth’a) pozwoliły zweryfikować hipotezę o rozkładzie danych zgodnym z rozkładem normalnym. Otrzymane wyniki testów potwierdziły normalność rozkładu, dlatego do oceny istotności różnic pomiędzy grupami doświadczalnymi skorzystano z testów parametrycznych. Wyniki przedstawiono na wykresach w postaci średnich ( $\pm\text{SD}$ ). Do określenia istotności różnic w aktywności enzymów pomiędzy grupami doświadczalnymi w obrębie tego samego punktu czasowego zastosowano metodę jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) z użyciem testu NIR (Najmniejszej Istotnej Różnicy) z grupy testów *post-hoc*. Istotność różnic



określano na poziomie  $p < 0,05$ . Weryfikację zależności pomiędzy wszystkimi głównymi zmiennymi przeprowadzono używając wieloczynnikowej analizy wariancji, korzystając z ogólnego modelu liniowego (GLM,  $p < 0,05$ ). Analizy statystyczne wykonano za pomocą oprogramowania STATISTICA wersja 10.0 (StatSoft, Inc. (2011)). Graficzne przedstawienie wyników opracowano w programie Excel; pakiet Microsoft Office 2013.

### **13. MODEL II: Określenie stopnia nasilenia stresu oksydacyjnego, uszkodzeń komórkowych oraz zmian histologicznych u *A. domesticus* wskutek krótkoterminowego narażenia na obecność tlenku grafenu (GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>) w pokarmie**

#### **13.1. Hodowla *Acheta domesticus***

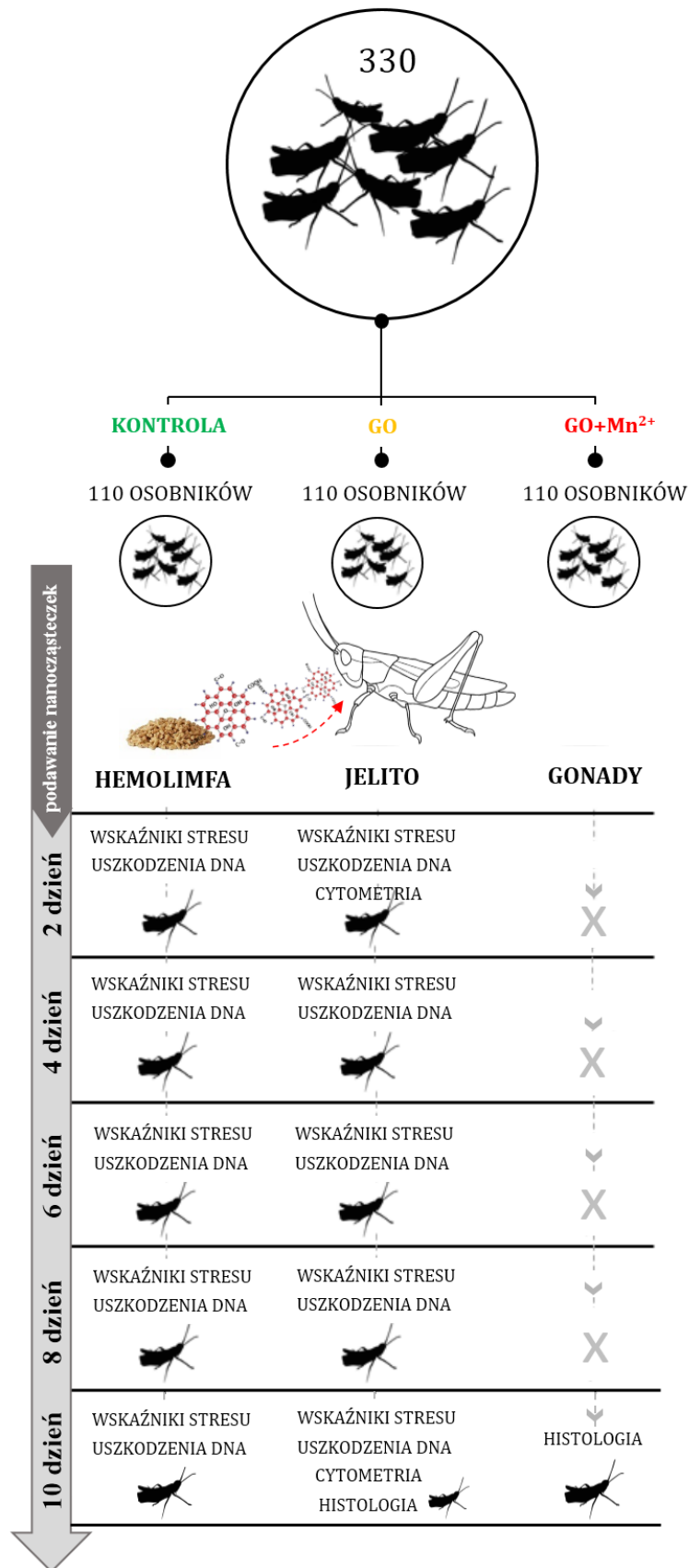
Owady do tego eksperymentu pozyskano z hodowli Katedry Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii WBIOS Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Hodowla ogólna *Acheta domesticus* była prowadzona pod stałą kontrolą i w odpowiednich warunkach, zgodnie z opisem podanym w MODELU I.

#### **13.2. Otrzymywanie i charakterystyka fizykochemiczna tlenku grafenu**

W doświadczeniu użyto tych samych nanocząsteczek jak to opisano w MODELU I. Szczegółowy opis procedury syntezy oraz charakterystyki tlenku grafenu znajduje się w podrozdziale 12.2.

#### **13.3. Schemat eksperymentu**

W celu przeprowadzenia badań, z hodowli ogólnej wyselekcjonowano losowo około 330 dorosłych samców *Acheta domesticus*. Zwierzęta zostały podzielone na 3 grupy eksperymentalne (K, GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>) i przeniesione do dużych, plastikowych insektariów (46 × 31 × 17,5 cm; około 110 osobników w każdym insektarium) z dostępem do wody, pożywienia i kryjówek. Owady przez cały okres eksperymentu przetrzymywano z zachowaniem warunków optymalnych do życia (temperatura: 29,4 ± 3,5 °C; fotoperiod: 12 h :12 h; wilgotność: 46,52 ± 9,43%) i karmiono pokarmem z dodatkiem dwóch rodzajów nanocząsteczek: GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>. Owady z grupy kontrolnej (K) były karmione tradycyjną karmą bez dodatku tlenku grafenu. W określonych punktach czasowych - 2, 4, 6, 8, 10 dni po



Rysunek 24. Model eksperymentu II.

rozpoczęciu eksperymentu wybierano losowo po około 22 osobniki i przygotowywano materiał do oznaczeń. Technikę poboru tkanek (hemolimfa, jelito) omówiono w podrozdziale 12.4, MODEL I.

Pobór gonad wykonano analogicznie, jednakże materiał posłużył wyłącznie do analizy histologicznej i dlatego natychmiast po wyizolowaniu tkanki został umieszczony w roztworze utrwalającym. Procedura przygotowania materiału do oceny histologicznej zostanie omówiona w następnych rozdziałach. Wybrane parametry, to jest wskaźniki stresu oksydacyjnego oraz stopień uszkodzenia DNA oznaczono w każdym punkcie czasowym. Uszkodzenia komórkowe monitorowano na początku (2 dzień) oraz na końcu eksperymentu (10 dzień). Histologiczną ocenę tkanki jelita oraz gonad wykonano po 10 dniach narażenia na tlenek grafenu w pokarmie (Rys. 24).

Wszystkie oznaczenia biochemiczne oraz cytometryczne zostały wykonane w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii WBIOS Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Ocena histologiczna tkanek została przeprowadzona w Katedrze Histologii i Embriologii Zwierząt WBIOS Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

#### **13.4. Przygotowanie pokarmu zawierającego nanocząsteczki**

Pokarm przygotowano poprzez zmielenie standardowej karmy (KanisanQ, Sano, Polska) w młynku kulowym i dodanie odpowiedniej objętości zdyspergowanych w wodzie destylowanej nanocząsteczek (roztwór wyjściowy:  $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Starannie wymieszaną karmę suszono przez około 48 godzin w suszarce (LUMEL, Joens) w temperaturze  $50^\circ\text{C}$  a następnie sterylizowano przez 24 h w komorze laminarnej (UV - cleaner, BIOSAN). Pokarm podawany grupie kontrolnej nie zawierał nanocząsteczek i został przygotowany według przedstawionego powyżej opisu, jedynie z dodatkiem wody destylowanej.

Stężenie tlenu grafenu w karmie ustalono w oparciu o serię eksperymentów pilotażowych. Oceniono, że tlenek grafenu w stężeniu  $200 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  pokarmu nie wpływa w sposób istotny na przeżywalność i parametry fizjologiczne owadów, dlatego ostatecznie tą wartość przyjęto w doświadczeniu.

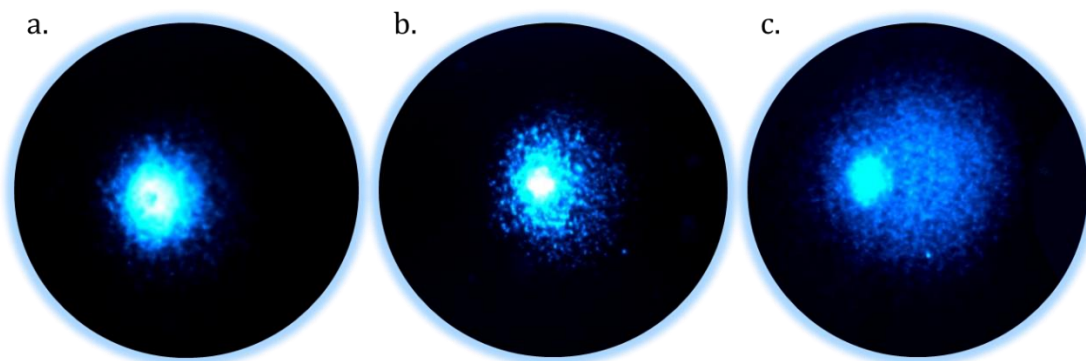
#### **13.5. Wskaźniki stresu oksydacyjnego**

Przygotowanie materiału do oznaczeń, jak również pomiar całkowitej ilości białka, pomiar aktywności **katalazy (CAT)** oraz ocenę poziomu **całkowitej pojemności**

**antyoksydacyjnej (TAC)** wykonano postępując zgodnie z procedurami opisanymi w rozdziale 12.5, MODEL I.

### 13.6. Ocena stopnia uszkodzeń DNA

Genotoksyczny wpływ tlenu grafenu oceniono w hemocytach owadów (7 osobników z każdej grupy eksperymentalnej w każdym punkcie czasowym) z zastosowaniem testu kometowego (*ang. comet assay*). Metoda polega na elektroforetycznym rozdziale jądrowego DNA i ilościowym określeniu stopnia jego fragmentacji z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego. DNA w trakcie elektroforezy migruje w stronę anody z prędkością, która jest wprost proporcjonalna do stopnia jego fragmentacji. Obraz mikroskopowy uszkodzonej komórki po elektroforezie przypomina kometę - stąd nazwa techniki. „Głowę” komety stanowi jądro, które unieruchomiono na preparacie, „ogon/ warkocz” komety to pętle i fragmenty DNA uwolnione z jądra w wyniku uszkodzeń (pęknięć pojedynczych lub podwójnych nici) [153]. Miarą ilości uszkodzeń (pęknięć) jest intensywność wybarwienia oraz długość ogona komety. Im intensywniejsze wybarwienie oraz im dalej uszkodzone DNA się przemieści, tym większe są uszkodzenia (Rys. 25).



**Rysunek 25.** Przykładowe obrazy jąder komórkowych po elektroforezie widziane pod mikroskopem fluorescencyjnym (na przykładzie hemocytów) (a) jądro komórkowe bez widocznych uszkodzeń DNA (b) jądro komórkowe z niewielkimi uszkodzeniami DNA (c) jądro komórkowe ze znacznymi uszkodzeniami (fot. własna).

W celu przygotowania materiału do analizy pobraną hemolimfę (40  $\mu\text{L}$ ) niezwłocznie zawieszono w buforze antykoagulacyjnym w proporcji 1:1. Następnie, próbkę z zawiesiną uzupełniono buforem PBS (pH 7,4) do objętości 500  $\mu\text{L}$  w celu uzyskania odpowiedniego rozcieńczenia komórek. Otrzymany roztwór podzielono na dwie równe części (250  $\mu\text{L}$  w każdej próbówce)

i uzupełniono (12,5  $\mu$ L) schłodzonym buforem PBS (pH 7,4) lub potraktowano (12,5  $\mu$ L) 10 mM roztworem nadtlenku wodoru  $H_2O_2$  - kontrola pozytywna. Końcowy etap przygotowania preparatów polegał na zmieszaniu roztworów komórek wraz z upłynnioną 1% agarozą LMP (ang. low melting point) (stosunek 1:1) i naniesieniu mieszaniny na szkiełka mikroskopowe pokryte wcześniej 1% agarozą NMP (ang. normal melting point). Wszystkie opisane procedury odbywały się na płycie schłodzonej lodem, w schłodzonym pomieszczeniu (19°C) z ograniczonym dostępem do promieniowania UV.

Po dwóch godzinach lizy alkalicznej i 20 minutowej procedurze poziomej elektroforezy (parametry wyjściowe: 25 V, 0,3 A, 10 W; Kucharczyk, Polska) materiał barwiono roztworem DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol) a następnie obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym (powiększenie 40x) wyposażonym w odpowiednie filtry (Olympus BX40 Trinocular).

Otrzymane obrazy analizowano przy użyciu programu Komet 5.5 (Kinetic Imaging) rejestrującym szereg parametrów opisujących stopień uszkodzenia materiału genetycznego. W przypadku każdego preparatu analizie poddano 50 losowo wybranych jąder komórkowych.

### **13.7. Analiza cytometryczna komórek**

Do wykonania pomiarów pobrano 7 osobników z każdej grupy eksperymentalnej w dwóch punktach czasowych (2 dzień oraz 10 dzień eksperymentu). Zwierzęta uśpiono na lodzie a następnie wypreparowano w całości przewód pokarmowy. Zawiesina komórek została przygotowana poprzez delikatne wytrząsanie tkanki w 400  $\mu$ L 0,1 M buforu fosforanowego (pH 7,4) z wykorzystaniem homogenizatora mechanicznego (Minilys®, Bertin Technologies).

Analizy przeprowadzono z użyciem kompaktowego cytometru przepływowego Muse® Cell Analyzer (Millipore, Billerica, MA, USA). Całkowity poziom stresu oksydacyjnego, stopień zaawansowania apoptozy oraz udział komórek w poszczególnych fazach cyklu komórkowego oceniono korzystając z oryginalnych zestawów zakupionych u producenta: Muse® Oxidative Stress Kit, Muse® Annexin V & Dead Cell assay, Muse® MultiCaspase Assay Kit oraz Muse® Cell Cycle Assay Kit. Wszystkie procedury oznaczania przeprowadzono zgodnie

z załączonymi protokołami, po uprzedniej standaryzacji metod dla tkanek *A. domesticus*.

### **13.8. Ocena histologiczna tkanek**

#### **13.8.1. Utrwalenie i zatopienie tkanek**

Jelito oraz gonady męskie wyizolowano z dziewięciu osobników (po trzy osobniki z każdej grupy eksperymentalnej) w 10 dniu eksperymentu. Gonady oraz układ pokarmowy, podzielony na odcinki: jelito przednie, jelito środkowe, jelito tylne były utrwalane przez 2 h w temperaturze 4°C. Do utrwalenia posłużył roztwór 2,5% glutaraldehydu w 0,1 molowym buforze fosforanowym o pH 7,4. Następnie, materiał płukano trzykrotnie we wspomnianym buforze przez 15 minut w temperaturze pokojowej (RT) i dodatkowo utrwalano w 1% roztworze czterotlenku osmu ( $\text{OsO}_4$ ) w 0,1 molowym buforze fosforanowym przez około 2 godziny w RT. Po odwodnieniu w szeregu alkoholowym (alkohol etylowy, kolejno 30%, 50%, 70%, 80%, 90% i 96% - po 15 minut każdy, oraz 100% - 4 razy po 15 minut) i dwukrotnym płukaniu w acetonie tkankę umieszczono w mieszaninie acetonu z żywicą epoksydową (stosunek 1:1) na 1,5 godziny w temperaturze pokojowej. Ostatecznie, w celu uzyskania bloczków z żywicy epoksydowej z materiałem, tkanki zatopiono w mieszaninie żywicy epoksydowej Epoxy Embedding Medium Kit (Sigma, St. Louis, MO).

#### **13.8.2. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)**

W celu analizy materiału bloczki eponowe krojono na skrawki ultracienkie (o grubości 70 nm) przy użyciu ultramikrotomu Leica UCT25. Skrawki zostały zebrane na miedziane siatki i kontrastowane octanem uranylu (25 minut) i cytrynianem ołowiu (25 minut). Ultrastrukturę jelita i gonad analizowano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego Hitachi H500 przy napięciu 75kV. Dokumentację fotograficzną wykonano na czarno-białych negatywowych błonach fotograficznych Kodak Electron Microscope Film 4489.

#### **13.8.3. Mikroskopia świetlna (mikroskopia jasnego pola)**

Do analizy materiału w mikroskopie świetlnym bloczki epoksydowe krojono przy użyciu ultramikrotomu LKB UTRATOME 4 za pomocą noży szklanych. Skrawki (0,8  $\mu\text{m}$ ) barwiono 1% błękitem metylenowym w 0,5% boraksie. Materiał

analizowano i fotografowano w mikroskopie świetlnym OLYMPUS BX60 z kamerą OLYMPUS X650 i oprogramowaniem cellSens Standard.

### **13.9. Opracowanie statystyczne wyników**

Dla otrzymanych danych liczbowych wykonano statystyki opisowe: średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe, wartość minimalna i wartość maksymalna. Wyniki zostały zaprezentowane na wykresach w postaci średnich ( $\pm$ SD). W celu zweryfikowania hipotezy o rozkładzie danych zgodnym z rozkładem normalnym wykorzystano test Kołmogorowa–Smirnowa z poprawką Lillieforsa. Jednorodność wariancji w grupach sprawdzono za pomocą testów Levene’a oraz Browna–Forsyth’a. Aby ocenić istotność różnic pomiędzy grupami eksperymentalnymi w obrębie jednego punktu czasowego użyto zarówno testów parametrycznych (test NIR, ANOVA;  $p < 0,05$ ) z grupy testów *post-hoc* jak i testów nieparametrycznych (test ANOVA rang Kruskala-Wallisa;  $p < 0,05$ ). Analizę statystyczną wykonano w programie STATISTICA wersja 12. Wyniki opracowano w programie Excel, pakiet Microsoft Office 2016.

## 14. MODEL III: Ocena wpływu długoterminowej ekspozycji na nanocząsteczki tlenku grafenu (GO) w kontekście potencjału reprodukcyjnego badanych owadów oraz zmian komórkowych

### 14.1. Hodowla *Acheta domesticus*



Rysunek 26. Insektaria w pokoju hodowlanym (fot. własna).

Larwy owadów pozyskano z hodowli ogólnej prowadzonej przez naukowców Katedry Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii WBIOS Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Owady, po wyizolowaniu z hodowli głównej, zostały podzielone na grupy eksperymentalne i były przetrzymywane w osobnych plastikowych insektariach z dostępem do wody, pożywienia i kryjówek (Rys. 26). Warunki hodowli były stale kontrolowane i utrzymywane w zakresie optymalnych wartości (temperatura:  $28,6 \pm 0,88$  °C; fotoperiod L:D 12:12, wilgotność: 23-

47%). Owady karmiono pokarmem z dodatkiem nanocząsteczek tlenku grafenu przez cały cykl życiowy.

### 14.2. Charakterystyka fizykochemiczna tlenku grafenu

Tlenek grafenu wykorzystany w doświadczeniu zakupiono w firmie Graphene Supermarket (Single Layer Graphene Oxide (Small Flakes); 1g). Substancję zdyspergowano w wodzie destylowanej (stężenie 50 mg/mL) a następnie poddano 8 godzinnej sonikacji w homogenizatorze ultradźwiękowym (cykl: 1 amplituda, 100%; model UP-100H, DONSERV) w celu zmniejszenia wielkości płatków grafenowych i zwiększenia jednorodności substancji. Przygotowany koloid poddano szczegółowej analizie fizykochemicznej.

Właściwości tlenku grafenu (GO) oceniono metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) przy użyciu urządzenia JEOL JSM-5410 (napięcie 20kV, powiększenie obrazu 1000x oraz 5000x). Ponadto, próbkę analizowano z wykorzystaniem mikroanalizy rentgenowskiej (ang. Energy Dispersive X-ray



Spectrometer, EDX) w celu określenia jej składu chemicznego w trzech losowo wybranych punktach.

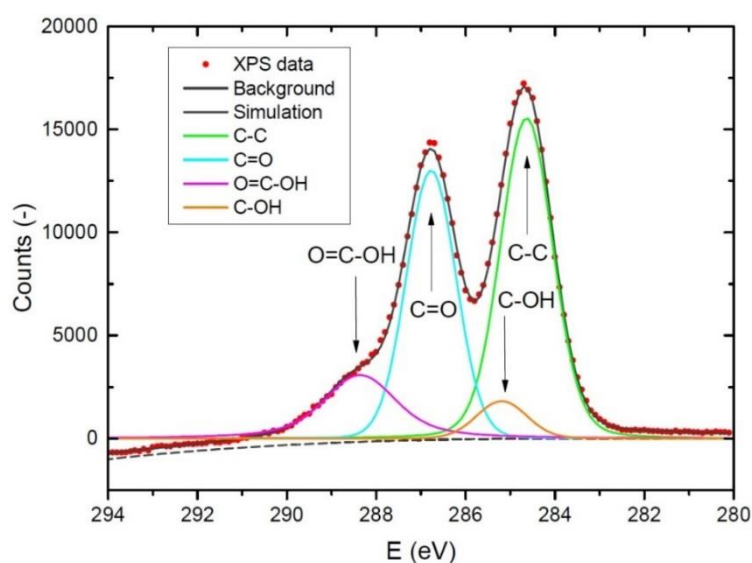
Rentgenowska spektrometria fotoelektronów (ang. X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS) została przeprowadzona na platformie ze zogniskowaną monochromatyczną wiązką promieni rentgenowskich zawierającą kwanty linii Al K $\alpha$  (1486.6 eV). Widma rejestrowane były w temperaturze pokojowej wewnątrz wysokociśnieniowej komory UHV ( $10^{-7}$  tor). Pomiar wysokiej rozdzielczości widma linii C1s pozwolił na określenie struktury chemicznej płatków GO.

Analiza widma XPS wykazała, że analit posiada w składzie zawartość atomów węgla i tlenu w proporcjach właściwych dla tlenku grafenu. Śladowa obecność siarki, azotu oraz manganu świadczy o jego zanieczyszczeniu (być może podczas procesu syntezy). Sygnał pochodzący od krzemu jest konsekwencją przygotowania próbki do pomiaru i osadzenia tlenku grafenu na specjalnej taśmie adhezyjnej. Szczegółowy skład chemiczny badanej próbki został zaprezentowany w Tabeli 1.

**Tabela 1.** Procentowy udział pierwiastków w próbce tlenku grafenu uzyskany metodą XPS oraz SEM (EDX).

#### Zawartość pierwiastków w próbce GO

	C	O	S	N	Si	Mn
<b>XPS</b>	70.34%	28.16%	0.65%	0.43%	0.39%	0.04%
<b>SEM (EDX)</b>	74.06%	24.07%	0.84%	0%	0.88%	0.15%



**Rysunek 27.** Widmo XPS tlenku grafenu.

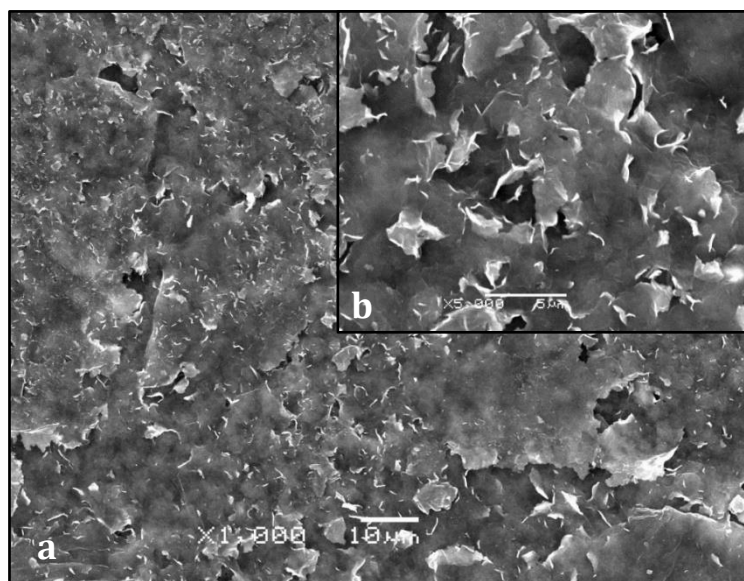
Widmo C1s przedstawia wysokie pasmo reprezentujące dominujące wiązania typu węgiel-węgiel tworzące strukturę grafenową (Rys. 27).

Dekonwulcja oraz przesunięcie pasma podstawowego ujawniły zgodnie z oczekiwaniami dwie grupy funkcyjne (C-O, O=C-OH) oraz obecność chemicznie nierównocennych atomów węgla (C-C, C=C). Stosunek udziału wiązań typu C - C/ C - O wynosi  $\approx 1.3$  i świadczy o wysokim utlenieniu warstwy grafenu. Udział poszczególnych wiązań i grup funkcyjnych w badanej próbce tlenku grafenu przedstawiono w Tabeli 2.

**Tabela 2.** Procentowy udział wiązań chemicznych w strukturze tlenku grafenu GO

Linia	Energia wiązania (eV)	Udział %	Typ wiązania
C1s	284.65	46	C - C
C1s	286.79	35	C - O
C1s	288.35	14	O = C - OH
C1s	285.20	5	C = C

Na Rys. 28 zaprezentowano zdjęcia uzyskane metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) przy powiększeniu 1000x oraz 5000x. Tlenek grafenu w badanej próbce występuje w postaci dużych, postrzępionych na krawędziach agregatów (10 – 100  $\mu\text{m}$ ). Widoczne są również mniejsze płatki (wiórki) o rozmiarze do około 1  $\mu\text{m}$ .



**Rysunek 28.** Zdjęcie płatków tlenku grafenu uzyskane metodą SEM; powiększenie 1000x (a) oraz 5000x (b).

Mikroanaliza rentgenowska EDX ujawniła pewne różnice w składzie chemicznym względem pomiaru metodą SEM (wyniki uwzględniono w Tabeli 1) co świadczy o dużej niejednorodności badanego materiału.

Charakterystyka fizykochemiczna tlenku grafenu została wykonana w Śląskim Międzyuczelnianym Centrum Edukacji i Badań Interdyscyplinarnych w Chorzowie.

### 14.3. Przygotowanie pokarmu z dodatkiem nanocząsteczek

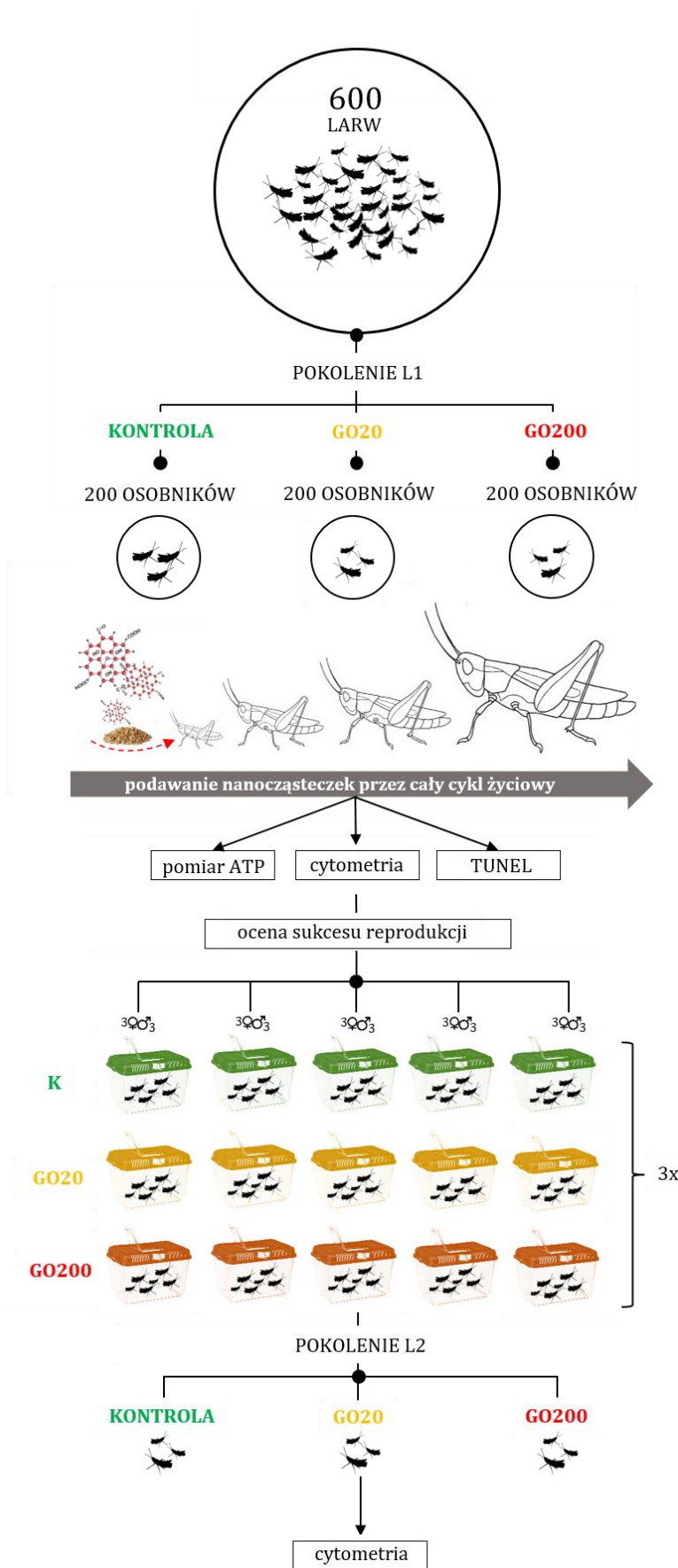
Pokarm został przygotowany poprzez staranne zmieszanie zmielonej paszy KanisanQ, Sano, Polska z odpowiednią objętością nanocząsteczek tlenku grafenu (roztwór wyjściowy 50 mg/ mL) zdyspergowanych w wodzie destylowanej. Przygotowaną mieszankę suszono przez około 48 h w suszarce (LUMEL, Joens) w temperaturze 45°C a następnie sterylizowano przez 24 h w komorze laminarnej (UV - cleaner, BIOSAN). Dieta owadów zawierała dwa różne stężenia tlenku grafenu: 20  $\mu\text{g}$  oraz 200  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  pokarmu. Pożywkę dla grupy kontrolnej przygotowano dodając wyłącznie wodę destylowaną.

Stężenia nanocząsteczek zostały ustanowione na bazie przeprowadzonych wcześniej badań i eksperymentów pilotażowych.

### 14.4. Model eksperymentu

Około 4 dniowe larwy *A. domesticus* zostały podzielone na trzy grupy eksperymentalne: grupa K (kontrolna), grupa GO20 (stężenie GO: 20  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  pokarmu) oraz GO200 (stężenie GO: 200  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  pokarmu). Osobniki przetrzymywano w plastikowych insektariach o wymiarach (46 × 31 × 17.5 cm; po około 200 owadów w każdym insektarium) i karmiono przygotowanym pokarmem, z zawartością nanocząsteczek w grupach GO20 i GO200 oraz bez zanieczyszczenia w grupie K, aż do osiągnięcia dojrzałości owadów.

Po upływie 3 miesięcy z każdej grupy doświadczalnej wyselekcjonowano dorosłe owady w celu przygotowania materiału niezbędnego do zaplanowanych badań (Rys. 29). Przygotowanie próbek do analizy wymagało indywidualnego podejścia dla każdej metody, dlatego szczegółowe postępowanie zostało zaprezentowane w kolejnych rozdziałach.



Rysunek 29. Schemat eksperymentu III. **Objaśnienie:** 3x – oznacza ilość powtórzeń eksperymentu.

Wszystkie analizy biochemiczne oraz cytometryczne zostały wykonane w Katedrze Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii WBIOS Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach.

#### 14.5. Ocena sukcesu reprodukcji

W celu oceny zdolności reprodukcyjnych owadów, z każdej grupy eksperymentalnej oddzielono 15 dojrzałych płciowo samic oraz 15 dojrzałych płciowo samców i umieszczono w niewielkich insektariach (po 3 samice oraz 3 samce z danej grupy eksperymentalnej) z nieograniczonym dostępem do pokarmu, świeżej wody oraz schronienia (5 insektariów z każdej grupy). Ponadto, aby umożliwić samicom złożenie jaj, każde insektarium zostało wyposażone w pojemnik ze zwilżonym podłożem (Rys. 30). Po 72 h aklimatyzacji zwierząt podłoża zabierano, szczelnie przykrywano i pozostawiano na około 12 dni w optymalnych dla rozwoju warunkach (temperatura:  $28,6 \pm 0,88$  °C; fotoperiod



Rysunek 30. Samice *A. domesticus* podczas składania jaj do podłoża (fot. własna).

L:D 12:12, wilgotność: 23-47%).

Całe doświadczenie powtórzono trzykrotnie (Rys. 29). Wyklute larwy (pokolenie L2) zliczano do chwili zakończenia wylęgu i przydzielano do określonej grupy doświadczalnej. Pozostałe po tej części prac hodowlanych podłoża (piasek) suszono w suszarce (LUMEL, Joens) w temperaturze 25 °C i następnie przesiewano i zliczano ilość jaj, z których nie wylęły się młode osobniki. Zdolność reprodukcji obliczono

dla każdej grupy eksperymentalnej z dokładnością do jednej samicy jako stosunek liczby młodych osobników do ilości jaj, z których wylęg nie zakończył się sukcesem. Hodowla pokolenia L2 owadów była prowadzona na tych samych zasadach jak pokolenie L1, aż do osiągnięcia dojrzałości osobników.

#### 14.6. Oznaczanie zawartości ATP

Zawartość ATP oceniono w każdej grupie doświadczalnej dla siedmiu dorosłych osobników *A. domesticus*. Zwierzęta umieszczono w osobnych naczyniach

z ciekłym azotem. Następnie tkankę natychmiast rozcierano w moździerzku na proszek. W celu usunięcia białka z próbki dodano 1M kwas nadchlorowy (HClO<sub>4</sub>), którego objętość indywidualnie wyliczono dla każdej próby na podstawie masy owada. Następnie do mieszaniny wkrapiano stopniowo małe objętości buforu neutralizującego w celu uzyskania pH 9. Gotowa zawiesina została rozporcjowana do próbek typu Eppendorf i wirowana (10000 x g, 5 minut, 4°C). Uzyskany supernatant przechowywano w zamrażarce niskotemperaturowej w temperaturze -70°C.

Pomiar ilości ATP został przeprowadzony luminometrycznie z użyciem testu ADP/ATP Ratio Bioluminescence Assay Kit oraz ATP Cell Viability Bioluminescence Assay Kit; ApoSENSOR® zgodnie z protokołami producenta.

Ilość ATP w każdej próbce została obliczona względem krzywej wzorcowej ( $y = 4E + 07x^{0,3029}$ ;  $R^2 = 0,97$ ) i wyrażona w mmolATP · g<sup>-1</sup> tkanki.

#### **14.7. Analiza cytometryczna komórek**

Wpływ długotrwałej, dwupokoleniowej ekspozycji na nanocząsteczki GO został oceniony w kontekście zmian komórkowych. Z każdej grupy eksperymentalnej pobrano 7 dorosłych osobników, zarówno w pokoleniu L1 jak i pokoleniu L2. Szczegółowa metoda pozyskiwania materiału do analizy i przygotowania próbek została zaprezentowana w podrozdziale 13.7.

Ocenę żywotności komórek wykonano z użyciem cytometru przepływowego Muse® Cell Analyzer (Millipore, Billerica, MA, USA) korzystając z testu Muse® Count & Viability Assay Kit. Analizy przeprowadzono według protokołów dostarczonych przez producenta, po uprzedniej standaryzacji metody dla tkanek świerszcza domowego.

#### **14.8. Ocena stopnia apoptozy oraz uszkodzeń DNA metodą TUNEL**

Znakowanie jąder techniką TUNEL (ang. Terminal Deoksynukleotydyl Transferase Mediated d-UTP Nick End-Labeling) pozwala na ilościową ocenę komórek apoptotycznych w oparciu o detekcję uszkodzeń DNA. Test opiera się na wykrywaniu komórek z uszkodzonym materiałem genetycznym poprzez znakowanie dUTP nukleotydów odpowiednią fluoresceiną (FITC).

Do analizy TUNEL wykorzystano 7 losowo wybranych osobników pochodzących z pokolenia L1 (z każdej grupy eksperymentalnej). Zwierzęta

unieruchomiono w niskiej temperaturze i następnie pobrano 25 $\mu$ L hemolimfy (metoda poboru została omówiona w podrozdziale 12.4), którą natychmiast naniesiono na szkiełko podstawowe. W kontroli pozytywnej tkankę traktowano *in vitro* 10  $\mu$ L of 88 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Materiał zamrożono na suchym lodzie a następnie umieszczono na 30 minut w 4% paraformaldehydzie w celu utrwalenia. Każdy preparat został przygotowany z użyciem jednego owada. Ilościową ocenę komórek apoptotycznych przeprowadzono z wykorzystaniem testu *In Situ Cell Death Detection Kit*<sup>®</sup>, Roche postępując zgodnie z przedstawioną metodyką. Komórki zostały permabilizowane poprzez inkubację w roztworze 0,1% Triton-X100 z 0,1% cytrynianem sodu przez 5 minut. Następnie, fragmenty DNA znakowano przygotowaną mieszaniną reakcyjną (Roche) zawierającą roztwór enzymu i nukleotydów w stosunku objętościowym 1:9 (50  $\mu$ L mieszaniny na każdy preparat). Kontrola negatywna reakcji TUNEL została potraktowana wyłącznie roztworem enzymu. Preparaty następnie inkubowano w ciemności przez 1 h (37°C) w wilgotnej komorze, a następnie płukano w buforze PBS i barwiono DAPI (4',6-diamidyno-2-fenyloindol). Materiał oceniano za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego wyposażonego w filtry FITC i DAPI (powiększenie 20x; Olympus BX40 Trinocular). Częstość znakowanych jąder obliczono dla każdej grupy na podstawie 1000 analizowanych komórek.

#### **14.9. Opracowanie statystyczne wyników**

Dla opracowania danych w Modelu III posłużono się tymi samymi testami statystycznymi jak w poprzednich modelach. Wyniki przedstawiono na wykresach jako średnie. Test Kołmogorowa–Smirnowa wykorzystano w celu zweryfikowania hipotezy o zgodności z rozkładem normalnym. Jednorodność wariancji w grupach sprawdzono za pomocą testów Levene’a oraz Browna–Forsyth’a. Różnice pomiędzy grupami eksperymentalnymi oceniano za pomocą testów parametrycznych (test NIR, ANOVA; test t-Studenta  $p < 0,05$ ). Analizę statystyczną wykonano w programie STATISTICA wersja 12. Wyniki opracowano w programie Excel, pakiet Microsoft Office 2016.

## IV. WYNIKI

### 15. MODEL I

Analiza głównych zmiennych w modelu GLM wykazała, że traktowanie owadów tlenkiem grafenu (zarówno GO jaki i GO+Mn<sup>2+</sup>) istotnie wpłynęło na wszystkie mierzone parametry obrony antyoksydacyjnej (zmienna: Eksperyment). Ponadto wykazano zależność aktywności katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej (GSTPx) od czasu trwania eksperymentu oraz od typu podanego tlenku grafenu (zmienna „czas”, „eksperyment” oraz „czas i eksperyment”). Na poziom białek szoku cieplnego HSP 70 znaczący wpływ miał efekt łączny wszystkich zmiennych za wyjątkiem zestawienia zmiennych „czas i narząd” (Tabela 1).

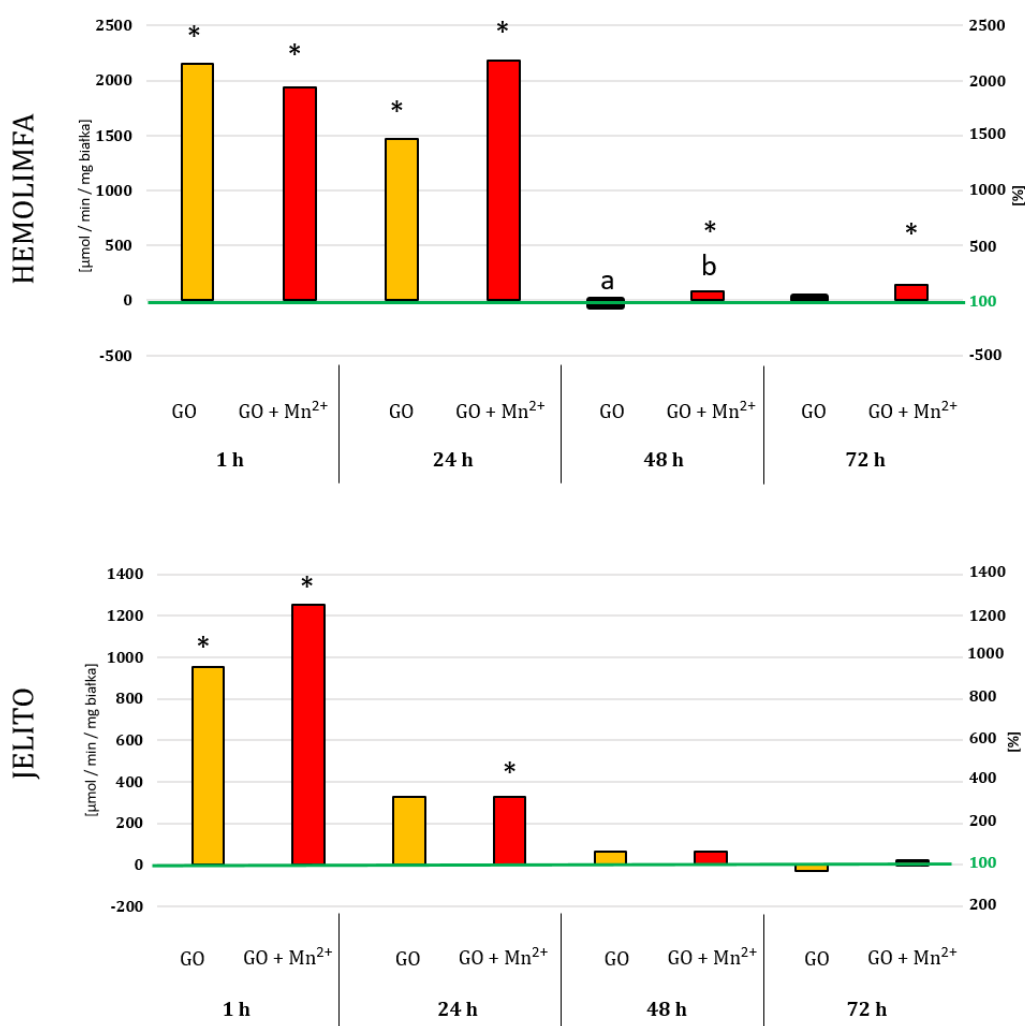
**Tabela 3.** Analiza GLM (ang. general linear model, ogólny model liniowy,  $p < 0,05$ ) dla czterech parametrów stresu oksydacyjnego na podstawie wyników otrzymanych z hemolimfy i jelita *A. domesticus* po ekspozycji na tlenek grafenu (GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>). Parametry zmierzono w kolejnych punktach czasowych (1 h, 24 h, 48 h, 72 h) po iniekcji nanocząsteczek. Objaśnienia: (E) Eksperyment: odnosi się do grup traktowanych porównanych względem grupy kontrolnej, (T) Czas: oznacza liczbę godzin od iniekcji nanocząsteczek do poboru tkanek, (N) Narząd: oznacza hemolimfę lub jelito. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015.

	CAT		GSTPx		TAC		HSP 70	
	F	p	F	p	F	p	F	p
<i>Eksperyment (E)</i>	<b>37.5</b>	<b>0.001</b>	<b>16.7</b>	<b>0.001</b>	<b>4.9</b>	<b>0.008</b>	<b>9.4</b>	<b>0.001</b>
<i>Czas (T)</i>	<b>50.7</b>	<b>0.001</b>	<b>14.5</b>	<b>0.001</b>	2.0	0.111	<b>13.9</b>	<b>0.001</b>
<i>Narząd (N)</i>	<b>7.1</b>	<b>0.008</b>	0.7	0.389	0.2	0.655	<b>32.4</b>	<b>0.001</b>
<i>E*T</i>	<b>11.6</b>	<b>0.001</b>	<b>2.4</b>	<b>0.026</b>	1.1	0.338	<b>8.2</b>	<b>0.001</b>
<i>E*N</i>	0.5	0.575	2.5	0.085	1.5	0.215	<b>3.0</b>	<b>0.049</b>
<i>T*N</i>	<b>4.1</b>	<b>0.007</b>	0.3	0.816	0.3	0.768	1.7	0.165
<i>E*T*N</i>	1.7	0.108	0.5	0.795	1.5	0.161	<b>3.8</b>	<b>0.001</b>



### 15.1. Wskaźniki stresu oksydacyjnego

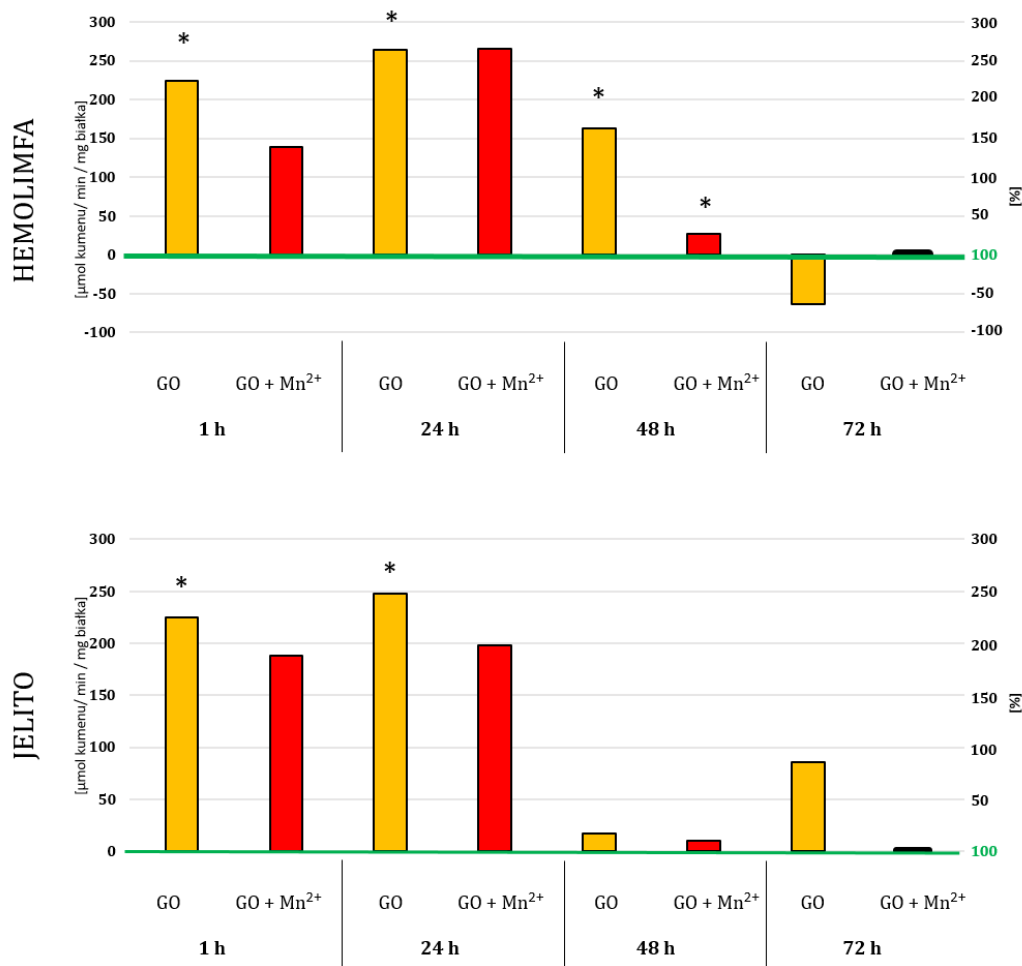
Analiza statystyczna wykazała, że **aktywność katalazy (CAT)** w obu badanych tkankach była istotnie wyższa względem grupy kontrolnej już w pierwszej dobie od iniekcji obu typów nanocząsteczek (GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>). Aktywność tego enzymu w hemolimfie zwierząt, którym wstrzyknięto tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu (GO+Mn<sup>2+</sup>) cechowała się podwyższonymi wartościami aż do zakończenia eksperymentu (72 h). Obserwując zmiany biochemiczne w jelicie można zauważyć, że u osobników, którym podano czysty tlenek grafenu (GO)



**Rysunek 31.** Aktywność katalazy (CAT) w hemolimfie i jelicie *A. domesticus* narażonych na działanie czystego chemicznie tlenku grafenu (GO) oraz tlenku grafenu zanieczyszczonego jonami manganu (GO+Mn<sup>2+</sup>) w kolejnych punktach czasowych (1 h, 24 h, 48 h, 72 h) po iniekcji nanocząsteczek. **Objaśnienie:** zielona linia wskazuje grupę kontrolną. Średnie, procentowe udziały grup traktowanych nanocząsteczkami były obliczane względem grupy kontrolnej odpowiadającej danemu punktowi czasowemu; \* - wskazuje statystycznie istotną różnicę pomiędzy owadami intoksykowanymi względem grupy kontrolnej; różne litery (a, b) – oznaczają różnice pomiędzy grupami GO i GO+Mn<sup>2+</sup> osobno w każdym punkcie czasowym. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015.

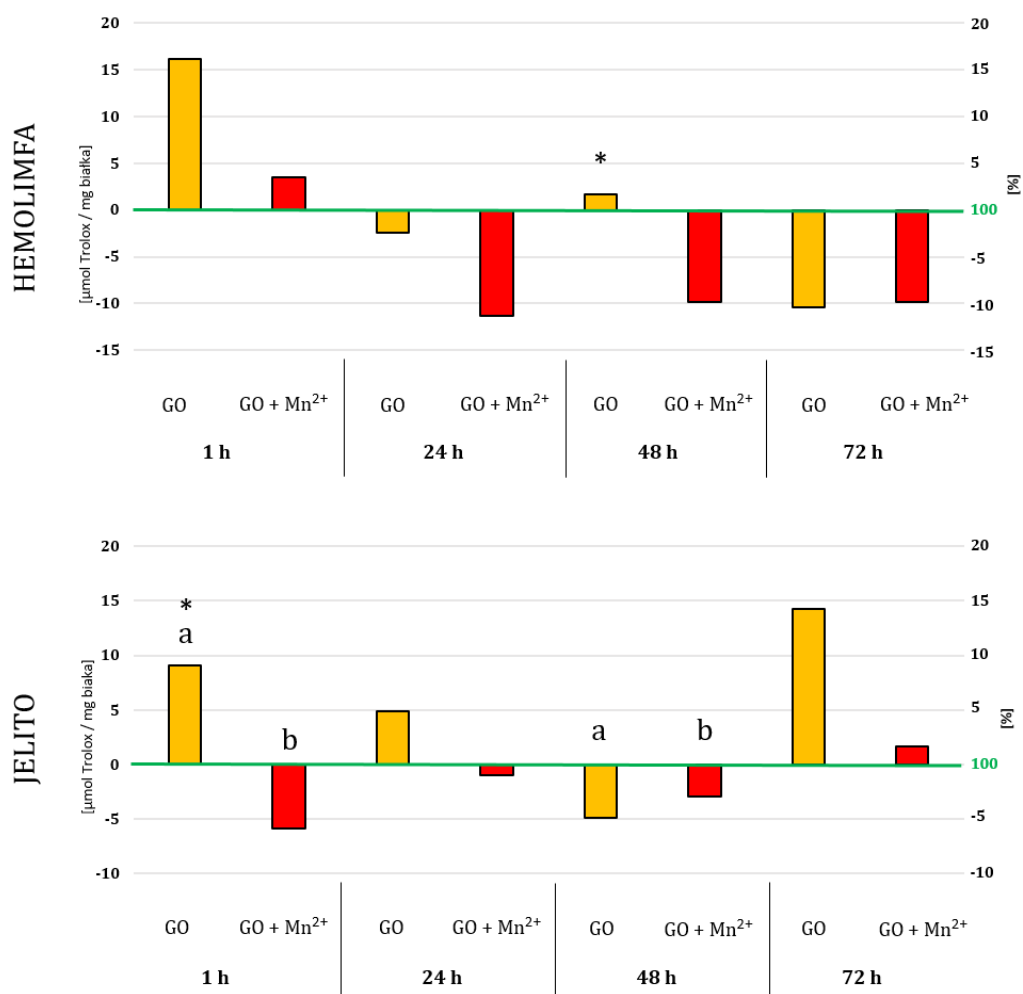
aktywność CAT powróciła do poziomu kontrolnego już w około drugiej dobie po wstrzyknięciu (48 h) (Rys. 31).

**Peroksydaza glutationowa (GSTPx)** wykazała podobną aktywność jak katalaza. Istotne różnice w poziomie tego enzymu zaobserwowano w pierwszych trzech punktach czasowych w hemolimfie owadów traktowanych czystym GO. W jelicie trend ten utrzymywał się do 24 godziny od iniekcji a następnie poziom GSTPx stabilizował się i wyrównywał z grupą kontrolną (48 i 72 h). Wzmoczona aktywność została stwierdzona także w jelicie w grupie owadów ekspozowanych na GO+Mn<sup>2+</sup>, jednakże obserwowane różnice nie były istotne statystycznie (Rys. 32).



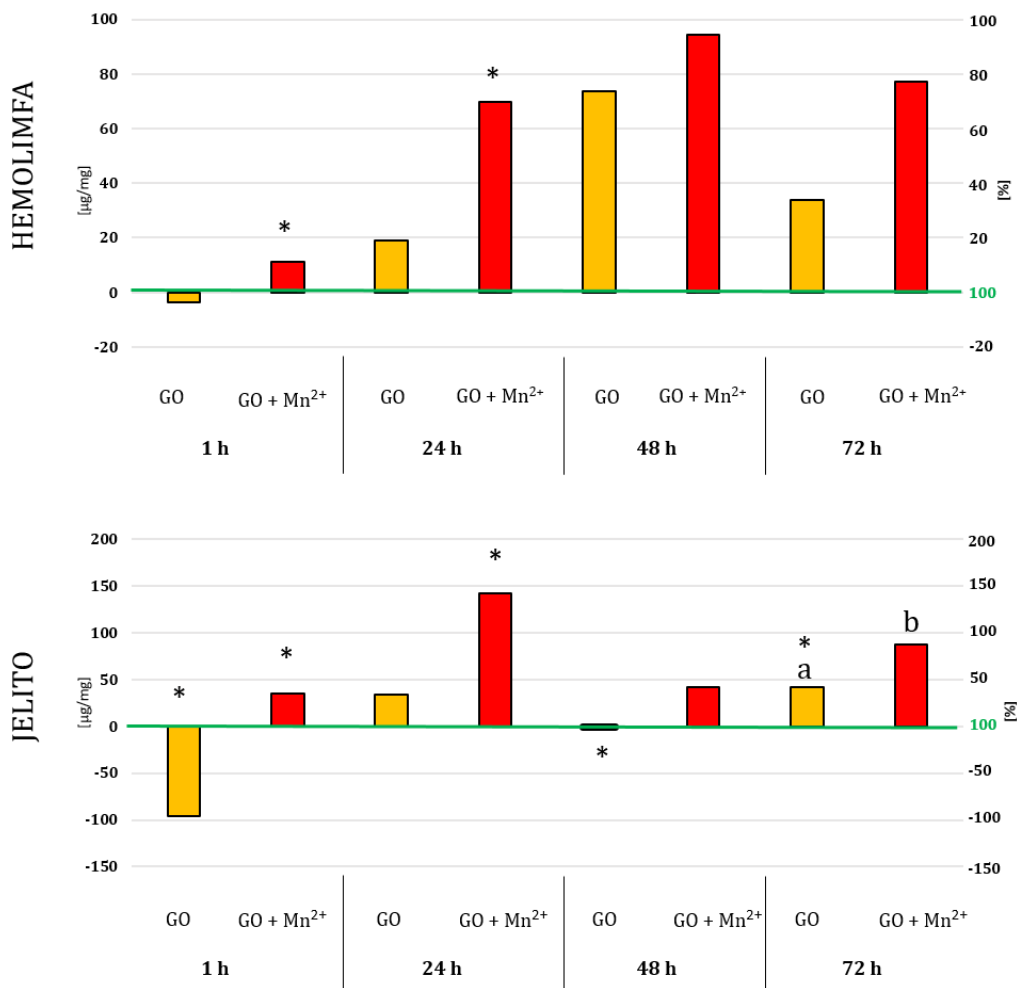
**Rysunek 32.** Aktywność peroksydazy glutationowej (GSTPx) w hemolimfie i jelicie *A. domesticus* narażonych na działanie czystego chemicznie tlenku grafenu (GO) oraz tlenku grafenu zanieczyszczonego jonami manganu (GO+Mn<sup>2+</sup>) w kolejnych punktach czasowych (1 h, 24 h, 48 h, 72 h) po podaniu nanocząstek. **Objaśnienie:** jak w Rys. 23. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015.

Odmiennie tendencje zaobserwowano w przypadku pomiaru **całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC)**. Wyniki wykazały, że w hemolimfie owadów poziom TAC był istotnie wyższy względem grupy kontrolnej dopiero w 48 godzinie po aplikacji nanocząsteczek. Co interesujące, poziom tego parametru w jelicie wykazywał wzrost zarówno w 1 h jak i 48 h po iniekcji nanocząsteczek. W przypadku TAC ujawniły się również istotne statystycznie różnice pomiędzy grupami zwierząt, które zostały traktowane tlenkiem grafenu. Trend ten był szczególnie dobrze widoczny w jelicie owadów (Rys. 33).



**Rysunek 33.** Poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) w hemolimfie i jelicie *A. domesticus* narażonych na działanie czystego chemicznie tlenku grafenu (GO) oraz tlenku grafenu zanieczyszczonego jonami manganu (GO+Mn<sup>2+</sup>) w kolejnych punktach czasowych (1 h, 24 h, 48 h, 72 h) po podaniu nanocząsteczek. **Objaśnienie:** jak w Rys. 23. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015.

Enzymatyczne mechanizmy obrony antyoksydacyjnej cechowały się odmiennymi zależnościami w trakcie przebiegu eksperymentu w porównaniu z zachowaniem białek opiekuńczych. Poziom **białek szoku cieplnego HSP 70**, zwłaszcza w hemolimfie intoksykowanych owadów, wykazywał tendencję wzrostową w drugim i trzecim dniu eksperymentu (48 h i 72 h po iniekcji). Jednakże statystycznie istotne różnice w porównaniu do osobników kontrolnych zaobserwowano po 1 h i 24 h godzinie od iniekcji w grupie traktowanej zanieczyszczonym tlenkiem grafenu ( $\text{GO}+\text{Mn}^{2+}$ ). Owady, którym podano wolny od jonów manganu tlenek grafenu (GO) cechowały się podniesionym poziomem białek HSP 70 w 48 h i 72 h od rozpoczęcia doświadczenia (Rys. 34).

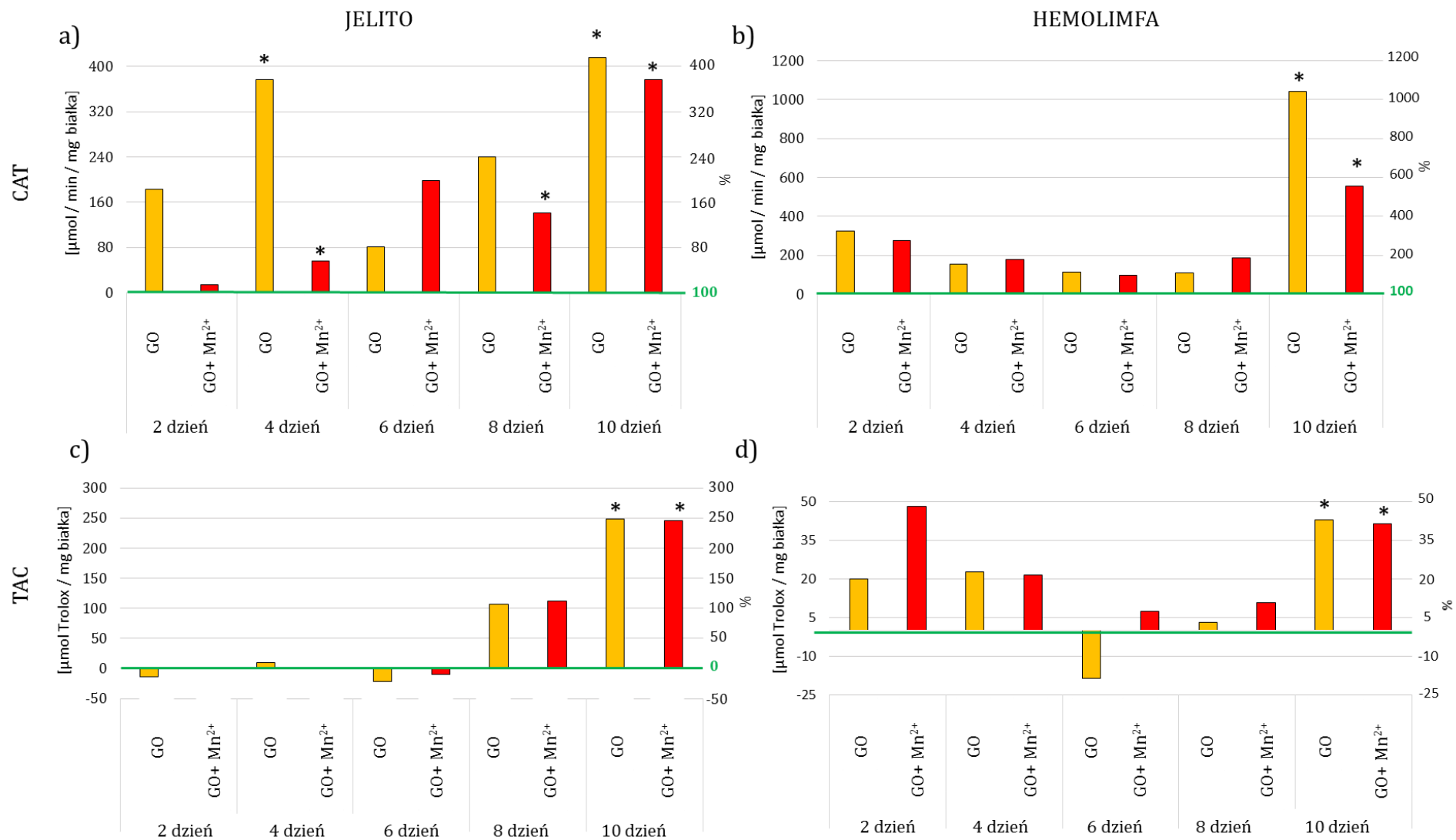


**Rysunek 34.** Poziom białek szoku cieplnego (HSP 70) w hemolimfie i jelicie *A. domesticus* narażonych na działanie czystego chemicznie tlenku grafenu (GO) oraz tlenku grafenu zanieczyszczonego jonami manganu ( $\text{GO}+\text{Mn}^{2+}$ ) w kolejnych punktach czasowych (1 h, 24 h, 48 h, 72 h) po podaniu nanocząstek. **Objaśnienie:** jak w Rys.23. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015.

## 16. MODEL II

### 16.1. Wskaźniki stresu oksydacyjnego

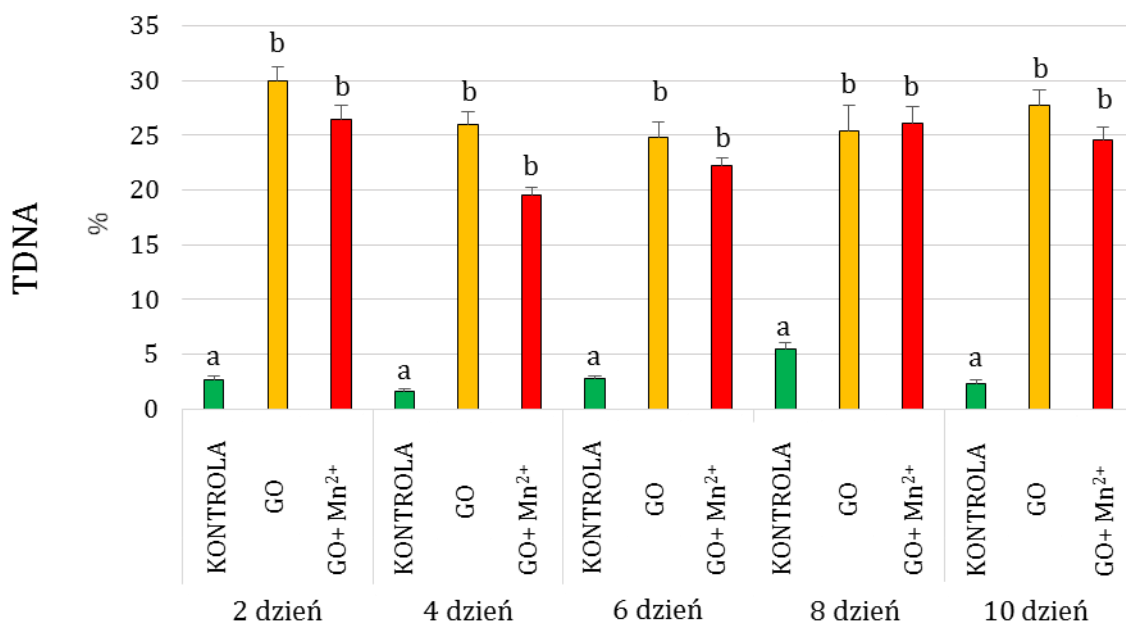
Zmiany aktywności **katalazy (CAT)** w hemolimfie owadów wskazują na brak istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupą kontrolną a grupami traktowanymi tlenkiem grafenu od 2 aż do 8 dnia eksperymentu. Znaczące podwyższenie aktywności CAT w tej tkance obserwowane było dopiero w ostatnim, to jest dziesiątym dniu doświadczenia, zarówno w grupie GO jak i GO+Mn<sup>2+</sup>. Aktywność katalazy w jelicie ujawniła odmienną tendencję. Statystycznie znaczący wzrost aktywności tego enzymu obserwowano w 4, 8 oraz 10 dniu traktowania zwierząt nanocząsteczkami. Wzrost aktywności CAT w 8 dniu eksperymentu wykazano jedynie dla grupy zwierząt, która spożywała pokarm zanieczyszczony tlenkiem grafenu z jonami manganu GO+Mn<sup>2+</sup>. Poziom **całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC)** był istotnie wyższy względem grupy kontrolnej tylko w 10 dniu traktowania owadów nanocząsteczkami. Zależność ta była widoczna w obu badanych tkankach zarówno w grupie traktowanej czystym GO jak i grupie GO+Mn<sup>2+</sup> (Rys. 35).



**Rysunek 35.** Wskaźniki stresu oksydacyjnego w jelicie oraz hemolimfie *A. domesticus* w trakcie 10 dniowej ekspozycji na tlenek grafenu w pokarmie (a) aktywność katalazy w jelicie (b) aktywność katalazy w hemolimfie (c) poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w jelicie (d) poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w hemolimfie. **Objaśnienie:** zielona linia wskazuje grupę kontrolną. Średnie oraz procentowe udziały grup traktowanych nanocząsteczkami były obliczane względem grupy kontrolnej odpowiadającej danemu punktowi czasowemu; \* - statystycznie istotne różnice pomiędzy owadami intoksykowanymi względem grupy kontrolnej (LSD, ANOVA  $p < 0.05$ ). Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.

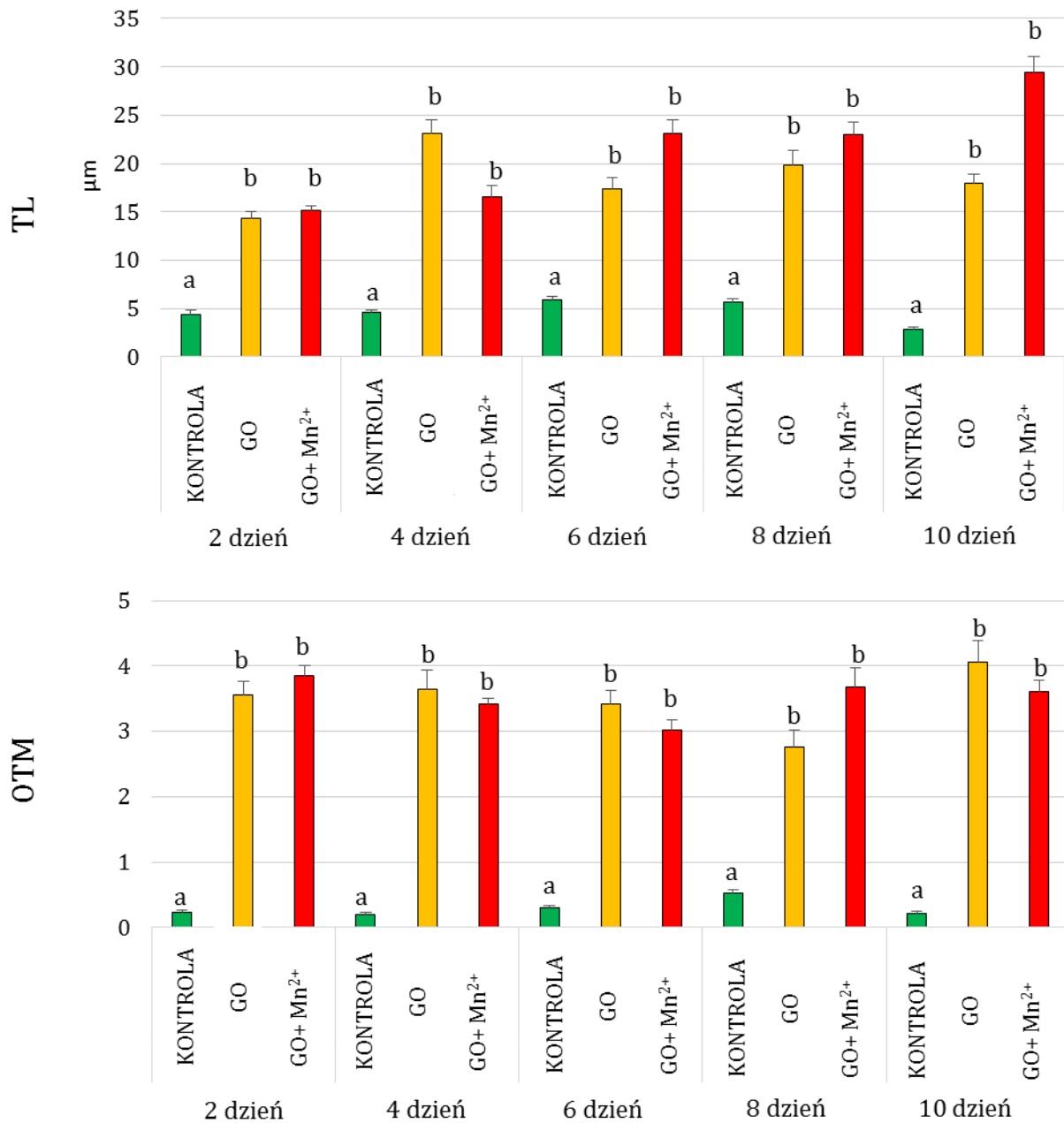
## 16.2. Stopień uszkodzeń DNA

Spożywanie nanocząsteczek wraz z pokarmem przez 10 dni przyczyniło się do znacznych uszkodzeń materiału genetycznego w hemocytach *A. domesticus*. Ilość pofragmentowanego DNA w ogonie komety (**parametr TDNA**) była zawsze znacząco wyższa u owadów eksponowanych na działanie obu typów tlenku grafenu, w porównaniu z grupą kontrolną. Procent uszkodzonego DNA wahał się w przedziale od 20% do około 35% podczas trwania całego doświadczenia (Rys. 36).



**Rysunek 36.** Parametr TDNA (ilość DNA w ogonie komety) charakteryzujący stopień uszkodzenia DNA w hemocytach *A. domesticus* w trakcie 10 dniowej ekspozycji na tlenek grafenu (GO i GO+Mn<sup>2+</sup>) w pokarmie. **Objaśnienie:** różne litery (a, b) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi K, GO i GO+Mn<sup>2+</sup> osobno w każdym punkcie czasowym (test Kruskala-Wallis,  $p < 0.05$ ). Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.

**Parametry TL (ang. tail length) i OTM (ang. olive tail moment)** potwierdziły, że zarówno GO jak i GO+Mn<sup>2+</sup> przyczyniły się do istotnego wzrostu uszkodzeń DNA już w 2 dniu aplikacji pokarmu z nanocząsteczkami. We wszystkich punktach czasowych, dla wszystkich parametrów oceniających poziom uszkodzeń DNA nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami GO jak i GO+Mn<sup>2+</sup>. Wyniki wskazują, że czysty tlenek grafenu oraz tlenek grafenu z obecnością manganu wykazują podobny efekt genotoksyczny (Rys. 37).

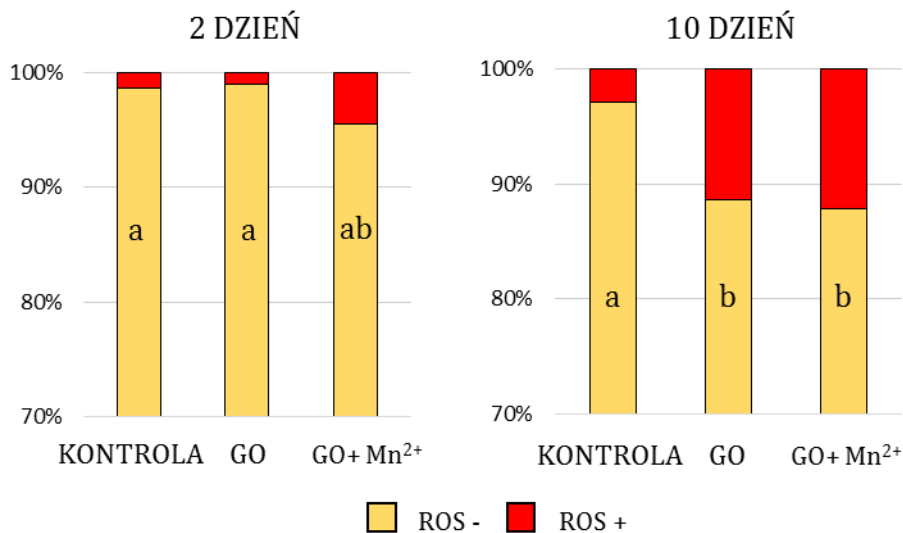


**Rysunek 37.** Parametry TL (tail length; długość ogona komety) oraz OTM (olive tail moment) charakteryzujące stopień uszkodzenia DNA w hemocytach *A. domesticus* w trakcie 10 dniowej ekspozycji na tlenek grafenu (GO i GO+Mn<sup>2+</sup>) w pokarmie. **Objaśnienie:** różne litery (a, b) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi K, GO i GO+Mn<sup>2+</sup> osobno w każdym punkcie czasowym (test Kruskala-Wallis,  $p < 0.05$ ). Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.



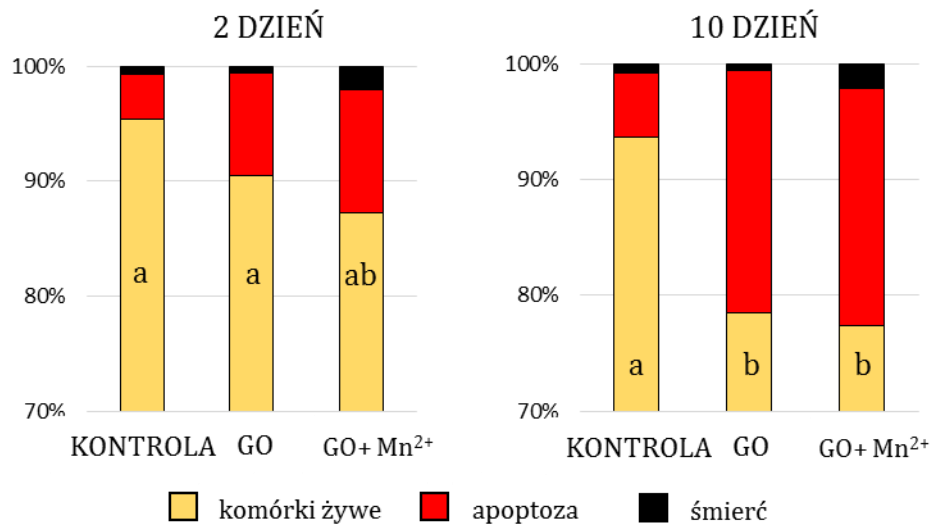
### 16.3. Ocena cytometryczna uszkodzeń komórkowych

**Poziom reaktywnych form tlenu (ROS)** w tkance przewodu pokarmowego owadów po 2 dniach ekspozycji na tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu był wyższy względem osobników z grupy kontrolnej i grupy traktowanej czystym GO. W ostatnim dniu eksperymentu całkowity poziom stresu oksydacyjnego w komórkach był znacznie wyższy w obu grupach zwierząt karmionych nanocząsteczkami w porównaniu do grupy kontrolnej. Nie odnotowano różnic w intensywności generowania ROS pomiędzy GO i GO+Mn<sup>2+</sup> (Rys. 38).



**Rysunek 38.** Całkowity poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach jelita *A. domesticus* po 2 dniach oraz 10 dniach ekspozycji na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> w pokarmie. Wyniki otrzymane za pomocą testu Muse® Oxidative Stress Kit. **Objaśnienie:** litery (a, b) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi K, GO i GO+Mn<sup>2+</sup> osobno w każdym punkcie czasowym (test Kruskala-Wallis,  $p < 0.05$ ). Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.

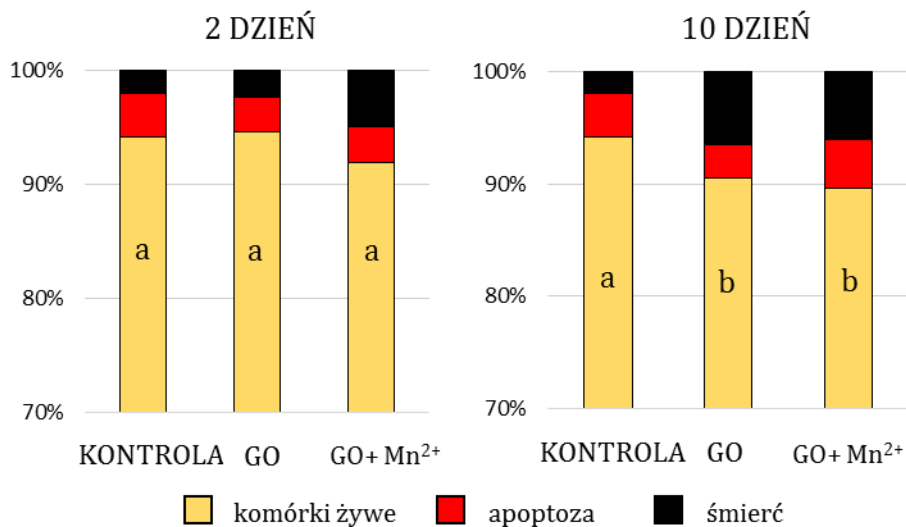
Podczas trwania eksperymentu ilość komórek o cechach **apoptozy** wzrastał w komórkach jelita owadów karmionych pokarmem z zawartością nanocząsteczek (GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>).



**Rysunek 39.** Stopień apoptozy w komórkach jelita *A. domesticus* po 2 dniach oraz 10 dniach ekspozycji na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> w pokarmie. Wyniki otrzymane za pomocą testu Muse® Annexin V & Dead Cell assay. **Objaśnienie:** jak w Rys. 32. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.

Dziesiątego dnia ekspozycji, udział żywych komórek w obu grupach traktowanych stanowił około 78% całkowitej ilości komórek, podczas gdy komórki żywe w grupie kontrolnej stanowiły aż 95%. Różnica w zakresie stopnia apoptozy w komórkach *A. domesticus* pomiędzy grupami GO i GO+Mn<sup>2+</sup> była statystycznie znacząca w ostatnim dniu eksperymentu (Rys. 39).

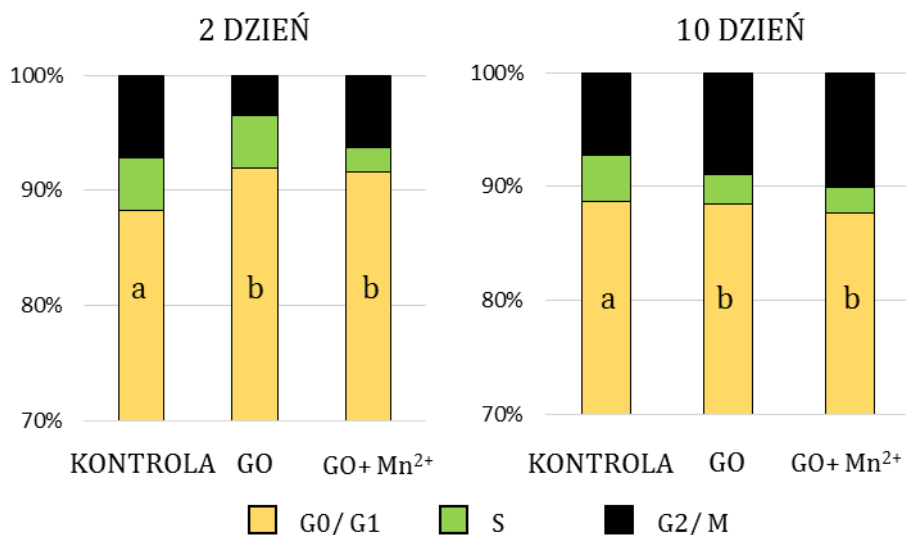
Ponadto Muse® Multi Caspase Assay test pozwolił ustalić, że stosunek martwych komórek względem komórek żywych był istotnie wyższy w 10 dniu narażenia na tlenek



**Rysunek 40.** Stopień apoptozy w komórkach jelita *A. domesticus* po 2 dniach oraz 10 dniach ekspozycji na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> w pokarmie. Wyniki otrzymane za pomocą testu Muse® MultiCaspase Assay Kit. **Objaśnienie:** jak w Rys. 32. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.

grafenu w stosunku do 2 dnia. Nie odnotowano różnic pomiędzy obiema grupami traktowanymi nanocząsteczkami (Rys. 40).

Analiza **cyklu komórkowego** dla komórek świerszczy również ujawniła znaczące różnice pomiędzy drugim a dziesiątym dniem eksperymentu.



**Rysunek 41.** Udział poszczególnych faz cyklu komórkowego w komórkach jelita *A. domesticus* po 2 dniach oraz 10 dniach ekspozycji na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> w pokarmie. Wyniki otrzymane za pomocą testu Muse® Cell Cycle Assay Kit. **Objaśnienie:** jak w Rys. 32. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.

Po dwóch dniach ekspozycji na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> znacząca liczba komórek zatrzymała się w fazie G0/ G1. Dziesięć dni później liczba komórek pozostających w fazie G2/ M wzrosła o około 10% względem dnia drugiego. Jednocześnie, udział komórek w fazie S w grupie owadów traktowanych GO zmniejszył się do około 6% ogółu mierzonych komórek (Rys. 41).

## 16.4. Ocena histologiczna

### 16.4.1. Jelito przednie

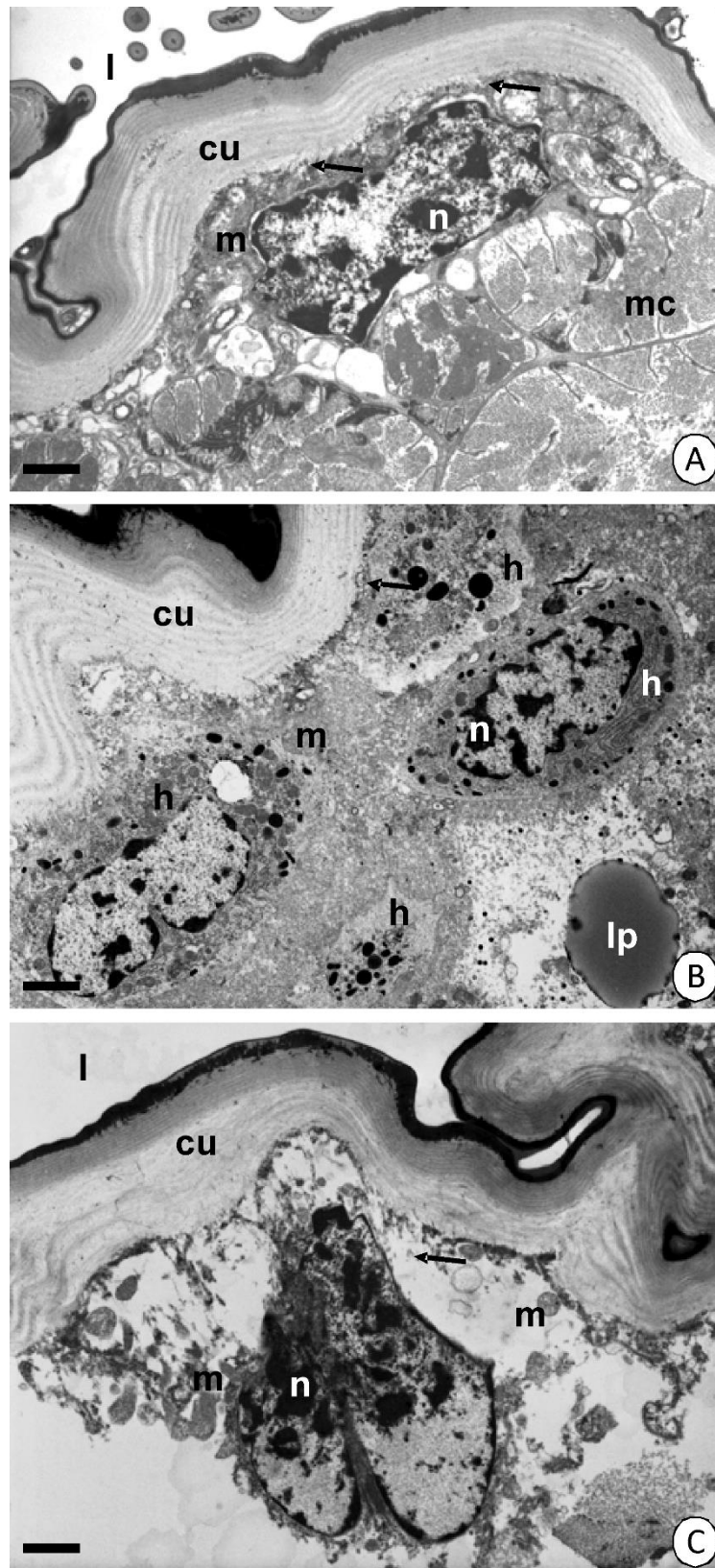
Przedni odcinek jelita *A. domesticus* zbudowany jest z pojedynczej warstwy komórek nabłonkowych osadzonych na blaszce podstawnej. Powierzchnia komórek od strony światła jelita jest pokryta kutikulą [183]. Traktowanie tlenkiem grafenu spowodowało liczne zmiany w strukturze organelli komórek nabłonkowych jelita przedniego w obu grupach doświadczalnych względem grupy kontrolnej.

#### **16.4.1.1. Tlenek grafenu GO**

Po 10 dniowej podaży pokarmu z obecnością nanocząsteczek GO, cytoplazma komórek nabłonkowych wykazywała małą liczbę organelli względem grupy kontrolnej (Rys. 42A). Mitochondria (pozbawione grzebieni mitochondrialnych) wraz z retikulum endoplazmatycznym szorstkim stanowiły dominujące komponenty komórek nabłonkowych. Mikrokosmki były słabo rozwinięte, a na terenie cytoplazmy pojawiły się liczne krople lipidowe. Ponadto, wśród komórek nabłonkowych wykazano obecność hemocytów, których nie zaobserwowano u zwierząt z grupy kontrolnej. Nie odnotowano zmian w strukturze kutikuli (Rys. 42 B).

#### **16.4.1.2. Tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu GO+Mn<sup>2+</sup>**

Analiza struktury jelita zwierząt traktowanych GO+Mn<sup>2+</sup> wykazała zmniejszoną liczbę organelli ze sporadyczną obecnością mitochondriów, które były pozbawione grzebieni mitochondrialnych, a ich macierz była elektronowo jasna i płatowatym, obkurczonym jądrem komórkowym. Heterochromatyna tworzyła skupiska umieszczone w środkowej części nukleoplazmy. Ponadto, podobnie jak w grupie traktowanej GO, zaobserwowano liczne hemocyty obecne pomiędzy komórkami nabłonkowymi. Nie zaobserwowano materiału zapasowego w postaci granulatów glikogenu i zmian degeneracyjnych w strukturze naskórka (Rys. 42 C).



**Rysunek 42.** Przekrój przez jelito przednie *A. domesticus* po 10 dniach ekspozycji na pokarm zawierający GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> (A) kontrola (TEM; Bar = 1,2 μm) (B) grupa traktowana GO (TEM; Bar = 1,2 μm) (C) grupa traktowana GO+Mn<sup>2+</sup> (TEM; Bar = 1,4 μm). **Objaśnienia:** światło jelita przedniego (L), kutikula (Cu), mitochondria (m), jądro (n), mięśnie trzewne (mc), hemocyty (h), krople lipidowe (Ip), mikrokosmki (strzałki); zdjęcia opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.

## 16.4.2. Jelito środkowe

Jelito środkowe jest podzielone na dwa odrębne obszary – przednią część jelita środkowego oraz tylną część jelita środkowego. Nabłonek obu części jest utworzony z komórek trawiennych i regeneracyjnych. Nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy częścią przednią a tylną jelita środkowego. Opisane zmiany odnoszą się do obu regionów.

### 16.4.2.1. Tlenek grafenu GO

Ocena ultrastruktury jelita środkowego wykazała, że cytoplazma komórek trawiennych nieznacznie różniła się w porównaniu z grupą kontrolną (43 A). W cytoplazmie komórek zaobserwowano jedynie liczne wakuole, krople lipidowe oraz ziarnistości o dużej gęstości elektronowej – prawdopodobnie lizosomy. Nie zaobserwowano żadnych zmian w ultrastrukturze komórek regeneracyjnych (Rys. 43 B).

### 16.4.2.2. Tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu GO+Mn<sup>2+</sup>

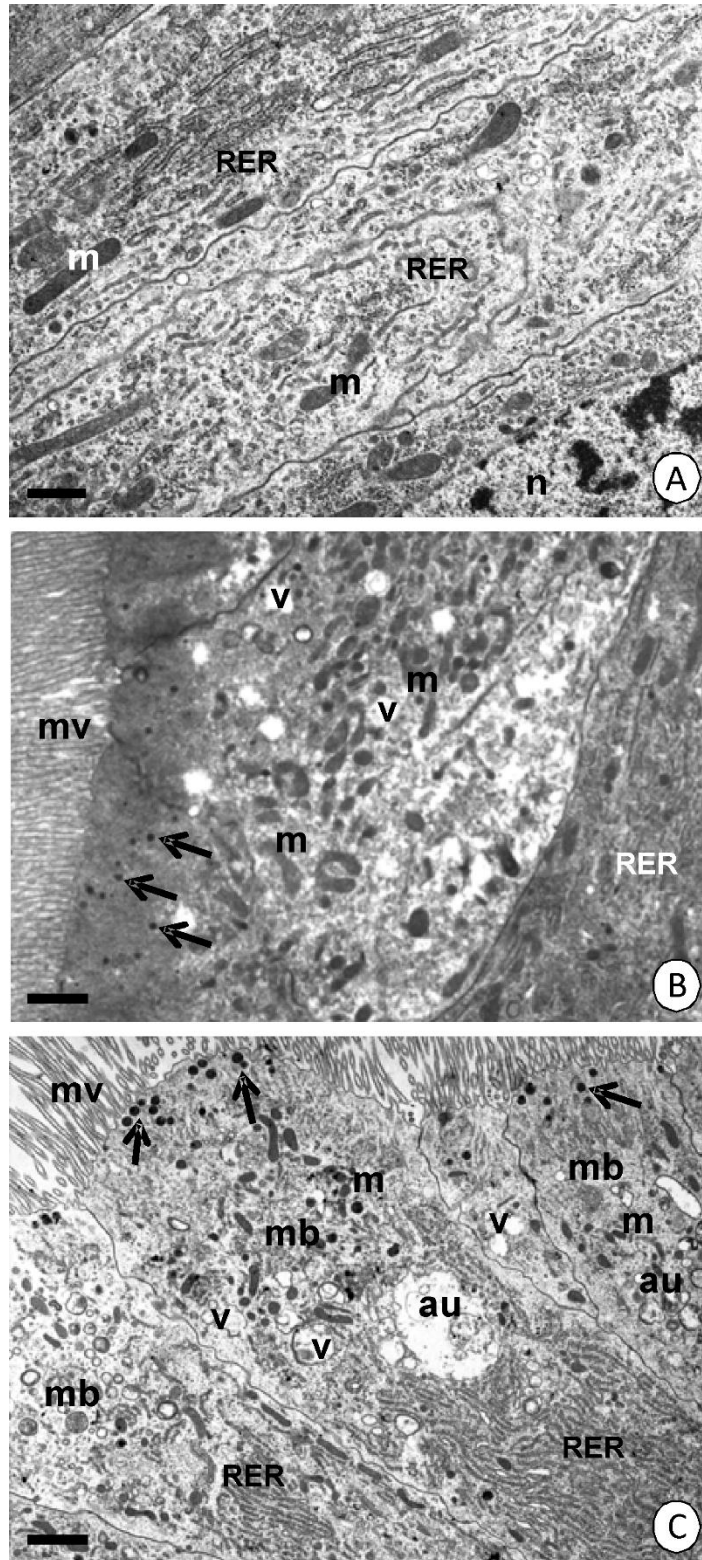
Cytoplazma komórek trawiennych w grupie zwierząt traktowanych GO+Mn<sup>2+</sup> cechowała się znaczną ilością ciał pęcherzykowatych, autofagosomów, wakuoli oraz ziarnistości o dużej gęstości elektronowej (prawdopodobnie lizosomów). Również nie odnotowano zmian w ultrastrukturze komórek regeneracyjnych (Rys. 43 C).

## 16.4.3. Jelito tylne

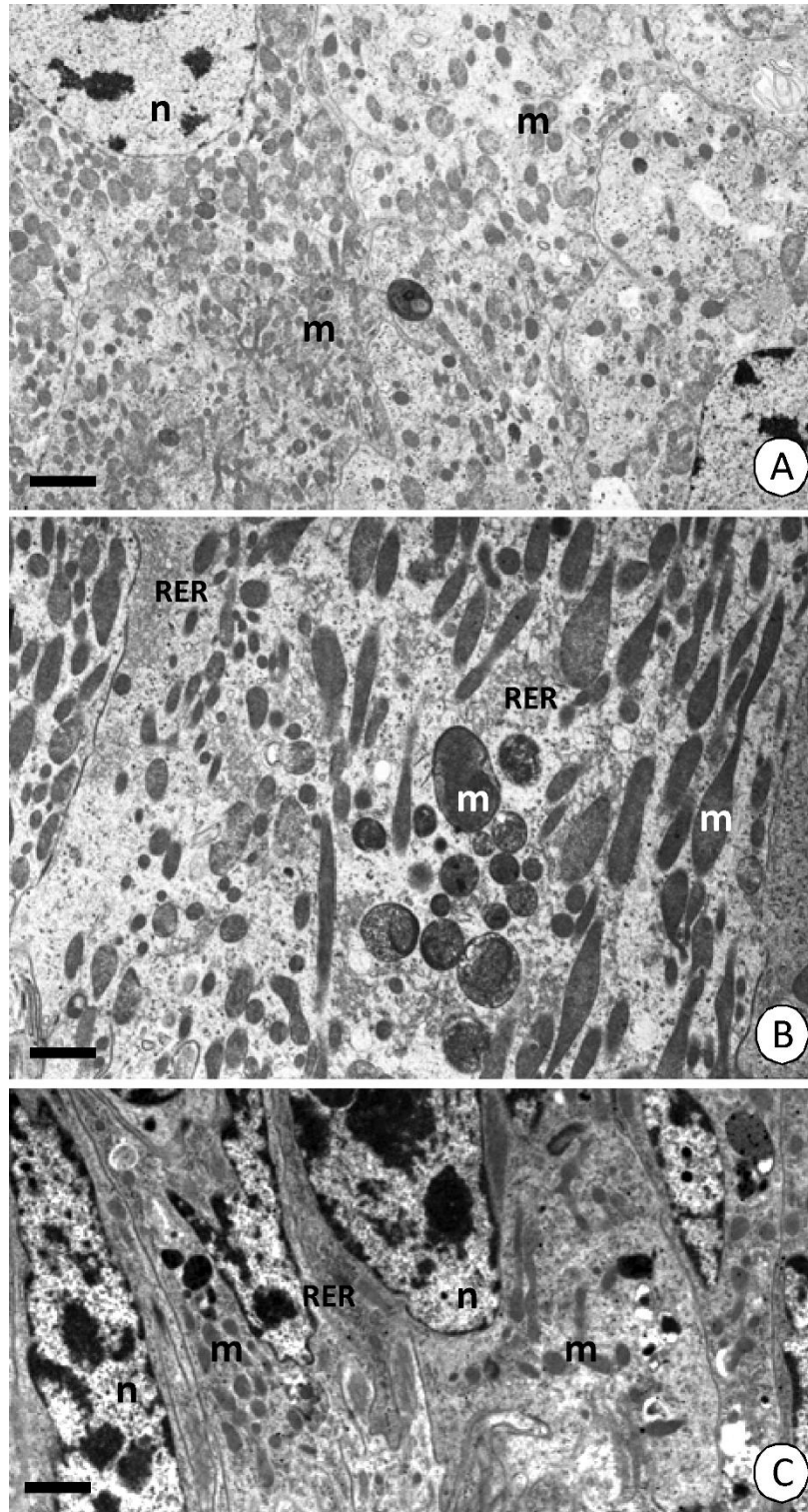
Nabłonek jelita tylnego zbudowany jest z położonych na blaszce podstawnej pojedynczej warstwy komórek pokrytych od strony jego światła warstwą kutikuli.

### 16.4.3.1. Tlenek grafenu GO oraz tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu GO+Mn<sup>2+</sup>

Analiza mikroskopowa jelita tylnego *A. domesticus* nie wykazała żadnych różnic w odniesieniu do grupy kontrolnej (Rys. 44 A) zarówno u zwierząt karmionych pokarmem z obecnością GO (Rys. 44 B), jak i w grupie narażonej na GO+Mn<sup>2+</sup> (Rys. 44 C).



**Rysunek 43.** Przekrój jelita środkowego *A. domesticus* po 10 dniach ekspozycji na pokarm zawierający GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> (A) kontrola (TEM; Bar = 0,7 μm) (B) grupa traktowana GO (TEM; Bar = 0,9 μm) (C) grupa traktowana GO+Mn<sup>2+</sup> (TEM; Bar = 1,4 μm). **Objaśnienia:** cysterny retikulum endoplazmatycznego szorstkiego (RER), mitochondria (m), jądro (n), ciała wielopęcherzykowe (mb), mikrokosmki (mv), wakuole (v), autofagosomy (au), ziarnistości o dużej gęstości elektronowej (strzałki); zdjęcia opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.



**Rysunek 44.** Przekrój jelita tylnego *A. domesticus* po 10 dniach ekspozycji na pokarm zawierający GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> (A) kontrola (TEM; Bar = 1,4 μm) (B) grupa traktowana GO (TEM; Bar = 0,9 μm) (C) grupa traktowana GO+Mn<sup>2+</sup> (TEM; Bar = 2 μm). **Objaśnienia:** mitochondria (m), retikulum endoplazmatyczne szorstkie (RER), jądro (n); zdjęcia opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.



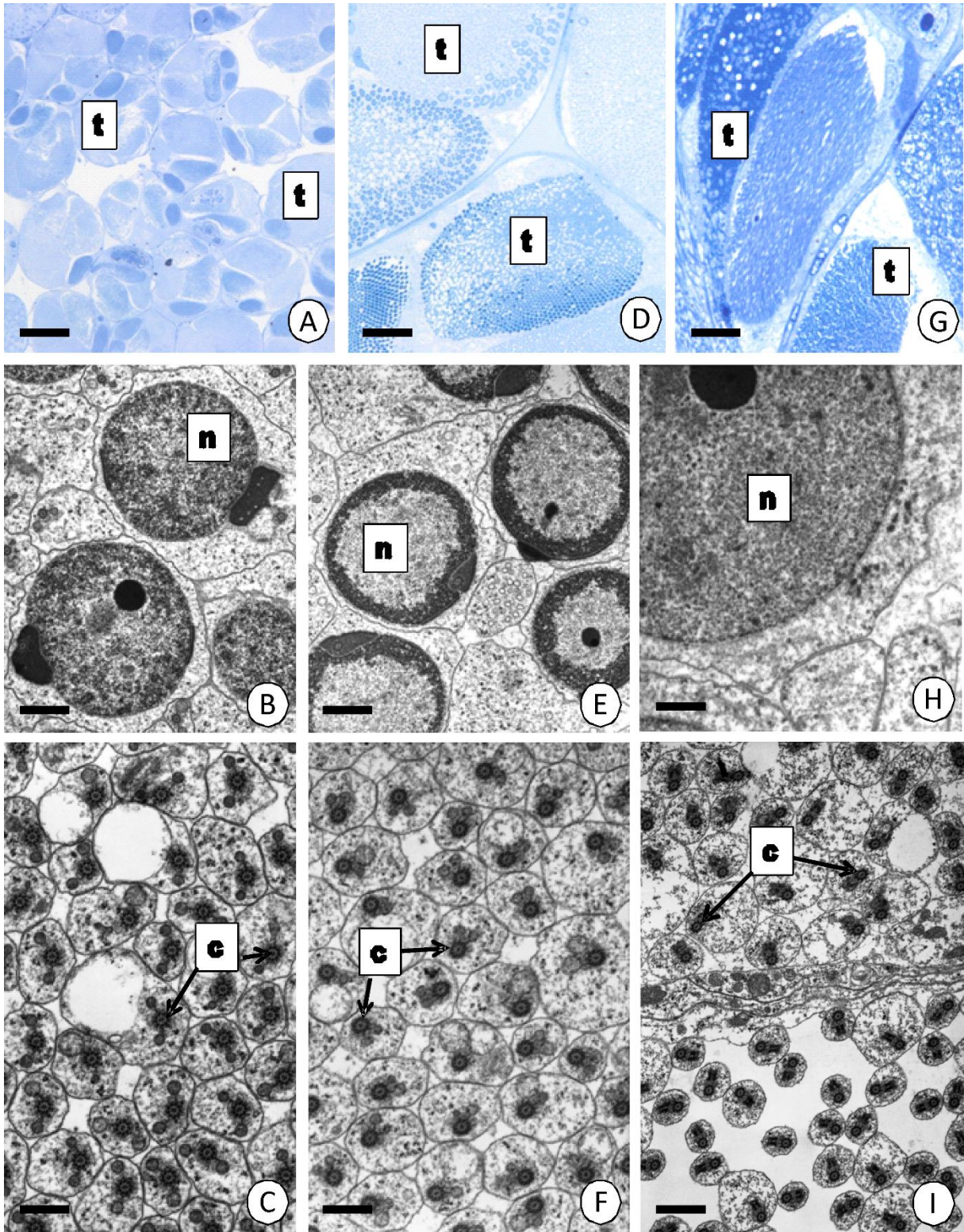
#### **16.4.4. Gonady męskie**

##### **16.4.4.1. Tlenek grafenu GO**

Obraz mikroskopowy cytoplazmy męskich gamet w różnych stadiach ich rozwoju (spermatogonii, spermatocytów oraz spermatyd) wykazał ubogą liczbę organelli, znaczną marginalizację chromatyny w jądrze komórkowym i degenerację mitochondriów. Centriole nie zostały uszkodzone. Wykryto liczne podziały mitotyczne (nie zaprezentowane na zdjęciach).

##### **16.4.4.2. Tlenek grafenu GO oraz tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu GO+Mn<sup>2+</sup>**

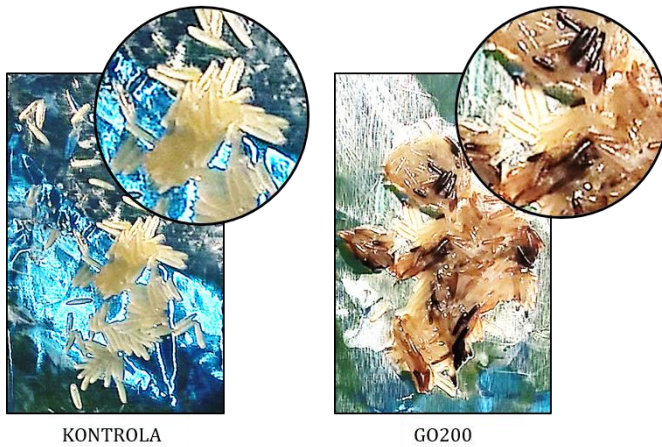
Elektronowa mikroskopia transmisyjna wykazała, że cała cytoplazma komórek gonad (spermatogonia, spermatocyty, spermatydy oraz plemniki) osobników z grupy traktowanej GO+Mn<sup>2+</sup> (Rys. 45 G, H, I) charakteryzowała się niską gęstością elektronową w porównaniu z grupą kontrolną (Rys. 45 A, B, C) oraz traktowaną czystym tlenkiem grafenu GO (Rys. 45 D, E, F). Zaobserwowano zmniejszoną liczbę organelli i degenerację wszystkich obecnych w cytoplazmie mitochondriów. Ponadto błona komórkowa większości komórek została uszkodzona. Nie zaobserwowano uszkodzeń dotyczących centrioli i kompleksów mikrotubul oraz nie wykryto podziałów mitotycznych.



**Rysunek 45.** Przekrój przez fragmenty gonad *A. domesticus* po 10 dniach ekspozycji na pokarm zawierający GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> (A-C) kontrola (A) mikroskopia świetlna, Bar = 70 μM. (B) TEM, Bar = 1 μM (C), TEM, Bar = 0,5 μM (D-F) grupa traktowana GO. (D) mikroskopia świetlna, Bar = 20 μM (E) TEM. Bar = 1 μM (F), TEM. Bar = 0,5 μM (G-I) grupa traktowana GO+Mn<sup>2+</sup> (G) mikroskopia świetlna, Bar = 20 μM (H) TEM, Bar = 1 μM. (I), TEM, Bar = 0,5 μM. Centriole (c), jądro (n), pęcherzyki jąder (t); zdjęcia opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.

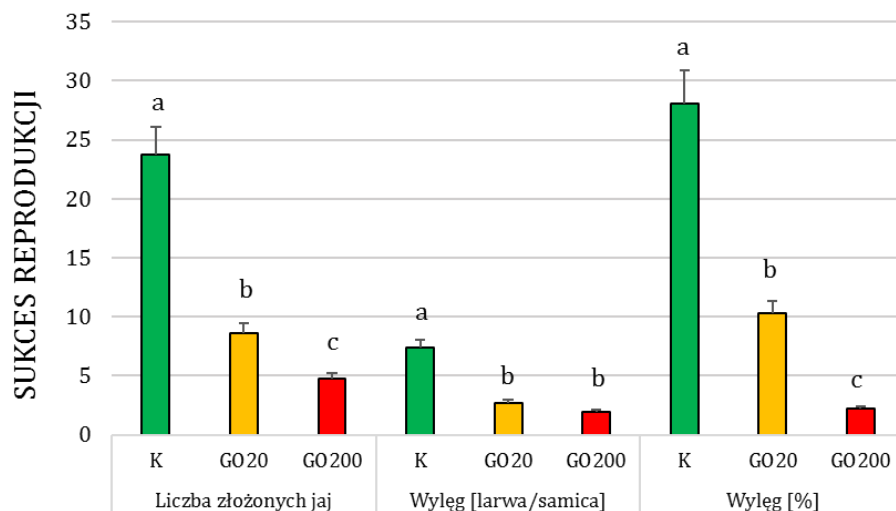
## 17. MODEL III

### 17.1. Sukces reprodukcji



**Rysunek 47.** Jaja złożone przez samice z grupy kontrolnej (K) oraz grupy o najwyższym stężeniu tlenu grafenu (GO200) (fot. własna).

Dwupokoleniowa ekspozycja na tlenek grafenu w pokarmie ma znaczący wpływ na zdolności reprodukcyjne *A. domesticus*. Ilość złożonych przez samice jaj była istotnie niższa w obu traktowanych grupach względem grupy kontrolnej. Samice karmione pokarmem o najwyższym stężeniu tlenu grafenu ( $200 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  pokarmu) złożyły prawie 5-krotnie mniejszą liczbę jaj względem grupy kontrolnej i 2-krotnie mniejszą liczbę, względem owadów karmionych pokarmem, w którym stężenie GO wynosiło  $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  pokarmu. Negatywny wpływ nanocząsteczek przełożył się także na liczbę kłujących się z jaj młodych osobników. Liczba larw owadów w przeliczeniu na jedną samicę była istotnie niższa w obu grupach karmionych tlenkiem grafenu. Sukces wylęgu osobników w grupie karmionej pokarmem zanieczyszczonym w najwyższym stężeniu

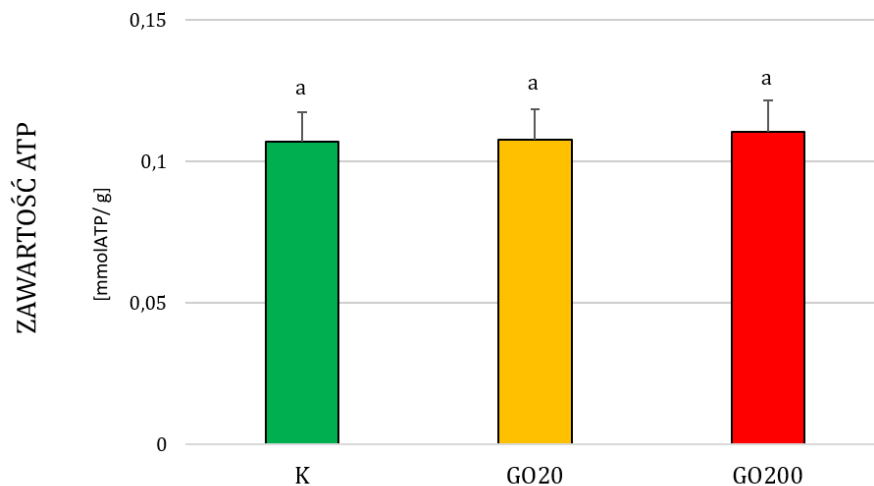


**Rysunek 46.** Parametry sukcesu reprodukcji dla trzech grup doświadczalnych (K, GO20, GO200): ogólna liczba złożonych jaj przez samice, ocena wylęgu z dokładnością do jednej larwy przypadającej na jedną samicę oraz ogólny procent wylęgu w grupach. **Objaśnienie:** różne litery (a, b, c) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi (NIR, ANOVA,  $p < 0.05$ )

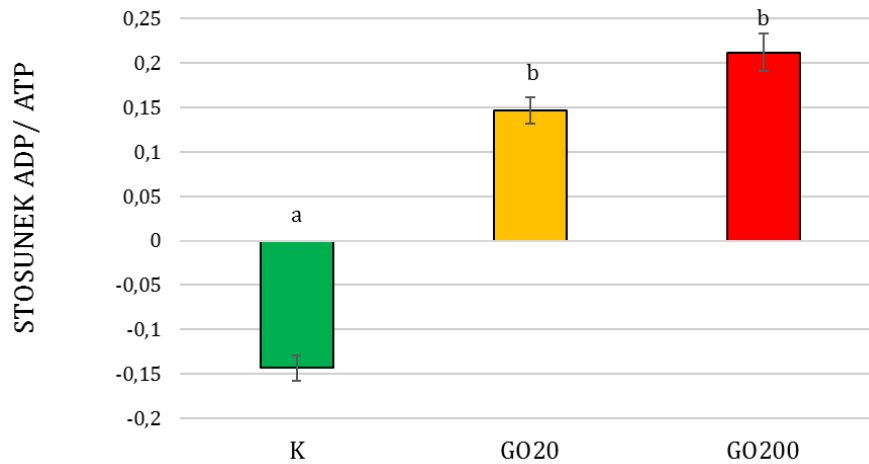
tlenkiem grafenu (GO200) był znacząco niższy, nie tylko względem grupy kontrolnej, ale również grupy GO20 ( $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  pokarmu) (Rys. 46). Ponadto, część jaj złożonych przez samice z grupy GO200 charakteryzowało się ciemnobrązową/ czarną barwą i wykazywało cechy nekrotyczne, czego nie stwierdzono w przypadku jaj pochodzących od owadów z grupy kontrolnej (Rys. 47).

### 17.2. Zawartość ATP

Długotrwałe narażenie na tlenek grafenu w pokarmie nie wpłynęło istotnie na zawartość ATP w tkankach owadów. Doświadczenie nie wykazało istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami traktowanymi nanocząstkami a grupą kontrolną. Wszystkie grupy eksperymentalne (K, GO20 oraz GO200) były homogenne (Rys. 48). W obu grupach owadów karmionych pokarmem z nanocząsteczkami GO, stężenie ADP było istotnie wyższe względem grupy kontrolnej, co znalazło odzwierciedlenie w istotnie wyższych wskaźnikach stosunku ADP/ ATP. Wskaźnik ten dla tkanek owadów z grup traktowanych GO był istotnie wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej (Rys. 49).



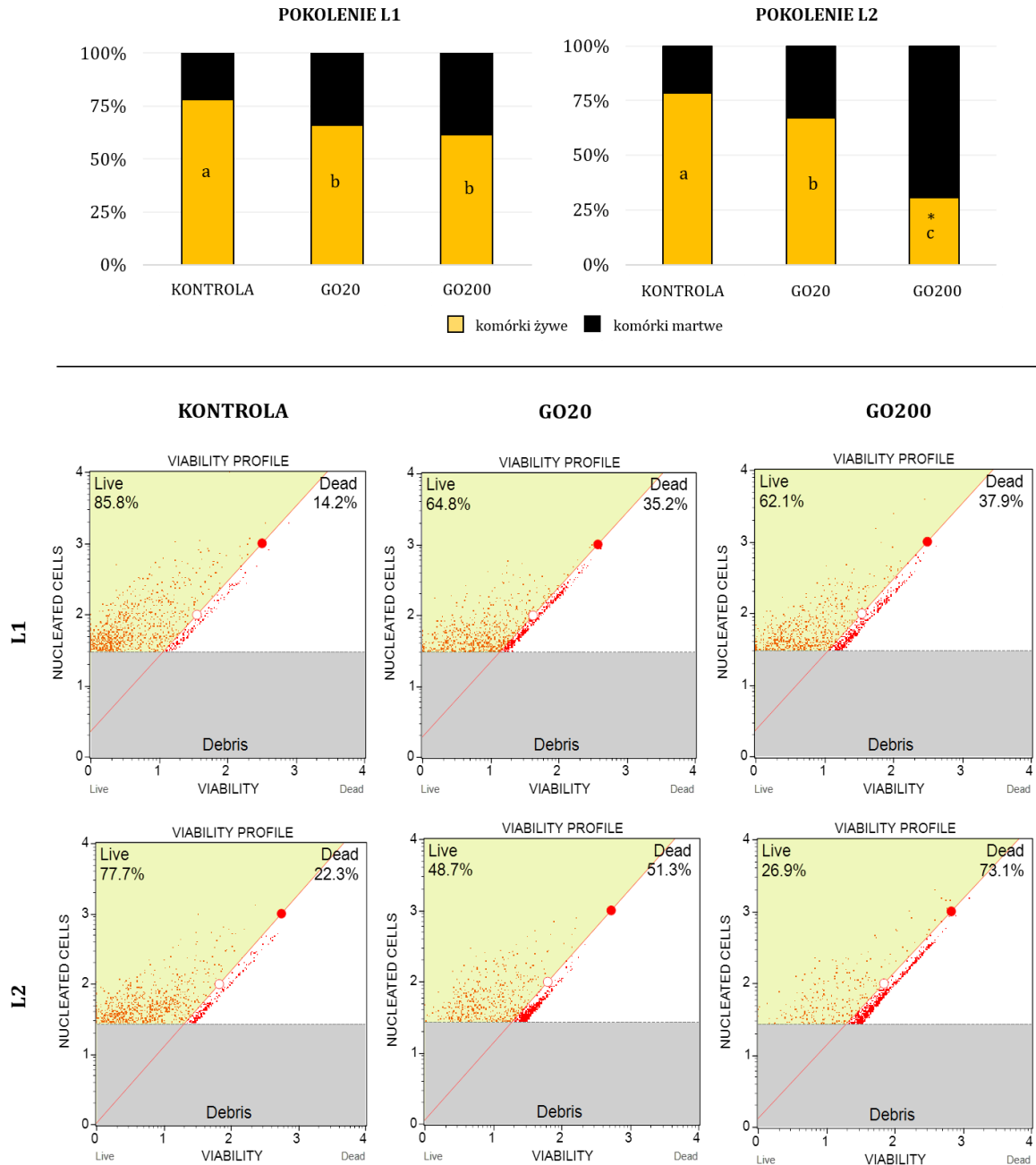
**Rysunek 48.** Zawartość ATP w tkankach *A. domesticus* po długotrwałej ekspozycji na GO w pokarmie. **Objaśnienie:** różne litery (a, b, c) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi (NIR, ANOVA,  $p < 0.05$ )



**Rysunek 49.** Stosunek ilości ADP do ATP w tkankach *A. domesticus* po długotrwałej ekspozycji na GO w pokarmie. **Objaśnienie:** różne litery (a, b) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi (NIR, ANOVA,  $p < 0.05$ )

### 17.3. Ocena cytometryczna uszkodzeń komórkowych

Test Muse® Count & Viability Assay Kit wykazał, że ilość żywych komórek w grupie kontrolnej owadów była najwyższa spośród wszystkich grup eksperymentalnych zarówno w pokoleniu L1 jak i pokoleniu L2. Długoterminowa ekspozycja na tlenek grafenu spowodowała wzrost śmiertelności komórek eksponowanych owadów. W pokoleniu L1 nie odnotowano statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą G020 a grupą G0200. Uszkodzenia komórkowe nasiliły się u osobników potomnych (pokolenie L2), co przejawiało się większą ilością martwych komórek w grupie G0200. Żywotność komórek owadów spożywających pokarm o najwyższym stężeniu nanocząsteczek osiągnęła wartość około 30%. Był to wynik istotny statystycznie względem tej samej grupy w pokoleniu L1 (Rys. 50).

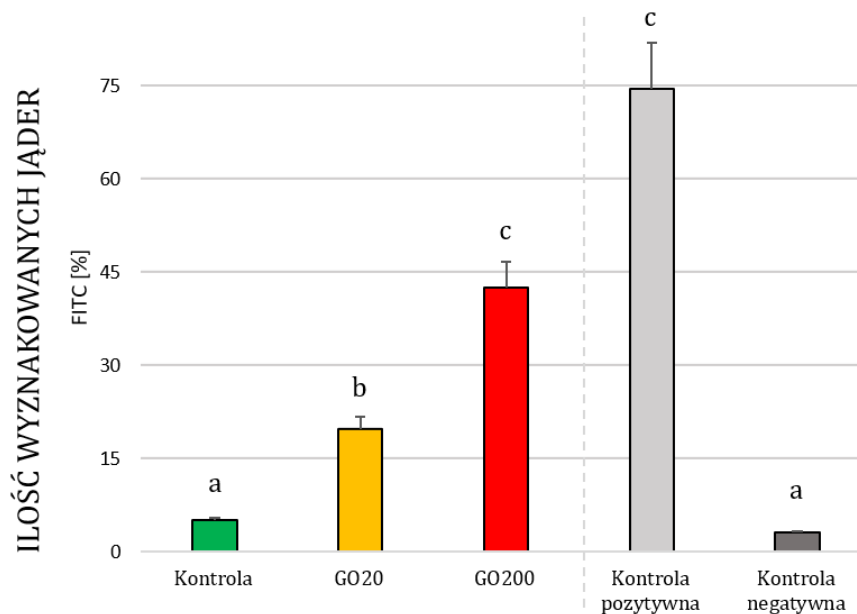


**Rysunek 50.** Stopień uszkodzeń w komórkach jelita *A. domesticus* po jedno- i dwupokoleniowej ekspozycji na GO w pokarmie. Wyniki otrzymane za pomocą testu Muse® Count & Viability Assay. **Objaśnienie:** różne litery (a, b, c) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi, \* - oznacza różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi w pokoleniu L1 i L2 (NIR, ANOVA,  $p < 0.05$ ).

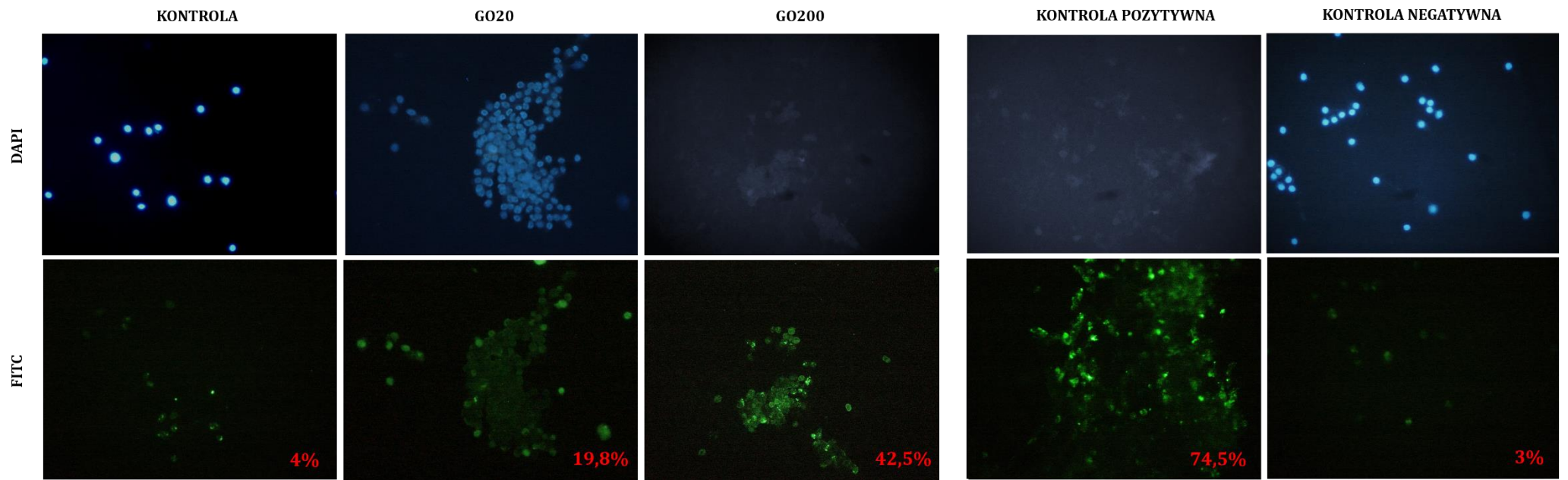
#### 17.4. Ocena stopnia apoptozy oraz uszkodzeń DNA metodą TUNEL

Analiza TUNEL wykazała, że częstotliwość jąder skoniugowanych z fluoresceiną (FITC) w kontroli pozytywnej (traktowanej *in vitro* H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) wynosiła 74,5% (745/ 1000 ocenianych jąder). Częstotliwość jąder wyznakowanych FITC dla kontroli negatywnej wynosiła jedynie 3% (Rys. 51).

Długotrwała ekspozycja na tlenek grafenu w pokarmie spowodowała fragmentację DNA i nasilenie apoptozy w hemocytach *A. domesticus* względem owadów z grupy kontrolnej. Wyniki były zależne od stężenia nanocząsteczek. W grupie owadów narażonych na tlenek grafenu w stężeniu  $20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  pokarmu zaobserwowano uszkodzenia DNA na poziomie 19,8%. Największy odsetek uszkodzeń i najwięcej wyznakowanych jąder FITC, spośród wszystkich grup doświadczalnych, zaobserwowano w grupie GO200 - traktowanej najwyższym stężeniem tlenku grafenu. W grupie owadów, które były zakwalifikowane do grupy kontrolnej apoptotyczne jądra stanowiły około 5% i na obrazach mikroskopowych dominowały struktury wybarwione DAPI (Rys. 51, 52).



**Rysunek 51.** Procentowy udział jąder wyznakowanych fluoresceiną (FITC) w trzech grupach doświadczalnych z uwzględnieniem kontroli pozytywnej i negatywnej. Procent liczony względem 1000 analizowanych jąder. **Objaśnienie:** różne litery (a, b, c) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi (test t-Studenta,  $p < 0,05$ ).



**Rysunek 52.** Obrazy mikroskopowe jąder hemocytów *A. domesticus* po długotrwałym traktowaniu nanocząsteczkami tlenku grafenu. Wyniki przedstawiono dla trzech grup eksperymentalnych z uwzględnieniem kontroli pozytywnej i negatywnej. Czerwona wartość [%] oznacza ilość jąder wyznakowanych FITC - procent uszkodzonych jąder (powiększenie 20x; Olympus BX40 Trinocular).



## V. DYSKUSJA

### 18. Ocena wybranych wskaźników odpowiedzi antyoksydacyjnej u *A. domesticus* po krótkotrwałym narażeniu na chemicznie czysty tlenek grafenu (GO) oraz GO zanieczyszczony jonami manganu (GO+Mn<sup>2+</sup>)

Grafen oraz jego utleniona forma – tlenek grafenu (GO) są niezwykle obiecującymi materiałami dla medycyny i przemysłu z powodu unikalnych właściwości fizykochemicznych. Idealny materiał wykorzystywany do celów aplikacyjnych powinien cechować się niską toksycznością i jednocześnie doskonałą biokompatybilnością. Najnowsze wyniki badań budzą jednak obawy odnośnie bezpieczeństwa stosowania grafenu i jego pochodnych [14,184]. Jak wspomniano w podrozdziale 9.1, istnieją już doniesienia o potencjalnej toksyczności GO dla organizmów bytujących na różnych poziomach organizacji biologicznej [91]. Mechanizm toksyczności tlenku grafenu jest bardzo skomplikowany (podrozdział 7.1) i może zależeć nie tylko od cech fizykochemicznych materiału, ale również od rozlicznych interakcji biochemicznych jakie zachodzą wewnątrz komórki. Istnieje kilka hipotez objaśniających mechanizm toksyczności tlenku grafenu. Przyjmuje się obecnie, że jednym z pierwszych skutków działania nanocząsteczek na organizm jest produkcja reaktywnych form tlenu (ROS) i nasilenie procesów antyoksydacyjnych. Lammel i wsp. w badaniach *in vivo* wykazali, że płatki tlenku grafenu powodują indukcję reaktywnych form tlenu w linii ludzkich komórek raka wątroby HEP G2. Wewnątrzkomórkowy stres oksydacyjny wzrastał się w ciągu 72h ale jego nasilenia nie zaobserwowano po zastosowaniu tlenku grafenu w niskich stężeniach (<4 µg/ mL). Wyniki te pozwalają przypuszczać, iż kluczową rolę w toksyczności odgrywa dawka oraz czas ekspozycji, tak jak to jest w przypadku innych substancji toksycznych. Ponadto, autorzy tej pracy zaobserwowali dezintegrację błony komórkowej, której przyczyną może być zarówno stres oksydacyjny, jak i ostre krawędzie płatek GO. Warto przypomnieć, że duża liczba gotowych do wejścia w reakcję niesparowanych elektronów powstaje podczas procesu sonikacji i jest obecna na krawędziach typu „zig-zag” [103]. Występowanie dużej liczby wysoce hydrofobowych krawędzi może być

źródłem toksyczności, zarówno dla organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych [104,105]. Należy pamiętać również, że podczas procesu syntezy tlenku grafenu łatwo jest skonsolidować produkt z jonami manganu, co może mieć negatywny wpływ na homeostazę komórki [106]. Wyniki otrzymane w niniejszej pracy, pozwalają wnioskować, że jony manganu ( $Mn^{2+}$ ) związane są z powierzchnią GO w postaci kompleksów  $Mn(H_2O)_6^{2+}$ . Prawdopodobnie, podczas sonikacji materiału następuje pęknięcie obecnych tam wiązań wodorowych i migracja jonów  $Mn^{2+}$  do roztworu. Takie zjawisko może być przyczyną większej toksyczności  $GO+Mn^{2+}$ . Innym, bardzo ważnym aspektem potencjalnej szkodliwości GO, którego nie należy zaniedbywać, jest możliwość jego chemicznej redukcji wewnątrz komórek. Coraz częściej w literaturze naukowej pojawiają się informacje, że tlenek grafenu może zostać zredukowany poprzez różne substancje organiczne [55,112,185,186]. Mechanizmy procesu takiej redukcji nie zostały jeszcze dokładnie objaśnione, jednakże przypuszcza się, że obejmują one wytwarzanie reaktywnych form tlenu i przyczyniają się do nasilenia stresu oksydacyjnego w komórkach. Należy zauważyć, że redukcja  $GO+Mn^{2+}$  spowodowałaby również uwolnienie wspomnianych wcześniej kompleksów manganu do środowiska wewnątrzkomórkowego.

W przedstawionych badaniach *in vivo* wykazano, że tlenek grafenu oraz tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu, gdy są podane drogą iniekcji do hemolimfy (dawka 0,1  $\mu$ L na 100 mg masy ciała owada) mogą powodować stres oksydacyjny u *A. domesticus*. Hemolimfa stanowi niezwykle ważny płyn ustrojowy w organizmie bezkręgowców, ponieważ, poza licznymi funkcjami odpornościowymi, za jej pośrednictwem odbywa się transport składników odżywczych, metabolitów oraz toksyn. Hemocyty, które stanowią znaczącą część hemolimfy są narażone na wszystkie czynniki wnikające do organizmu. Wstrzyknięcie nanocząsteczek do jamy ciała owadów może, w sposób uproszczony, stanowić model użycia GO jako nośnika leków. Wyrazem nasilonej obrony antyoksydacyjnej w hemolimfie były zmiany aktywności enzymów (katalazy, peroksydazy glutationowej), które chronią komórki przed stresem oksydacyjnym. Zaobserwowano, że istotny wzrost aktywności katalazy w hemolimfie (CAT) następował już w trakcie pierwszych 24 h eksperymentu (Rys. 31). Taką tendencję odnotowano także dla aktywności peroksydazy

glutationowej (Rys. 32). Główną funkcją wspomnianych enzymów jest dysproporcjonacja nadtlenu wodoru, co może stanowić uzasadnienie by sądzić, że po wstrzyknięciu GO w jamie ciała owada dochodzi do wzrostu zawartości  $H_2O_2$  [128]. Wzrost aktywności enzymów w ciągu 1 h od aplikacji mógł być związany z samą czynnością iniekcji, która, pomimo znieczulenia owada, może być także powodem krótkotrwałego stresu. Przerwanie ciągłości powłok ciała i pojawienie się obcej substancji w jej wnętrzu to zjawisko, z którym owady mogą zetknąć się w sposób naturalny. Dlatego jest wysoce prawdopodobne, iż w drodze ewolucji, wykształciły one szybki i skuteczny mechanizm obrony. Jednym z uniwersalnych reakcji może być nasilenie procesów antyoksydacyjnych, poprzez wzrost aktywności katalazy i peroksydaz. Natomiast w późniejszym czasie po iniekcji, dochodzić mogło do jego dalszego rozprządzenia po organizmie za pośrednictwem hemolimfy. Przy założeniu, że uszkodzenia tkanek mogą zachodzić na skutek kontaktu z ostrymi krawędziami GO, ostateczny los nanocząsteczek i możliwe skutki ich biodystrybucji są nadal bardzo trudne do przewidzenia.

Analiza zmian poziomu całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC), który jest parametrem syntetycznym, zasadniczo nie ujawniła istotnych różnic pomiędzy grupami badanych owadów, poza dwoma wyjątkami (Rys. 33). Porównanie wyników testem GLM ( $p < 0,05$ ) wykazało, iż w przypadku tego parametru znaczenie miał jedynie typ zaaplikowanego tlenu grafenu, natomiast czas trwania eksperymentu oraz rodzaj pobranej tkanki nie wpłynęły na istotność różnic między grupami doświadczalnymi (Tabela 3). Można zatem wnioskować, że całkowity poziom przeciwutleniaczy w organizmie był podobny (biorąc pod uwagę czas i tkankę), ale ulegał zmianie pod wpływem typu wstrzykiwanych nanocząsteczek GO. Wskazuje to na intensyfikację stresu oksydacyjnego w komórkach pod wpływem zanieczyszczonego manganem materiału.

Parametr TAC odpowiada za skumulowane działanie wszystkich przeciwutleniaczy znajdujących się w płynach ustrojowych organizmu. Jest to bardzo ogólny parametr, charakteryzujący zbiorczo antyoksydanty zaangażowane w obronę organizmu podczas narażenia na stres oksydacyjny [181]. W przypadku subtelnych zmian powodowanych przez niskie dawki GO, odpowiedź TAC wydaje się być mniej czuła a przez to mniej znacząca

z diagnostycznego punktu widzenia. Uzyskany wynik pozwala zatem domniemywać, iż jednokrotne podanie nanocząsteczek poprzez iniekcję w dawkach opisanych powyżej mobilizuje organizm do obrony, który jest w stanie poradzić sobie z toksycznością tej substancji.

Analiza wyników dotyczących białek szoku cieplnego (HSP 70) również uwidoczniała bardzo ciekawe zależności. Porównanie danych testem GLM ( $p < 0,05$ ) wykazało, iż parametr HSP 70 był zależny nie tylko od rodzaju podanego tlenku grafenu ale także od czasu jak i rodzaju badanej tkanki (Tabela 3). Wzrost ekspresji białek odnotowano w hemolimfie dopiero po 24 h od rozpoczęcia eksperymentu. Zatem statystycznie istotne zmiany w przypadku tego parametru pojawiają się później, w porównaniu do aktywności katalazy i peroksydazy glutationowej (Rys. 34). Najprawdopodobniej podwyższony poziom tych białek w tym późniejszym punkcie czasowym jest związany z ich rolą w organizmie. Synteza chaperonów wzrasta, kiedy komórki są narażone na działanie czynników stresowych, ale białka HSP działają także jako białka opiekuńcze, które są odpowiedzialne między innymi za degradację enzymów i innych uszkodzonych cząsteczek lub zużytych podczas reakcji biochemicznych [131]. Najprawdopodobniej w pierwszych 24 godzinach eksperymentu miało miejsce nasilenie procesów neutralizujących stres oksydacyjny (przejawiający się między innymi poprzez wzrost aktywności enzymów). Natomiast w późniejszym czasie (od 48h) następowała odbudowa struktur komórkowych, synteza dodatkowych białek oraz alokacja energii w kierunku usuwania uszkodzonych/ wadliwie pofałdowanych białek (Rys. 31-34). Wykorzystany w doświadczeniu tlenek grafenu był poprodukcyjnie zanieczyszczony jonami manganu co potwierdzają wyniki zaprezentowane na Rys. 19. Dane literaturowe donoszą, iż stopień czystości tlenku grafenu (obecność w jego strukturze różnych jonów metali) może mieć znaczący wpływ na stopień toksyczności tego materiału. Yang i wsp. opisali, że cząsteczki metaliczne wykazywały znacznie większą szkodliwość niż cząsteczki niemetaliczne [96]. W swojej pracy Ali-Boucetta i wsp. potwierdzają, iż czystość tlenku grafenu ma duży wpływ na jego potencjalną przydatność jako materiału biomedycznego. GO dokładnie oczyszczony z metalicznych zanieczyszczeń nie wywołuje znaczących reakcji cytotoksycznych *in vitro* oraz *in vivo* w porównaniu z tlenkiem grafenu nieoczyszczonym [57]. W prezentowanych badaniach stopień

czystości użytego nanomateriału miał umiarkowany wpływ na mierzone parametry. Efekt różnego oddziaływania obu typów materiałów użytych w doświadczeniu był szczególnie widoczny w przypadku katalazy, gdzie zwiększona aktywność tego enzymu względem kontroli, była stwierdzona we wszystkich punktach czasowych dla owadów traktowanych GO+Mn<sup>2+</sup> (Rys. 31). Jakkolwiek, odwrotną zależność prezentują wyniki dotyczące aktywności peroksydazy glutationowej (GSTPx), gdzie zarówno w hemolimfie jak i w jelicie wzrost aktywności tego enzymu był statystycznie istotny w grupach traktowanych czystym tlenkiem grafenu (GO) (Rys. 32).

Zaobserwowane subtelne różnice w aktywności ocenianych parametrów mogą być również związane z rozmiarem płatków, które były obecne w obu próbkach tlenku grafenu. Związek pomiędzy wielkością nanocząsteczki a jej potencjałem cytotoksycznym został opisany przez Karlsson i wsp. Badania toksykologiczne wykonane przez tą grupę wykazały, że cząsteczki poniżej 100 nm cechują się znacznie większą toksycznością w porównaniu do cząsteczek o wielkości rzędu kilku mikrometrów [120]. W przeprowadzonym przeze mnie eksperymencie użyto płatków o nieco różnych rozmiarach, pomimo faktu, iż parametry sonikacji dla obu próbek (GO i GO+Mn<sup>2+</sup>) były jednakowe. Poznanie przyczyny takiego zjawiska wymaga dalszych eksperymentów, ponieważ na tym etapie wysunąć można kilka hipotez. Prawdopodobnie, kompleksy Mn(H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub><sup>2+</sup>, z powodu tworzenia licznych wiązań wodorowych, zwiększają agregację płatków w zawieszynie. Możliwe jest również, że podczas procesu oczyszczania powierzchnia GO staje się bardziej odporna na ultradźwięki. Istotny jest jednak fakt, że najmniejsze rozmiary płatków (w przedziale setek nanometrów) występowały w obu próbkach (Rys. 21). Zarówno GO jak i GO+Mn<sup>2+</sup> bez wątpienia przyczyniły się do nasilenia stresu, w wyniku którego, w obu przypadkach odnotowano intensyfikację procesów biochemicznych i fizjologicznych zmierzających w kierunku odzyskania homeostazy organizmu. Nasilenie mechanizmów obrony antyoksydacyjnej w obu badanych tkankach (hemolimfa, jelito) stanowiło podstawę do odrzucenia hipotezy H1,0 i przyjęcia zaproponowanej hipotezy alternatywnej H1,1 (nanocząsteczki tlenku grafenu ulegną dystrybucji w organizmie co spowoduje znaczące nasilenie stresu oksydacyjnego). W celu wyjaśnienia mechanizmów toksyczności tlenku grafenu

niezbędne są dalsze, szczegółowe analizy. Odmienny sposób podaży materiału a także inna dawka oraz czas ekspozycji owadów na GO pozwolą uzyskać nowsze dla nauki dane.

Omówione powyżej wyniki badań opublikowano w *Journal of Hazardous Materials* 305: 30-40. Dziewięcka i wsp. (2015) „*Evaluation of in vivo graphene oxide toxicity for Acheta domesticus in relation to nanomaterial purity and time passed from the exposure*”.

## **19. Określenie stopnia stresu oksydacyjnego, analiza uszkodzeń komórkowych oraz zmian histologicznych u *A. domesticus* wskutek krótkoterminowego narażenia na obecność tlenku grafenu (GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>) w pokarmie**

Jak wspomniano powyżej, stres oksydacyjny jest uznawany za najbardziej prawdopodobny mechanizm toksyczności nanocząsteczek powstałych na bazie grafenu. Wstrzyknięcie tlenku grafenu do jamy ciała *A. domesticus* spowodowało szereg istotnych zmian w ciągu pierwszych trzech dni eksperymentu i przyczyniło się do wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) [119]. W omawianym eksperymencie owady zostały narażone na te same nanocząsteczki jak to opisano w MODELU I (GO, GO+Mn<sup>2+</sup>), jednakże sposób podaży i czas narażenia zostały zmienione. Zwierzęta eksponowano na działanie tlenku grafenu w pokarmie przez 10 dni. Zastosowano pokarm zanieczyszczony GO w stężeniu 200 µg · g<sup>-1</sup> pokarmu.

Wyniki pozwoliły ustalić, że spożywany przez *A. domesticus* tlenek grafenu przyczynił się do nasilenia stresu oksydacyjnego w organizmie. Zostało to potwierdzone wzrostem aktywności CAT i ogólnego poziomu TAC (Rys. 35 a, b, c, d). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż istotne różnice pojawiły się dopiero w ostatnim dniu eksperymentu. Tkanka jelita stanowiła pierwszą linię narażenia i obrony, dlatego stosunkowo późne nasilenie aktywności badanych enzymów oraz brak wyraźnych różnic pomiędzy tkankami - jelitem a hemolimfą - były pierwotnie zaskakujące (Rys. 35 a, b, c, d). W mechanizmie toksyczności badanego tlenku grafenu, ponownie, kluczową rolę mogły odgrywać właściwości fizykochemiczne materiału. Przygotowanie pożywki zanieczyszczonej GO wymagało dokładnego zmielenia standardowej karmy dla *A. domesticus*, a następnie bardzo dokładnego wymieszania jej z odpowiednią objętością dyspergatu tlenku grafenu. Po kontakcie nanocząsteczek z organicznymi składnikami pokarmu, a następnie środowiskiem enzymów trawiennych w jelicie, na powierzchni tlenku grafenu najpewniej dochodzi do wielu szybkich reakcji chemicznych. Jednym z możliwych scenariuszy jest redukcja tlenku grafenu do nierozpuszczalnego, zredukowanego tlenku grafenu (rGO). We wcześniejszych pracach wykazano, że zarówno GO jak i rGO wpływają na integralność błon

komórkowych w wyniku oddziaływania nanocząsteczek z dwuwarstwą fosfolipidową. Ostre krawędzie nanopłatków mogą powodować uszkodzenia mechaniczne struktur komórkowych. Liu i wsp. dowiedli, że potencjał antybakteryjny grafitu, tlenku grafenu oraz zredukowanego tlenku grafenu związany jest z uszkodzeniem błon komórkowych i stresem oksydacyjnym. Autorzy prac postulują, że bezpośredni wpływ na stopień toksyczności tych związków ma ich budowa fizykochemiczna, gęstość grup funkcyjnych oraz wielkość płatków [187,188]. W przeprowadzonych w niniejszej pracy badaniach stwierdzono poważne uszkodzenia przedniego odcinka jelita *A. domesticus*, które spożywały pokarm z zawartością nanocząsteczek (Rys. 42). Wyniki niniejszej pracy potwierdzają zatem wyżej zaproponowany mechanizm toksyczności GO.

Aktywność katalazy (CAT) i poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) wzrosły dopiero po 10 dniach narażenia na tlenek grafenu w pokarmie, jednakże uszkodzenia DNA pojawiły się już drugiego dnia ekspozycji na nanocząsteczki i utrzymywały się do ostatniego dnia eksperymentu na podobnym poziomie w obu grupach owadów traktowanych tlenkiem grafenu (GO, GO+Mn<sup>2+</sup>). Należy przypuszczać, że tlenek grafenu może przenikać przez nabłonek do jamy ciała i destabilizować funkcjonowanie różnych tkanek w organizmie. Nagromadzenie wielu reaktywnych form tlenu w komórkach może prowadzić do uszkodzenia DNA na drodze wtórnej (podrozdział 8.2.2). Stwierdzona na obrazach histologicznych obecność hemocytów pomiędzy uszkodzonymi komórkami nabłonka jelita przedniego może być konsekwencją trwającego procesu regeneracji. Rola hemocytów w procesach zapalnych i gojeniu ran jest kluczowa. Aktywna migracja hemocytów przez nabłonek w przypadku procesu naprawy uszkodzonych tkanek jest opisywana w innych pracach. Parisi oraz Vidal zaprezentowali na przykładzie *Drosophila melanogaster* mechanizm migracji hemocytów podczas gojenia się ran. Co ciekawe, środowisko nadtlenu wodoru (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) stanowiło siłę napędową chemotaksji tych komórek. Inne badania dostarczają wielu informacji na temat mechanizmu migracji komórek nabłonkowych z ich pierwotnej lokalizacji do otaczających tkanek, na przykład w procesie tworzenia przerzutów, które są najgroźniejszą formą progresji raka [189]. Nie można również wykluczyć hipotezy zakładającej, że nanocząsteczki tlenku grafenu mogą przenikać na teren jądra komórkowego poprzez pory



jądrowe i bezpośrednio oddziaływać z DNA (mechanizm pierwotny, podrozdział 8.2.1). Końcowym efektem opisanych powyżej zdarzeń może być zakłócenie cyklu komórkowego i skierowanie komórki na drogę apoptozy [73]. Wyniki uzyskane przy użyciu testu Muse® Cell Cycle Assay Kit wykazały pewną dysproporcję w fazach cyklu komórkowego, które są zależne od typu tlenku grafenu oraz czasu ekspozycji (Rys. 41). Po dwóch dniach narażenia na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> zaobserwowano, że w fazie G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> zatrzymała się znacznie większa liczba komórek. Blok komórek w fazie G<sub>1</sub> ma miejsce na skutek obecności wielu niekorzystnych czynników środowiskowych oraz mutacji i stanowi rodzaj „punktu kontrolnego”. Uniemożliwia to przejście komórki w fazę S i replikację wadliwego materiału genetycznego [190]. W dziesiątym dniu ekspozycji na nanocząsteczki GO, znaczna część komórek została zatrzymana w fazie G<sub>2</sub>/M. Jest to kolejny punkt „kontrolny”, który daje możliwość naprawy uszkodzonego DNA przed wejściem komórki w proces mitozy [191]. Wykonane testy Muse® Oxidative Stress Kit oraz Muse® Annexin V and Dead Cell Assay Kit wykazały intensyfikację stresu oksydacyjnego i nasilenie apoptozy w komórkach jelita owadów traktowanych GO (Rys. 38 - 40). Wszystkie przeprowadzone analizy biochemiczne, cytometryczne i histologiczne potwierdziły, że obecność tlenku grafenu w pokarmie prowadzi do licznych, niekorzystnych zmian w organizmie. Otrzymane wyniki pozwoliły definitywnie odrzucić hipotezę H:2,0. Zaprezentowany w tej pracy eksperyment pokazuje, że wyniki badań nad toksycznością tlenku grafenu *in vivo* są spójne i komplementarne z wynikami badań otrzymywanych w modelach *in vitro* [116,138,192].

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) wykazała liczne zmiany w ultrastrukturze jelita. Karpeta-Kaczmarek i wsp. wykazali, że nanodiamenty podawane w diecie w stężeniu 200 µg · g<sup>-1</sup> pokarmu także przyczyniają się do uszkodzenia i dysfunkcji jelit *A. domesticus*. Najbardziej uszkodzonym fragmentem przewodu pokarmowego był jednak odcinek jelita środkowego [193]. Przeprowadzone w tej pracy doświadczenia pokazały, że liczba autofagosomów, wakuoli i granulek o znacznej gęstości elektronowej wzrosła w cytoplazmie komórek nabłonka jelita środkowego obu grup eksperymentalnych (GO, GO+Mn<sup>2+</sup>). Ważne jest by w tym miejscu pamiętać, że autofagia stanowi mechanizm chroniący komórkę przed czynnikami pozakomórkowymi [194,195].

Strukturami o dużej gęstości elektronowej były prawdopodobnie lizosomy, jednakże nie można wykluczyć akumulacji i odkładania się nanocząsteczek w tkankach. Są to przypuszczenia trudne do zweryfikowania na tym etapie badań z powodu ograniczeń wynikających z możliwości metod instrumentalnych autora pracy (rozdział 6).

Najważniejszym odkryciem omawianych badań jest stwierdzenie licznych zmian degeneracyjnych obecnych w strukturze męskich gonad *A. domesticus* po 10 dniowym narażeniu na tlenek grafenu w pokarmie (Rys. 45). Informacje o wpływie tlenku grafenu na zdolności rozrodcze zwierząt są ciągle jeszcze bardzo ubogie. Zespół Zhao wykazał, że GO może zmniejszać zdolność reprodukcyjną nicienia *Caenorhabditis elegans* poprzez uszkodzenia gonad. Zaobserwowano również zatrzymanie cyklu komórkowego, nasiloną apoptozę oraz uszkodzenia DNA w komórkach [91,196]. Ponadto, tlenek grafenu powodował opóźnienie wylęgu zarodków *Danio rerio* [70]. Na podstawie otrzymanych wyników w MODELU II można zakładać, że nanocząsteczki ulegają szybkiej dystrybucji w ciele zwierząt. Są to wystarczające dane do przyjęcia hipotezy H:2,1 (mówiącą, że spożywane przez owady nanocząsteczki zadziałają podobnie, powodując znaczny wzrost aktywności parametrów stresu, poważne zmiany degeneracyjne w jelicie oraz wysoki procent uszkodzeń materiału genetycznego. Ponadto ulegną dystrybucji i spowodują degeneracyjne zmiany w gonadach męskich) za prawdziwą lub wysoce prawdopodobną. Istnieje zatem pewne ryzyko, że tlenek grafenu jeśli zostanie zastosowany na dużą skalę w produktach komercyjnych, to po przedostaniu się do środowiska i kontakcie z organizmem, może powodować wielonarządowe uszkodzenia i dalekosiężne konsekwencje.

Przedstawione wyniki badań zostały opublikowane w *Journal of Hazardous Materials* 328: 80-89. Dziewięcka i wsp. (2017) „*Short-term in vivo exposure to graphene oxide can cause damage to the gut and testis*”.

## 20. Wpływ długoterminowego narażenia na nanocząsteczki tlenku grafenu (GO) w kontekście zmian komórkowych oraz potencjału reprodukcyjnego *A. domesticus*

Niekorzystne skutki długoterminowego oddziaływania nanocząsteczek na organizmy są wciąż niewystarczająco udokumentowane. Dotychczas potwierdzono, że ekspozycja na tlenek grafenu zarówno *in vitro* jak *in vivo* prowadzi do nasilenia stresu oksydacyjnego, zaburzeń cyklu komórkowego, znacznych uszkodzeń DNA i apoptozy [197]. Ponadto, eksperymenty *in vivo* pokazały, że tlenek grafenu ulega szybkiej dystrybucji w organizmie i ma zdolność kumulowania się w różnych narządach powodując liczne uszkodzenia [198]. Szczególnie niepokojące są doniesienia o negatywnym wpływie GO na procesy związane z reprodukcją zwierząt. Rozwój nanotechnologii z pewnością przyczyni się do wzrostu obecności nanocząsteczek w środowisku naturalnym, a w konsekwencji może mieć pośredni, ujemny wpływ na zamieszkującą go faunę. Jak wzmiankowano powyżej, odnotowano już przypadki pogorszenia zdolności rozrodczych niektórych gatunków zwierząt (*Caenorhabditis elegans*, *Danio rerio*), nawet po krótkim kontakcie z tlenkiem grafenu [91].

W przeprowadzonym w ramach niniejszej pracy modelu eksperymentalnym (MODEL III) oceniono skutki długoterminowego, dwupokoleniowego narażenia na tlenek grafenu w pokarmie. Oszacowano zdolności reprodukcyjne owadów oraz żywotność komórek osobników potomnych. Eksperyment ten, dla pewności, powtórzono trzykrotnie - zawsze otrzymując taki sam rezultat. Wyniki doświadczenia pozwoliły odrzucić hipotezę H:3,0 i przyjąć zaproponowaną hipotezę H:3,1 (na skutek znacznych uszkodzeń histologicznych narządów rozrodczych oraz podwyższonego poziomu stresu oksydacyjnego w obu badanych grupach zaobserwuje się znaczny spadek ilości składanych jaj przez samice oraz związany z tym niski odsetek kłujących się młodych osobników). Eksperyment dowiódł, że obie grupy traktowane nanocząsteczkami cechowały się wyraźnie obniżoną zdolnością reprodukcji w porównaniu z grupą kontrolną. Samice składały niewielką ilość jaj, a wylęg nie zawsze kończył się sukcesem. Szczególnie niskim wskaźnikiem rozrodczości cechowała się grupa zwierząt spożywająca pokarm skażony tlenkiem grafenu

w wyższym stężeniu ( $200 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  pokarmu; grupa GO200) (Rys. 47). można założyć, że tlenek grafenu, ulegając szybkiej dystrybucji w organizmie, prowadzi do znacznych uszkodzeń aparatu rozrodczego samic. Należy także rozważyć równoczesne występowanie uszkodzeń zarówno męskich jak i żeńskich gonad. Mechanizm ujemnego oddziaływania tlenku grafenu na układ rozrodczy może być bardzo złożony. Zapewne przyczyniła się do niego w znacznym stopniu produkcja reaktywnych form tlenu i niska wydajność mechanizmów kompensacyjnych w ciele owadów, które znoszą nasilony stres oksydacyjny. Ponadto, morfologia jaj należących do grupy GO200 była wyraźnie zmieniona. Jaja cechowały się ciemną barwą, która jest charakterystyczna dla zmian martwiczych. Dalsze badania pozwolą określić, czy w jajach mogą być deponowane złogi nanocząsteczek (Rys. 46). Nie należy zatem wykluczać zdolności akumulowania się tlenku grafenu w osłonkach jajowych i/lub wewnątrz jaja. Istnieje przypuszczenie, iż nanocząsteczki odkładane są w chorionach i mogą uniemożliwić prawidłowy rozwój zarodka bądź utrudnić jego wylęg. Tlenek grafenu cechuje się niezwykle wytrzymałością i odpornością na zerwanie. Wbudowany w strukturę chorionu, może zatem, teoretycznie, wpływać na właściwości mechaniczne osłony jaja.

Do zaobserwowanego efektu najpewniej znacznie przyczyniły się właściwości fizykochemiczne materiału. Analiza składu chemicznego próbek (Tabela 1) wykazała, że użyty w doświadczeniu tlenek grafenu nie był wolny od reagentów stosowanych w procesie syntezy. Zanieczyszczony GO w środowisku płynów komórkowych może wchodzić w bardzo skomplikowane reakcje chemiczne i destabilizować pracę enzymów i funkcje innych białek. Ponadto należy wspomnieć, że materiał cechował się wysokim stopniem utlenienia (znaczny procent tlenowych grup funkcyjnych) i dużą niejednorodnością pod względem rozmiaru płatków (Rys. 27, 28). Co więcej, materiał użyty w tym doświadczeniu (MODEL III), częściej i chętniej tworzył agregaty w roztworze i wykazywał mniejsze powinowactwo do rozpuszczalnika niż materiał użyty w dwóch pierwszych modelach. Ponadto, ostre krawędzie GO mogły spowodować wiele zmian degeneracyjnych w gonadach żeńskich i/ lub uszkodzić strukturę jaj. Dzięki użyciu różnych stężeń tlenku grafenu wykazano, że chroniczna toksyczność nanocząsteczek GO nasilała się wraz ze wzrostem ich stężenia w pokarmie.

Podobną zależność zaprezentował zespół Xu, który ocenił zdolności reprodukcyjne myszy po iniekcji różnych stężeń zredukowanego tlenu grafenu (rGO). Wyniki pokazały, że nanocząsteczki oddziałują negatywnie na ciężę samic. W grupie traktowanych zwierząt opisano wiele przypadków zniekształconych płodów oraz poronień. Co ważne, negatywny efekt nanocząsteczek nasilał się wraz z aplikowaną dawką a także był skorelowany z zaawansowaniem ciąży [199]. Obniżony potencjał rozrodczy zwierząt w niniejszym doświadczeniu pozwolił wysunąć przypuszczenie, że owady traktowane GO będą cechowały się innym bilansem energetycznym w porównaniu do owadów z grupy kontrolnej. W warunkach stresowych organizm kieruje wysiłek energetyczny na usprawnienie mechanizmów obronnych związanych z aktywnością enzymów antyoksydacyjnych i innych procesów regeneracyjnych w komórkach (Rys. 15). Reprodukacja wiąże się ze znacznym wydatkiem energetycznym. Analiza z zastosowaniem testów bioluminescencyjnych wykazała, że zawartość ATP w komórkach *A. domesticus* nie różniła się istotnie pomiędzy wszystkimi grupami eksperymentalnymi, jednakże zgodnie z oczekiwaniami, ilość ADP względem produkowanego ATP była wyższa w grupach narażonych na tlenek grafenu (Rys. 48, 49). Odnotowane zmiany w stosunku ADP/ATP informują o dużym zróżnicowaniu komórek pod względem ich żywotności. Stabilny poziom ATP w grupie kontrolnej wskazuje na zrównoważone procesy fizjologiczne organizmu i znaczną ilość żywych komórek i/ lub komórek proliferujących. Zwiększona ilość ADP jest typowa dla komórek apoptotycznych/ nekrotycznych i wskazuje na trudności metaboliczne. Ponadto, niski poziom ATP może być związany również z zaburzeniami w działaniu mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Może to nastąpić wskutek degeneracji mitochondriów spowodowanej dużym stresem oksydacyjnym i uszkodzeniami mechanicznymi przez GO [132,200]. Namnażanie się komórek, ich żywotność oraz śmierć są regulowane poprzez złożone mechanizmy cyklu komórkowego. Jak zaprezentowano w dyskutowanym wyżej modelu eksperymentalnym (MODEL II), tlenek grafenu wpłynął znacząco na przebieg cyklu komórkowego. Otrzymane w modelach III i II wyniki są zatem względem siebie komplementarne (Rys. 47).

Żywotność komórek oraz ich aktywność metaboliczna są istotnymi parametrami w ocenie toksyczności nanocząsteczek, ponieważ szybko pokazują reakcję komórkową na stresor chemiczny. Ocena cytometryczna komórek jelita *A. domesticus* potwierdziła zwiększoną ilość komórek nekrotycznych, powstałych wskutek narażenia na tlenek grafenu w pokarmie. Ponadto, śmierć komórkowa nasiliła się w pokoleniu potomnym owadów (L2) i wyraźnie zróżnicowała w grupach traktowanych pokarmem o różnym stężeniu nanocząsteczek GO (Rys. 50). Osobniki potomne przyporządkowane do grupy GO200 charakteryzowały się istotnie niższą ilością żywych komórek względem grupy GO20 (L2), grupy kontrolnej (L2) oraz co ważne, również grupy kontrolnej osobników z pokolenia L1. Świadczy to o potencjalnej możliwości kumulowania się materiału, bądź też pewnych uszkodzeń w organizmie, i przekazywaniu ich do następnego pokolenia. Zespół badaczy z Chin dowiódł także, że nanocząsteczki mogą nieść wielopokoleniowe, negatywne konsekwencje. Użyty tlenek grafenu spowodował opóźnienie laktacji u ciężarnych myszy oraz skrócenie długości kosmków jelitowych, a także problemy z trawieniem u potomstwa [201].

Apoptoza i śmierć komórkowa są indukowane poprzez zmiany biochemiczne oraz morfologiczne w obrębie komórki. Oznaką późnej apoptozy jest fragmentacja materiału genetycznego, która oznacza liczne przerwy w dwuniciowej strukturze DNA [86]. Wizualizacja ilości uszkodzeń DNA metodą TUNEL ujawniła największą ilość uszkodzonego materiału genetycznego, a w konsekwencji największą ilość komórek apoptotycznych, w tkance jelita owadów, które spożywały pokarm z nanocząsteczkami. Stopień uszkodzeń był zależny od stężenia tlenu grafenu. Owady przyporządkowane do grupy GO200 cechowały się uszkodzeniami DNA na poziomie 42,5% (Rys. 51, 52). Oznacza to, że w tej grupie częstość występowania komórek apoptotycznych była niemal 10 krotnie większa niż w grupie kontrolnej i ponad 2 krotnie większa względem grupy GO20. Nie jest wykluczone, że pewne zmiany w obrębie materiału genetycznego mogły zostać przekazane potomstwu i stać się przyczyną nasilonych uszkodzeń w kolejnym pokoleniu owadów (L2).

## 21. Toksyczność tlenku grafenu u *Acheta domestica* - podsumowanie

Zrozumienie interakcji pomiędzy GO i systemami biologicznymi jest podstawową i bardzo ważną kwestią dla dalszego rozwoju nanotechnologii opartej na bazie grafenu. Zgromadzone dotychczas wyniki badań wskazują, że o toksyczności tlenku grafenu decyduje szereg różnych czynników, takich jak rozmiar płatków, obecność grup funkcyjnych oraz czystość chemiczna. Odpowiedź biologiczna *A. domestica* w zaprezentowanych modelach eksperymentalnych była zależna od właściwości fizykochemicznych nanocząsteczek, stężenia, metody ich aplikacji oraz czasu narażenia. Do głównych czynników wpływających na poziom toksyczności GO można zaliczyć stężenie cząstek oraz czas ekspozycji. Są to czynniki, które łatwo jest zmierzyć i ustalić pewien poziom progowy, zgodnie z którym tlenek grafenu może być uważany za bezpieczny lub szkodliwy też dla badanego organizmu. W tym celu muszą być jednak przeprowadzone dalsze badania.

Jak pokazały niniejsze badania, reakcje biochemiczne indukowane w organizmie przez nanocząsteczki mogą być niezwykle złożone. Zachowanie nanomateriału, pomimo dobrej znajomości jego budowy i właściwości chemicznych jest nadal trudne do przewidzenia. Bardzo istotny jest trafny wybór metod analitycznych oraz ocenianych parametrów, które posłużą jako biomarkery stresu powodowanego przez tlenek grafenu. Nie wszystkie wskaźniki toksyczności wykorzystane w niniejszej pracy doktorskiej okazały się skuteczne. Niektóre z nich, jak na przykład ekspresja białek HSP70 lub całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC) nie dały jednoznacznej odpowiedzi co do stopnia szkodliwości GO. Inne, jak na przykład aktywność enzymów antyoksydacyjnych (katalaza, peroksydaza glutationowa), żywotność komórek oraz ilość uszkodzeń DNA zmieniały się szybko pod wpływem ekspozycji na GO i wykazały ścisłą zależność z nasileniem stresu oksydacyjnego w organizmie.

## VI. WNIOSKI

- Krótkotrwałe narażenie na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup>, podane poprzez iniekcję do jamy ciała *A. domesticus* (dawka 0,1 µL na 100 mg masy ciała) przyczyniło się do nasilenia stresu oksydacyjnego u badanego gatunku owada. Oba typy nanocząsteczek nie są neutralne dla organizmu. Ocena aktywności wybranych enzymów antyoksydacyjnych wskazuje, że organizm radzi sobie ze stresem oksydacyjnym w ciągu pierwszych 24 h od podania.
- Krótkotrwałe, dziesięciodniowe narażenie na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> w pożywieniu (stężenie 200 µg · g<sup>-1</sup> pokarmu) przyczyniło się do wzrostu parametrów stresu oksydacyjnego, zaburzeń w cyklu komórkowym, nasilenia apoptozy komórek oraz uszkodzeń DNA badanych owadów. Powyższe wyniki są poważną przesłanką by sądzić, że tlenek grafenu przenika do wnętrza organizmu wraz ze składnikami pokarmowymi.
- Tlenek grafenu (zarówno GO jak i GO+Mn<sup>2+</sup>) wprowadzony do organizmu podlega szybkiej biodystrybucji i przyczynia się do licznych zmian degeneracyjnych w tkankach.
- Długotrwałe narażenie na nanocząsteczki tlenku grafenu (GO) w pokarmie (stężenie 20 oraz 200 µg · g<sup>-1</sup> pokarmu) powoduje znaczne obniżenie zdolności reprodukcyjnych *A. domesticus* przejawiające się zmniejszoną ilością składanych jaj oraz obniżonym wylęgiem. Wykazano silniejszą toksyczność w przypadku owadów traktowanych wyższym stężeniem GO.
- Pokolenie potomne *A. domesticus* cechowało się znacznym obniżeniem żywotności komórek w porównaniu do pokolenia rodzicielskiego, co pozwala sądzić, że tlenek grafenu może powodować wielopokoleniowe negatywne skutki.



**VII. LITERATURA**

- [1] R. Lopez, Applications and Issues in the Fields of Nanotechnology , Information Technology , Neurotechnology , and Biotechnology, Journal, Int. Bus. Soc. Sci. 4 (2013) 39–50.
- [2] J. Gleick, Geniusz : życie i nauka Richarda Feynmana, Zysk i S-ka, Poznań, 1992.
- [3] M.I. Katsnelson, Graphene: carbon in two dimensions, Mater. Today. 10 (2007) 20–27. doi:10.1016/S1369-7021(06)71788-6.
- [4] G. Roebben, H. Emons, G. Reiners, J.E. Decker, A.G. Steele, Nanotechnology Standards, 2011. doi:10.1007/978-1-4419-7853-0.
- [5] D. Vollath, Nanoparticles – Nanocomposites, Nanomaterials: An Introduction for Beginners, Wiley, 2015.
- [6] Y. Yang, A.M. Asiri, Z. Tang, D. Du, Y. Lin, Graphene based materials for biomedical applications, Mater. Today. 16 (2013) 365–373. doi:10.1016/j.mattod.2013.09.004.
- [7] F. Ahmed, D.F. Rodrigues, Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: A case study, J. Hazard. Mater. 256–257 (2013) 33–39. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.064.
- [8] N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek, Cytotoxicity of nanopartides, Small. 4 (2008) 26–49. doi:10.1002/sml.200700595.
- [9] <http://kem.akszugor.pl/historia-olowka-poczatki/>.
- [10] M. Kachel-Jakubowska, M. Szymanek, A.D. Hunek, Nanotechnologia- możliwości rozwoju i zastosowań., Konf. Innow. W Zarządzaniu I Inżynierii Prod. 1 (2015) 92–103.
- [11] Nobel Prize in Physics, (n.d.). [https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/2010/novoselov-facts.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2010/novoselov-facts.html).
- [12] J.N. Tiwari, R.N. Tiwari, K.S. Kim, Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced

- electrochemical energy devices, *Prog. Mater. Sci.* 57 (2012) 724–803.  
doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmatsci.2011.08.003>.
- [13] H. Craig, The geochemistry of the stable carbon isotopes, *Geochim. Cosmochim. Acta.* 3 (1953) 53–92. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0016-7037\(53\)90001-5](http://dx.doi.org/10.1016/0016-7037(53)90001-5).
- [14] J. Liu, L. Cui, D. Lasic, Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications, *Acta Biomater.* 9 (2013) 9243–9257.  
doi:[10.1016/j.actbio.2013.08.016](http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.08.016).
- [15] A. Bianco, Graphene: Safe or toxic? the two faces of the medal, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 52 (2013) 4986–4997. doi:[10.1002/anie.201209099](http://dx.doi.org/10.1002/anie.201209099).
- [16] A.K. Geim, K.S. Novoselov, The rise of graphene, *Nat Mater.* 6 (2007) 183–191.  
<http://dx.doi.org/10.1038/nmat1849>.
- [17] J.O. Sofo, A.S. Chaudhari, G.D. Barber, Graphane: A two-dimensional hydrocarbon, *Phys. Rev. B.* 75 (2007) 153401. doi:[10.1103/PhysRevB.75.153401](http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevB.75.153401).
- [18] <http://geology.com/minerals/graphite.shtml>.
- [19] G. Brady, *Materials handbook*, n.d.
- [20] L. Chen, P. Hu, L. Zhang, S. Huang, L. Luo, C. Huang, Toxicity of graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes against human cells and zebrafish, *Sci. China Chem.* 55 (2012) 2209–2216. doi:[10.1007/s11426-012-4620-z](http://dx.doi.org/10.1007/s11426-012-4620-z).
- [21] <http://www.nanoscience.com/applications/education/overview/cnt-technology-overview/>.
- [22] <https://www.cnet.com/news/carbon-nanotubes-enter-tour-de-france/>.
- [23] <http://www.student.chemia.uj.edu.pl/~klewando/Fulereny.pdf>.
- [24] E. Osawa, *Perspectives of Fullerene Nanotechnology*, Springer, 2002.  
<https://books.google.pl/books?id=dWlfhv7DPRoC>.
- [25] <http://www.szkolnictwo.pl/szukaj,Fulereny>.
- [26] <http://encyklopedia.pwn.pl/haslo/fulereny;3903151.html>.
- [27] L. Baweja, D. Gurbani, R. Shanker, A.K. Pandey, V. Subramanian, A. Dhawan, C60-

- fullerene binds with the ATP binding domain of human DNA topoisomerase II alpha., *J. Biomed. Nanotechnol.* 7 (2011) 177–178.
- [28] [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1996/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1996/).
- [29] <http://encyklopedia.pwn.pl/haslo/diament;3892443.html>.
- [30] <http://www.eoht.info/page/Antoine+Lavoisier>.
- [31] H. JUDITH GRENVILLE-WELLS, K. LONSDALE, X-Ray Study of Laboratory-made Diamonds, *Nature*. 181 (1958) 758–759. <http://dx.doi.org/10.1038/181758a0>.
- [32] <http://www.viadem.pl/Ksztalty-diamentow-krok-po-kroku-blog-pol-1471062172.html>.
- [33] V.N. Mochalin, O. Shenderova, D. Ho, Y. Gogotsi, The properties and applications of nanodiamonds, *Nat. Nanotechnol.* 7 (2011) 11–23. doi:10.1038/nnano.2011.209.
- [34] Y. Gao, X. Zou, J.X. Zhao, Y. Li, X. Su, Graphene oxide-based magnetic fluorescent hybrids for drug delivery and cellular imaging, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 112 (2013) 128–133. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.07.020.
- [35] S. Naahidi, M. Jafari, F. Edalat, K. Raymond, A. Khademhosseini, P. Chen, Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery, *J. Control. Release*. 166 (2013) 182–194. doi:10.1016/j.jconrel.2012.12.013.
- [36] G. Schroedera, Chemiczna funkcjonalizacja powierzchni dla potrzeb nanotechnologii, n.d.
- [37] T. Kuila, S. Bose, A.K. Mishra, P. Khanra, N.H. Kim, J.H. Lee, Chemical functionalization of graphene and its applications, *Prog. Mater. Sci.* 57 (2012) 1061–1105. doi:10.1016/j.pmatsci.2012.03.002.
- [38] L. Yan, Y.B. Zheng, F. Zhao, S. Li, X. Gao, B. Xu, P.S. Weiss, Y. Zhao, Chemistry and physics of a single atomic layer: strategies and challenges for functionalization of graphene and graphene-based materials, *Chem Soc Rev.* 41 (2012) 97–114. doi:10.1039/c1cs15193b.
- [39] T.O. Wehling, K.S. Novoselov, S. V. Morozov, E.E. Vdovin, M.I. Katsnelson, A.K. Geim, A.I. Lichtenstein, Molecular doping of graphene, *Nano Lett.* 8 (2008) 173–177.

- doi:10.1021/nl072364w.
- [40] M.E. Uddin, T. Kuila, G.C. Nayak, N.H. Kim, B.C. Ku, J.H. Lee, Effects of various surfactants on the dispersion stability and electrical conductivity of surface modified graphene, *J. Alloys Compd.* 562 (2013) 134–142.  
doi:10.1016/j.jallcom.2013.01.127.
- [41] E.E. Tkalya, M. Ghislandi, G. de With, C.E. Koning, The use of surfactants for dispersing carbon nanotubes and graphene to make conductive nanocomposites, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 17 (2012) 225–232.  
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2012.03.001.
- [42] H. Wang, S. Wang, H. Su, K.-J. Chen, A.L. Armijo, W.-Y. Lin, Y. Wang, J. Sun, K. Kamei, J. Czernin, C.G. Radu, H.-R. Tseng, A supramolecular approach for preparation of size-controlled nanoparticles., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 4344–4348.  
doi:10.1002/anie.200900063.
- [43] D. Depan, J. Shah, R.D.K. Misra, Controlled release of drug from folate-decorated and graphene mediated drug delivery system: Synthesis, loading efficiency, and drug release response, *Mater. Sci. Eng. C.* 31 (2011) 1305–1312.  
doi:10.1016/j.msec.2011.04.010.
- [44] D.J. Lim, M. Sim, L. Oh, K. Lim, H. Park, Carbon-based drug delivery carriers for cancer therapy, *Arch. Pharm. Res.* 37 (2014) 43–52. doi:10.1007/s12272-013-0277-1.
- [45] M. Terrones, A.R. Botello-Méndez, J. Campos-Delgado, F. López-Urías, Y.I. Vega-Cantú, F.J. Rodríguez-Macías, A.L. Elías, E. Muñoz-Sandoval, A.G. Cano-Márquez, J.C. Charlier, H. Terrones, Graphene and graphite nanoribbons: Morphology, properties, synthesis, defects and applications, *Nano Today.* 5 (2010) 351–372.  
doi:10.1016/j.nantod.2010.06.010.
- [46] Z.Q. Zhang, B. Liu, Y.L. Chen, H. Jiang, K.C. Hwang, Y. Huang, Mechanical properties of functionalized carbon nanotubes, *Nanotechnology.* 19 (2008) 395702.  
doi:10.1088/0957-4484/19/39/395702.
- [47] A. Savchenko, Transforming Graphene, *Science* (80-. ). 323 (2009) 589–590.  
doi:10.1126/science.1169246.

- [48] Y. Wang, X. Xu, J. Lu, M. Lin, Q. Bao, B. Ozyilmaz, K.P. Loh, Toward high throughput interconvertible graphane-to-graphene growth and patterning, *ACS Nano*. 4 (2010) 6146–6152. doi:10.1021/nn1017389.
- [49] E. Bekyarova, M.E. Itkis, P. Ramesh, C. Berger, M. Sprinkle, W.A. de Heer, R.C. Haddon, Chemical Modification of Epitaxial Graphene: Spontaneous Grafting of Aryl Groups, *J. Am. Chem. Soc.* 131 (2009) 1336–1337. doi:10.1021/ja8057327.
- [50] Z. Liu, J.T. Robinson, X. Sun, H. Dai, PEGylated Nano-Graphene Oxide for Delivery of Water Insoluble Cancer Drugs (b), *J Am Chem Soc.* 130 (2008) 10876–10877. doi:10.1021/ja803688x.
- [51] K.S. Subrahmanyam, S.R.C. Vivekchand, A. Govindaraj, C.N.R. Rao, A study of graphenes prepared by different methods: characterization{,} properties and solubilization, *J. Mater. Chem.* 18 (2008) 1517–1523. doi:10.1039/B716536F.
- [52] D.C. Marcano, D. V. Kosynkin, J.M. Berlin, A. Sinitskii, Z. Sun, A. Slesarev, L.B. Alemany, W. Lu, J.M. Tour, Improved synthesis of graphene oxide, *ACS Nano*. 4 (2010) 4806–4814. doi:10.1021/nn1006368.
- [53] M. Cai, D. Thorpe, D.H. Adamson, H.C. Schniepp, Methods of graphite exfoliation, *J. Mater. Chem.* (2012) 24992–25002. doi:10.1039/c2jm34517j.
- [54] C. Soldano, A. Mahmood, E. Dujardin, Production, properties and potential of graphene, *Carbon N. Y.* 48 (2010) 2127–2150. doi:10.1016/j.carbon.2010.01.058.
- [55] C.K. Chua, M. Pumera, Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint., *Chem. Soc. Rev.* 43 (2014) 291–312. doi:10.1039/c3cs60303b.
- [56] E.L.K. Chng, M. Pumera, The toxicity of graphene oxides: Dependence on the oxidative methods used, *Chem. - A Eur. J.* 19 (2013) 8227–8235. doi:10.1002/chem.201300824.
- [57] H. Ali-Boucetta, D. Bitounis, R. Raveendran-Nair, A. Servant, J. Van den Bossche, K. Kostarelos, Purified Graphene Oxide Dispersions Lack In Vitro Cytotoxicity and In Vivo Pathogenicity, *Adv. Healthc. Mater.* 2 (2013) 433–441. doi:10.1002/adhm.201200248.

- [58] Ł. Majchrzycki, M. a. Augustyniak-Jabłokow, R. Strzelczyk, M. Maćkowiak, Magnetic Centres in Functionalized Graphene, *Acta Phys. Pol. A.* 127 (2015) 540–542. doi:10.12693/APhysPolA.127.540.
- [59] J. Wang, C. Liu, Y. Shuai, X. Cui, L. Nie, Controlled release of anticancer drug using graphene oxide as a drug-binding effector in konjac glucomannan/sodium alginate hydrogels, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 113 (2014) 223–229. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.09.009.
- [60] M.J. Allen, V.C. Tung, R.B. Kaner, Honeycomb carbon: A review of graphene, *Chem. Rev.* 110 (2010) 132–145. doi:10.1021/cr900070d.
- [61] S. Stankovich, D.A. Dikin, R.D. Piner, K.A. Kohlhaas, A. Kleinhammes, Y. Jia, Y. Wu, S.T. Nguyen, R.S. Ruoff, Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide, *Carbon N. Y.* 45 (2007) 1558–1565. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2007.02.034.
- [62] R. Sitko, B. Zawisza, E. Malicka, Graphene as a new sorbent in analytical chemistry, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 51 (2013) 33–43. doi:10.1016/j.trac.2013.05.011.
- [63] R. Sitko, E. Turek, B. Zawisza, E. Malicka, E. Talik, J. Heimann, A. Gagor, B. Feist, R. Wrzalik, Adsorption of divalent metal ions from aqueous solutions using graphene oxide, *Dalt. Trans.* 42 (2013) 5682–5689. doi:10.1039/c3dt33097d.
- [64] L. Liu, J. Zhang, J. Zhao, F. Liu, Mechanical properties of graphene oxides, *Nanoscale.* 4 (2012) 5910. doi:10.1039/c2nr31164j.
- [65] Q. Liu, L. Wei, J. Wang, F. Peng, D. Luo, R. Cui, Y. Niu, X. Qin, Y. Liu, H. Sun, J. Yang, Y. Li, Cell imaging by graphene oxide based on surface enhanced Raman scattering, *Nanoscale.* 4 (2012) 7084–9. doi:10.1039/c2nr32525j.
- [66] H. Yang, F. Li, C. Shan, D. Han, Q. Zhang, L. Niu, A. Ivaska, Covalent functionalization of chemically converted graphene sheets via silane and its reinforcement, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 4632–4638. doi:10.1039/B901421G.
- [67] S. Goenka, V. Sant, S. Sant, Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering, *J. Control. Release.* 173 (2014) 75–88. doi:10.1016/j.jconrel.2013.10.017.

- [68] D. Pan, S. Wang, B. Zhao, M. Wu, H. Zhang, Y. Wang, Z. Jiao, Li Storage Properties of Disordered Graphene Nanosheets, *Chem. Mater.* 21 (2009) 3136–3142. doi:10.1021/cm900395k.
- [69] H. Tachikawa, A Direct Molecular Orbital–Molecular Dynamics Study on the Diffusion of the Li Ion on a Fluorinated Graphene Surface, *J. Phys. Chem. C.* 112 (2008) 10193–10199. doi:10.1021/jp800398y.
- [70] A.M. Jastrzebska, P. Kurtycz, A.R. Olszyna, Recent advances in graphene family materials toxicity investigations, *J. Nanoparticle Res.* 14 (2012) 1–21. doi:10.1007/s11051-012-1320-8.
- [71] K. Yang, L. Feng, X. Shi, Z. Liu, Nano-graphene in biomedicine: theranostic applications, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 530–547. doi:10.1039/C2CS35342C.
- [72] <http://www.pcformat.pl/Zastapi-krzem,a,1829>.
- [73] A. Elsaesser, C.V. Howard, Toxicology of nanoparticles, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 64 (2012) 129–137. doi:10.1016/j.addr.2011.09.001.
- [74] J. Gromadzka-Ostrowska, K. Dziendzikowska, A. Lankoff, M. Dobrzyńska, C. Instanes, G. Brunborg, A. Gajowik, J. Radzikowska, M. Wojewódzka, M. Kruszewski, Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats, *Toxicol. Lett.* 214 (2012) 251–258. doi:10.1016/j.toxlet.2012.08.028.
- [75] Y. Pan, N.G. Sahoo, L. Li, The application of graphene oxide in drug delivery., *Expert Opin. Drug Deliv.* 9 (2012) 1365–1376. doi:10.1517/17425247.2012.729575.
- [76] M. Pumera, Nanotoxicology: the molecular science point of view., *Chem. Asian J.* 6 (2011) 340–348. doi:10.1002/asia.201000398.
- [77] W. Choi, I. Lahiri, R. Seelaboyina, Y.S. Kang, Synthesis of Graphene and Its Applications: A Review, *Crit. Rev. Solid State Mater. Sci.* 35 (2010) 52–71. doi:10.1080/10408430903505036.
- [78] H. BAO, Y. PAN, L.I.N. LI, RECENT ADVANCES IN GRAPHENE-BASED NANOMATERIALS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS, *Nano Life.* 2 (2012) 1230001. doi:10.1142/S179398441100030X.

- [79] X. Yang, X. Zhang, Y. Ma, Y. Huang, Y. Wang, Y. Chen, Superparamagnetic graphene oxide-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>nanoparticles hybrid for controlled targeted drug carriers, *J. Mater. Chem.* 19 (2009) 2710–2714. doi:10.1039/B821416F.
- [80] J. Liu, S. Guo, L. Han, T. Wang, W. Hong, Y. Liu, E. Wang, Synthesis of phospholipid monolayer membrane functionalized graphene for drug delivery, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 20634–20640. doi:10.1039/C2JM34494G.
- [81] K. Zhou, Y. Zhu, X. Yang, C. Li, One-pot preparation of graphene/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> composites by a solvothermal reaction, *New J. Chem.* 34 (2010) 2950–2955. doi:10.1039/C0NJ00283F.
- [82] H. Bai, C. Li, X. Wang, G. Shi, A pH-sensitive graphene oxide composite hydrogel, *Chem. Commun.* 46 (2010) 2376–2378. doi:10.1039/c000051e.
- [83] C. Wang, J. Li, C. Amatore, Y. Chen, H. Jiang, X.-M. Wang, Gold Nanoclusters and Graphene Nanocomposites for Drug Delivery and Imaging of Cancer Cells, *Angew. Chemie Int. Ed.* 50 (2011) 11644–11648. doi:10.1002/anie.201105573.
- [84] X. Sun, Z. Liu, K. Welsher, J.T. Robinson, A. Goodwin, S. Zaric, H. Dai, Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery, *Nano Res.* 1 (2008) 203–212. doi:10.1007/s12274-008-8021-8.
- [85] L. Zhang, J. Xia, Q. Zhao, L. Liu, Z. Zhang, Functional Graphene Oxide as a Nanocarrier for Controlled Loading and Targeted Delivery of Mixed Anticancer Drugs, *Small.* 6 (2010) 537–544. doi:10.1002/smll.200901680.
- [86] L. Wang, J. Shi, H. Zhang, H. Li, Y. Gao, Z. Wang, H. Wang, L. Li, C. Zhang, C. Chen, Z. Zhang, Y. Zhang, Synergistic anticancer effect of RNAi and photothermal therapy mediated by functionalized single-walled carbon nanotubes, *Biomaterials.* 34 (2013) 262–274. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.037.
- [87] S.K. Tripathi, R. Goyal, K.C. Gupta, P. Kumar, Functionalized graphene oxide mediated nucleic acid delivery, *Carbon N. Y.* 51 (2013) 224–235. doi:10.1016/j.carbon.2012.08.047.
- [88] K. Yang, S. Zhang, G. Zhang, X. Sun, S.-T. Lee, Z. Liu, Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy, *Nano Lett.* 10 (2010)



- 3318–3323. doi:10.1021/nl100996u.
- [89] S. Zhang, K. Yang, L. Feng, Z. Liu, In vitro and in vivo behaviors of dextran functionalized graphene, *Carbon N. Y.* 49 (2011) 4040–4049. doi:10.1016/j.carbon.2011.05.056.
- [90] R.D. Handy, N. van den Brink, M. Chappell, M. Muhling, R. Behra, M. Dusinska, P. Simpson, J. Ahtainen, A.N. Jha, J. Seiter, A. Bednar, A. Kennedy, T.F. Fernandes, M. Riediker, Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far?, *Ecotoxicology*. 21 (2012) 933–972. doi:10.1007/s10646-012-0862-y.
- [91] A.M. Jastrzebska, A.R. Olszyna, The ecotoxicity of graphene family materials: current status, knowledge gaps and future needs, *J. Nanoparticle Res.* 17 (2015). doi:10.1007/s11051-014-2817-0.
- [92] S. Walenty, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, 5th ed., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2008.
- [93] G. Oberdörster, E. Oberdörster, J. Oberdörster, Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles, *Environ. Health Perspect.* 113 (2005) 823–839. <http://www.jstor.org/stable/3436201>.
- [94] S.T. Stern, S.E. McNeil, Nanotechnology safety concerns revisited, *Toxicol. Sci.* 101 (2008) 4–21. doi:10.1093/toxsci/kfm169.
- [95] C. Hu, Q. Wang, H. Zhao, L. Wang, S. Guo, X. Li, Ecotoxicological effects of graphene oxide on the protozoan *Euglena gracilis*, *Chemosphere*. 128 (2015) 184–190. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.01.040.
- [96] H. Yang, C. Liu, D. Yang, H. Zhang, Z. Xi, Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition, *J. Appl. Toxicol.* 29 (2009) 69–78. doi:10.1002/jat.1385.
- [97] M. Hinzmann, S. Jaworski, M. Kutwin, J. Jagiełło, R. Koziński, M. Wierzbicki, M. Grodzik, L. Lipińska, E. Sawosz, A. Chwalibog, Nanoparticles containing allotropes of carbon have genotoxic effects on glioblastoma multiforme cells, *Int. J.*

- Nanomedicine. 9 (2014) 2409–2417. doi:10.2147/IJN.S62497.
- [98] V.S.W. Chan, Nanomedicine: An unresolved regulatory issue., *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 46 (2006) 218–224. doi:10.1016/j.yrtph.2006.04.009.
- [99] D.B. Warheit, How meaningful are the results of nanotoxicity studies in the absence of adequate material characterization?, *Toxicol. Sci.* 101 (2008) 183–185.
- [100] S.E. McNeil, Nanotechnology for the biologist., *J. Leukoc. Biol.* 78 (2005) 585–594. doi:10.1189/jlb.0205074.
- [101] H.L. Karlsson, P. Cronholm, J. Gustafsson, L. Moller, Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes., *Chem. Res. Toxicol.* 21 (2008) 1726–1732. doi:10.1021/tx800064j.
- [102] K.-H. Liao, Y.-S. Lin, C.W. Macosko, C.L. Haynes, Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts, *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 3 (2011) 2607–2615. doi:10.1021/am200428v.
- [103] O.C. Compton, Z. An, K.W. Putz, B.J. Hong, B.G. Hauser, L. Catherine Brinson, S.T. Nguyen, Additive-free hydrogelation of graphene oxide by ultrasonication, *Carbon N. Y.* 50 (2012) 3399–3406. doi:10.1016/j.carbon.2012.01.061.
- [104] A.M. Pinto, I.C. Gonçalves, F.D. Magalhães, Graphene-based materials biocompatibility: A review, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 111 (2013) 188–202. doi:10.1016/j.colsurfb.2013.05.022.
- [105] O. Akhavan, E. Ghaderi, Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria, *ACS Nano.* 4 (2010) 5731–5736. doi:10.1021/nn101390x.
- [106] M. Aschner, T.R. Guilarte, J.S. Schneider, W. Zheng, Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 221 (2007) 131–147. doi:10.1016/j.taap.2007.03.001.
- [107] K. Liu, J.-J. Zhang, F.-F. Cheng, T.-T. Zheng, C. Wang, J.-J. Zhu, Green and facile synthesis of highly biocompatible graphene nanosheets and its application for cellular imaging and drug delivery, *J. Mater. Chem.* 21 (2011) 12034–12040. doi:10.1039/C1JM10749F.

- [108] V. Singh, D. Joung, L. Zhai, S. Das, S.I. Khondaker, S. Seal, Graphene based materials: Past, present and future, *Prog. Mater. Sci.* 56 (2011) 1178–1271.  
doi:10.1016/j.pmatsci.2011.03.003.
- [109] S.-J. Choi, J.-M. Oh, J.-H. Choy, Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells., *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 463–471.  
doi:10.1016/j.jinorgbio.2008.12.017.
- [110] R.K. Shukla, A. Kumar, D. Gurbani, A.K. Pandey, S. Singh, A. Dhawan, TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells., *Nanotoxicology.* 7 (2013) 48–60. doi:10.3109/17435390.2011.629747.
- [111] G. Wang, F. Qian, C.W. Saltikov, Y. Jiao, Y. Li, Microbial reduction of graphene oxide by *Shewanella*, *Nano Res.* 4 (2011) 563–570. doi:10.1007/s12274-011-0112-2.
- [112] E.C. Salas, Z. Sun, A. Lüttge, J.M. Tour, Reduction of graphene oxide via bacterial respiration, *ACS Nano.* 4 (2010) 4852–4856. doi:10.1021/nn101081t.
- [113] O. Akhavan, E. Ghaderi, *Escherichia coli* bacteria reduce graphene oxide to bactericidal graphene in a self-limiting manner, *Carbon N. Y.* 50 (2012) 1853–1860. doi:10.1016/j.carbon.2011.12.035.
- [114] W.F. Vevers, A.N. Jha, Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on fish cells in vitro., *Ecotoxicology.* 17 (2008) 410–420.  
doi:10.1007/s10646-008-0226-9.
- [115] L. Gonzalez, L.C.J. Thomassen, G. Plas, V. Rabolli, D. Napierska, I. Decordier, M. Roelants, P.H. Hoet, C.E.A. Kirschhock, J.A. Martens, D. Lison, M. Kirsch-Volders, Exploring the aneugenic and clastogenic potential in the nanosize range: A549 human lung carcinoma cells and amorphous monodisperse silica nanoparticles as models, *Nanotoxicology.* 4 (2010) 382–395. doi:10.3109/17435390.2010.501913.
- [116] Y. Chang, S.-T. Yang, J.-H. Liu, E. Dong, Y. Wang, A. Cao, Y. Liu, H. Wang, In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells., *Toxicol. Lett.* 200 (2011) 201–210. doi:10.1016/j.toxlet.2010.11.016.
- [117] S. Mullick Chowdhury, G. Lalwani, K. Zhang, J.Y. Yang, K. Neville, B. Sitharaman, Cell specific cytotoxicity and uptake of graphene nanoribbons, *Biomaterials.* 34

- (2013) 283–293. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.057.
- [118] N. a. Monteiro-Riviere, R.J. Nemanich, A.O. Inman, Y.Y. Wang, J.E. Riviere, Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes, *Toxicol. Lett.* 155 (2005) 377–384. doi:10.1016/j.toxlet.2004.11.004.
- [119] M. Dziewięcka, J. Karpeta-Kaczmarek, M. Augustyniak, Ł. Majchrzycki, M.A. Augustyniak-Jabłokow, Evaluation of in vivo graphene oxide toxicity for *Acheta domesticus* in relation to nanomaterial purity and time passed from the exposure, *J. Hazard. Mater.* 305 (2016) 30–40. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.11.021.
- [120] H.L. Karlsson, J. Gustafsson, P. Cronholm, L. Möller, Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size, *Toxicol. Lett.* 188 (2009) 112–118. doi:10.1016/j.toxlet.2009.03.014.
- [121] S.J. Yu, M.W. Kang, H.C. Chang, K.M. Chen, Y.C. Yu, Bright fluorescent nanodiamonds: No photobleaching and low cytotoxicity, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 17604–17605. doi:10.1021/ja0567081.
- [122] T. Lammel, P. Boisseaux, M.-L. Fernández-Cruz, J.M. Navas, Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2., *Part. Fibre Toxicol.* 10 (2013) 27. doi:10.1186/1743-8977-10-27.
- [123] A. Andriichuk, H. Tkachenko, N. Kurhaluk, I. Tkachova, M. Vartovnyk, Markery Stresu Oksydacyjnego I Parametry Biochemiczne We Krwi Koni Biorących Udział We Wszechstronnym Konkursie Konia Wierzchowego W Dynamice Treningu Oxidative Stress Biomarkers and Biochemical Parameters in the Blood of Eventing Horses, (2013) 5–26.
- [124] J. Karpeta-Kaczmarek, M. Dziewięcka, M. Augustyniak, M. Rost-Roszkowska, M. Pawlyta, Oxidative stress and genotoxic effects of diamond nanoparticles, *Environ. Res.* 148 (2016) 264–272. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.03.033.
- [125] M. Atalay, D.E. Laaksonen, Diabetes, Oxidative Stress and Physical Exercise, *J. Sports Sci. Med.* 1 (2002) 1–14.
- [126] J. Kulbacka, J. Saczko, A. Chwilkowska, Stres oksydacyjny w procesach

- uszkodzenia komórek, *Pol. Merkur. Lek.* 27 (2009) 44–47. doi:10.1007/s00204-011-0674-5.
- [127] K.P. Bhabak, G. Mugesh, Functional mimics of glutathione peroxidase: Bioinspired synthetic antioxidants, *Acc. Chem. Res.* 43 (2010) 1408–1419. doi:10.1021/ar100059g.
- [128] M. Augustyniak, A. Babczynska, M. Augustyniak, Does the grasshopper *Chorthippus brunneus* adapt to metal polluted habitats? A study of glutathione-dependent enzymes in grasshopper nymphs, *Insect Sci.* 16 (2009) 33–42. doi:10.1111/j.1744-7917.2009.00251.x.
- [129] M. Zaak, P. Migula, D. Stygar, B. Dolezych, K. Michalczyk, Within and between seasonal changes of detoxifying capabilities of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera : Gracillariidae) larvae, *Comptes Rendus - Biol.* 335 (2012) 645–656. doi:10.1016/j.crv.2012.10.006.
- [130] A. Cid, A. Picado, J.B. Correia, R. Chaves, H. Silva, J. Caldeira, A.P.A. de Matos, M.S. Diniz, Oxidative stress and histological changes following exposure to diamond nanoparticles in the freshwater Asian clam *Corbicula fluminea* (Müller, 1774), *J. Hazard. Mater.* 284 (2015) 27–34. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.10.055.
- [131] M.P. Mayer, B. Bukau, Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 670–684. doi:10.1007/s00018-004-4464-6.
- [132] N. Asare, C. Instanes, W.J. Sandberg, M. Refsnes, P. Schwarze, M. Kruszewski, G. Brunborg, Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells, *Toxicology.* 291 (2012) 65–72. doi:10.1016/j.tox.2011.10.022.
- [133] D. Jawniak, R. Jawniak, M. Małek, M. Górnska, Wpływ stresu oksydacyjnego na przebieg kliniczny ostrych białaczek mieloblastycznych, *Reports Pract. Oncol. Radiother.* 9 (2004) 157–160. doi:10.1016/S1507-1367(04)71022-6.
- [134] C.M. Deaton, D.J. Marlin, Exercise-associated oxidative stress, *Clin. Tech. Equine Pract.* 2 (2003) 278–291. doi:10.1053/S1534-7516(03)00070-2.
- [135] J. Sroka, Z. Madeja, Udział reaktywnych form tlenu i reduktazy tioredoksyny w

- regulacji migracji komórek, 55 (2009) 145–152.
- [136] E.R. Stadtman, R.L. Levine, Protein oxidation., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 899 (2000) 191–208.
- [137] R. Brayner, The toxicological impact of nanoparticles, *Nano Today*. 3 (2008) 48–55. doi:10.1016/S1748-0132(08)70015-X.
- [138] Z. Magdolenova, A. Collins, A. Kumar, A. Dhawan, V. Stone, M. Dusinska, Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles., *Nanotoxicology*. 8 (2014) 233–78. doi:10.3109/17435390.2013.773464.
- [139] P.A. Cerutti, Oxy-radicals and cancer, *Lancet*. 344 (1994) 862–863. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(94)92832-0.
- [140] T. Takahashi, M.M. Nau, I. Chiba, M.J. Birrer, R.K. Rosenberg, M. Vinocour, M. Levitt, H. Pass, A.F. Gazdar, J.D. Minna, p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer., *Science*. 246 (1989) 491–494.
- [141] P. O'Neill, The Chemical Basis of Radiation Biology, *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Physics, Chem. Med.* 52 (1987) 976. doi:10.1080/09553008714552571.
- [142] S. Hackenberg, G. Friehs, K. Froelich, C. Ginzkey, C. Koehler, A. Scherzed, M. Burghartz, R. Hagen, N. Kleinsasser, Intracellular distribution, geno- and cytotoxic effects of nanosized titanium dioxide particles in the anatase crystal phase on human nasal mucosa cells, *Toxicol. Lett.* 195 (2010) 9–14. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.02.022.
- [143] S.K. Gupta, L. Baweja, D. Gurbani, A.K. Pandey, A. Dhawan, Interaction of C60 fullerene with the proteins involved in DNA mismatch repair pathway., *J. Biomed. Nanotechnol.* 7 (2011) 179–180.
- [144] S. Huang, P.J. Chueh, Y.-W. Lin, T.-S. Shih, S.-M. Chuang, Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO<sub>2</sub> long-term exposure., *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 241 (2009) 182–194. doi:10.1016/j.taap.2009.08.013.
- [145] V. Sharma, R.K. Shukla, N. Saxena, D. Parmar, M. Das, A. Dhawan, DNA damaging

- potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells, *Toxicol. Lett.* 185 (2009) 211–218. doi:10.1016/j.toxlet.2009.01.008.
- [146] W.H. Koppenol, The Haber-Weiss cycle--70 years later., *Redox Rep.* 6 (2001) 229–234. doi:10.1179/135100001101536373.
- [147] N. Asare, C. Instanes, W.J. Sandberg, M. Refsnes, P. Schwarze, M. Kruszewski, G. Brunborg, Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles in testicular cells., *Toxicology.* 291 (2012) 65–72. doi:10.1016/j.tox.2011.10.022.
- [148] B. Trouiller, R. Reliene, A. Westbrook, P. Solaimani, R.H. Schiestl, Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice, *Cancer Res.* 69 (2009). doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-2496.
- [149] E. Theogaraj, S. Riley, L. Hughes, M. Maier, D. Kirkland, An investigation of the photo-clastogenic potential of ultrafine titanium dioxide particles, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 634 (2007) 205–219. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.08.002.
- [150] T. Toyooka, T. Amano, Y. Ibuki, Titanium dioxide particles phosphorylate histone {H2AX} independent of {ROS} production, *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 742 (2012) 84–91. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.12.015.
- [151] I. Florin, L. Rutberg, M. Curvall, C.R. Enzell, Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test, *Toxicology.* 15 (1980) 219–232. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0300-483X(80)90055-4.
- [152] E.R. Kisin, A.R. Murray, M.J. Keane, X.-C. Shi, D. Schwegler-Berry, O. Gorelik, S. Arepalli, V. Castranova, W.E. Wallace, V.E. Kagan, A.A. Shvedova, Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells., *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 70 (2007) 2071–2079. doi:10.1080/15287390701601251.
- [153] M. Augustyniak, M. Gladysz, M. Dziewięcka, The Comet assay in insects – status, prospects and benefits for science, *Mutat. Res. Mutat. Res.* (2015) 1–10. doi:10.1016/j.mrrev.2015.09.001.
- [154] N.T.K. Thanh, L. a W. Green, Functionalisation of nanoparticles for biomedical

- applications, *Nano Today*. 5 (2010) 213–230. doi:10.1016/j.nantod.2010.05.003.
- [155] <http://laboratoria.net/arttykul/20931.html>.
- [156] M.A. Maurer-Jones, C.L. Haynes, Toward Correlation in In Vivo and In Vitro Nanotoxicology Studies, *J. Law, Med. Ethics*. 40 (2012) 795–801. doi:10.1111/j.1748-720X.2012.00707.x.
- [157] K. Wang, J. Ruan, H. Song, J. Zhang, Y. Wo, S. Guo, D. Cui, Biocompatibility of Graphene Oxide, *Nanoscale Res. Lett.* 6 (2011) 8. doi:10.1007/s11671-010-9751-6.
- [158] V. Turusov, V. Rakitsky, L. Tomatis, Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): Ubiquity, persistence, and risks, *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 125–128. doi:10.1289/ehp.02110125.
- [159] A.B. Seabra, A.J. Paula, R. De Lima, O.L. Alves, N. Durán, Nanotoxicity of graphene and graphene oxide, *Chem. Res. Toxicol.* 27 (2014) 159–168. doi:10.1021/tx400385x.
- [160] C. Pretti, M. Oliva, R. Di Pietro, G. Monni, G. Cevasco, F. Chiellini, C. Pomelli, C. Chiappe, Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms., *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 101 (2014) 138–145. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.11.008.
- [161] T. Mesarič, K. Sepčič, V. Piazza, C. Gambardella, F. Garaventa, D. Drobne, M. Faimali, Effects of nano carbon black and single-layer graphene oxide on settlement, survival and swimming behaviour of *Amphibalanus amphitrite* larvae, *Chem. Ecol.* 29 (2013) 643–652. doi:10.1080/02757540.2013.817563.
- [162] P. Begum, R. Ikhtiari, B. Fugetsu, Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce, *Carbon N. Y.* 49 (2011) 3907–3919. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2011.05.029>.
- [163] P. Begum, B. Fugetsu, Induction of cell death by graphene in *Arabidopsis thaliana* (Columbia ecotype) T87 cell suspensions., *J. Hazard. Mater.* 260 (2013) 1032–1041. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.06.063.
- [164] M. Sawangphruk, P. Srimuk, P. Chiochan, T. Sangsri, P. Siwayaprahm, Synthesis and antifungal activity of reduced graphene oxide nanosheets, *Carbon N. Y.* 50



- (2012) 5156–5161. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbon.2012.06.056>.
- [165] J. Zhao, B. Deng, M. Lv, J. Li, Y. Zhang, H. Jiang, C. Peng, J. Li, J. Shi, Q. Huang, C. Fan, Graphene oxide-based antibacterial cotton fabrics., *Adv. Healthc. Mater.* 2 (2013) 1259–1266. doi:10.1002/adhm.201200437.
- [166] W. Zhang, C. Wang, Z. Li, Z. Lu, Y. Li, J.-J. Yin, Y.-T. Zhou, X. Gao, Y. Fang, G. Nie, Y. Zhao, Unraveling Stress-Induced Toxicity Properties of Graphene Oxide and the Underlying Mechanism, *Adv. Mater.* 24 (2012) 5391–5397. doi:10.1002/adma.201202678.
- [167] V.E. Fako, D.Y. Furgeson, Zebrafish as a correlative and predictive model for assessing biomaterial nanotoxicity., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 478–486. doi:10.1016/j.addr.2009.03.008.
- [168] G. Gollavelli, Y.-C. Ling, Multi-functional graphene as an in vitro and in vivo imaging probe., *Biomaterials.* 33 (2012) 2532–2545. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.12.010.
- [169] C.-W. Liu, F. Xiong, H.-Z. Jia, X.-L. Wang, H. Cheng, Y.-H. Sun, X.-Z. Zhang, R.-X. Zhuo, J. Feng, Graphene-Based Anticancer Nanosystem and Its Biosafety Evaluation Using a Zebrafish Model, *Biomacromolecules.* 14 (2013) 358–366. doi:10.1021/bm3015297.
- [170] K. Yang, H. Gong, X. Shi, J. Wan, Y. Zhang, Z. Liu, In vivo biodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration, *Biomaterials.* 34 (2013) 2787–2795. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.001>.
- [171] L. Zhang, J. Xia, Q. Zhao, L. Liu, Z. Zhang, Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs, *Small.* 6 (2010) 537–544. doi:10.1002/sml.200901680.
- [172] K. Savolainen, H. Alenius, H. Norppa, L. Pylkkänen, T. Tuomi, G. Kasper, Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies-A review, *Toxicology.* 269 (2010) 92–104. doi:10.1016/j.tox.2010.01.013.
- [173] V.E. Forbes, A. Palmqvist, L. Bach, The use and misuse of biomarkers in

- ecotoxicology, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (2006) 272–280. doi:10.1897/05-257R.1.
- [174] J.J. Schleier, R.K.D. Peterson, Toxicity and risk of permethrin and naled to non-target insects after adult mosquito management, *Ecotoxicology*. 19 (2010) 1140–1146. doi:10.1007/s10646-010-0497-9.
- [175] M.H. Li, M.J. McKee, Toxicokinetics of 2,2',4,4'- and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl congeners in the house cricket, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 24 (1992) 309–318. doi:10.1016/0147-6513(92)90007-P.
- [176] J.M. Paine, M.J. McKee, M.E. Ryan, Toxicity and bioaccumulation of soil PCBs in crickets: Comparison of laboratory and field studies, *Environ. Toxicol. Chem.* 12 (1993) 2097–2103. doi:10.1002/etc.5620121117.
- [177] J. Szelei, J. Woodring, M.S. Goettel, G. Duke, F.X. Jousset, K.Y. Liu, Z. Zadori, Y. Li, E. Styer, D.G. Boucias, R.G. Kleespies, M. Bergoin, P. Tijssen, Susceptibility of North-American and European crickets to *Acheta domesticus* densovirus (AdDNV) and associated epizootics, *J. Invertebr. Pathol.* 106 (2011) 394–399. doi:10.1016/j.jip.2010.12.009.
- [178] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding., *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- [179] H. Aebi, Catalase in vitro., *Methods Enzymol.* 105 (1984) 121–126.
- [180] S. Ahmad, M.A. Beilstein, R.S. Pardini, Glutathione peroxidase activity in insects: A reassessment, *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 12 (1989) 31–49. doi:10.1002/arch.940120104.
- [181] A. Ghiselli, M. Serafini, F. Natella, C. Scaccini, Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data, *Free Radic. Biol. Med.* 29 (2000) 1106–1114. doi:10.1016/S0891-5849(00)00394-4.
- [182] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1999) 1231–1237. doi:10.1016/S0891-5849(98)00315-3.

- [183] M. Rost-Roszkowska, Ultrastructural Changes in the Midgut Epithelium of *Acheta domesticus* (Orthoptera: Gryllidae) During Degeneration and Regeneration, *Morphol. Histol. Fine Struct.* 101 (2008) 151–158.  
doi:[http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746\(2008\)101\[151:UCITME\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.1603/0013-8746(2008)101[151:UCITME]2.0.CO;2).
- [184] X. Guo, N. Mei, Assessment of the toxic potential of graphene family nanomaterials, *J. Food Drug Anal.* 22 (2014) 105–115. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.009.
- [185] O. Akhavan, Bacteriorhodopsin as a superior substitute for hydrazine in chemical reduction of single-layer graphene oxide sheets, *Carbon N. Y.* 81 (2015) 158–166. doi:10.1016/j.carbon.2014.09.044.
- [186] S. Gurunathan, J.W. Han, J.-H. Kim, Green chemistry approach for the synthesis of biocompatible graphene., *Int. J. Nanomedicine.* 8 (2013) 2719–2732. doi:10.2147/IJN.S45174.
- [187] J. Gao, B. Xu, Applications of nanomaterials inside cells, *Nano Today.* 4 (2009) 37–51. doi:10.1016/j.nantod.2008.10.009.
- [188] S. Liu, T.H. Zeng, M. Hofmann, E. Burcombe, J. Wei, R. Jiang, J. Kong, Y. Chen, Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: Membrane and oxidative stress, *ACS Nano.* 5 (2011) 6971–6980. doi:10.1021/nn202451x.
- [189] E.R. Carmona, A. Creus, R. Marcos, Genotoxicity testing of two lead-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 724 (2011) 35–40. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.05.008.
- [190] Y. Zhao, Q. Wu, D. Wang, An epigenetic signal encoded protection mechanism is activated by graphene oxide to inhibit its induced reproductive toxicity in *Caenorhabditis elegans*, *Biomaterials.* 79 (2016) 15–24. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.052.
- [191] A.R. Cuddihy, M.J. O'Connell, Cell-cycle responses to DNA damage in G2, *Int. Rev. Cytol.* 222 (2003) 99–140. doi:10.1016/s0074-7696(02)22013-6.
- [192] C.F. Jones, D.W. Grainger, In vitro assessments of nanomaterial toxicity, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61 (2009) 438–456. doi:10.1016/j.addr.2009.03.005.

- [193] J. Karpeta-Kaczmarek, M. Augustyniak, M. Rost-Roszkowska, Ultrastructure of the gut epithelium in *Acheta domesticus* after long-term exposure to nanodiamonds supplied with food, *Arthropod Struct. Dev.* (2016) 1–12.  
doi:10.1016/j.asd.2016.02.002.
- [194] T. Yoshimori, Autophagy: A regulated bulk degradation process inside cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313 (2004) 453–458.  
doi:10.1016/j.bbrc.2003.07.023.
- [195] N. Kourtis, N. Tavernarakis, Autophagy and cell death in model organisms., *Cell Death Differ.* 16 (2009) 21–30. doi:10.1038/cdd.2008.120.
- [196] L. Chen, P. Hu, L. Zhang, S. Huang, L. Luo, C. Huang, Toxicity of graphene oxide and multi-walled carbon nanotubes against human cells and zebrafish, *Sci. China Chem.* 55 (2012) 2209–2216. doi:10.1007/s11426-012-4620-z.
- [197] Q. Wu, Y. Zhao, J. Fang, D. Wang, Immune response is required for the control of in vivo translocation and chronic toxicity of graphene oxide., *Nanoscale.* 6 (2014) 5894–906. doi:10.1039/c4nr00699b.
- [198] M. Dziewięcka, J. Karpeta-Kaczmarek, M. Augustyniak, M. Rost-Roszkowska, Short-term in vivo exposure to graphene oxide can cause damage to the gut and testis, *J. Hazard. Mater.* 328 (2017) 80–89. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.01.012.
- [199] S. Xu, Z. Zhang, M. Chu, Long-term toxicity of reduced graphene oxide nanosheets: Effects on female mouse reproductive ability and offspring development, *Biomaterials.* 54 (2015) 188–200. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.03.015.
- [200] A. Schröfel, G. Kratošová, I. Šafařík, M. Šafaříková, I. Raška, L.M. Shor, Applications of biosynthesized metallic nanoparticles - A review, *Acta Biomater.* 10 (2014) 4023–4042. doi:10.1016/j.actbio.2014.05.022.
- [201] C. Fu, T. Liu, L. Li, H. Liu, Q. Liang, X. Meng, Effects of graphene oxide on the development of offspring mice in lactation period, *Biomaterials.* 40 (2015) 23–31. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.11.014.
- [202] <https://szczecinbiznes.pl>.
- [203] <http://www.keywordsking.com/>

## VIII. SPIS ILUSTRACJI

<b>Rysunek 1.</b> Doprecyzowanie problemów stawianych przez nanotechnologię wymaga współpracy badaczy z wielu dziedzin nauki.....	6
<b>Rysunek 2.</b> Grafen jest "matką" materiałów węglowych o różnych wymiarach [14]. .....	8
<b>Rysunek 3.</b> Struktura grafenu. ....	9
<b>Rysunek 4.</b> Schemat budowy grafitu. ....	10
<b>Rysunek 5.</b> Budowa nanorurek, (a) nanorurki jednościenne (SWNT), (b) nanorurki wielościenne (MWNT) [186].....	11
<b>Rysunek 6.</b> Budowa fulerenu C60 i C70 [187].....	12
<b>Rysunek 7.</b> Struktura diamentu. ....	13
<b>Rysunek 8.</b> Funkcjonalizacja niekowalencyjna i kowalencyjna grafenu.....	15
<b>Rysunek 9.</b> Metody otrzymywania tlenku grafitu.....	17
<b>Rysunek 10.</b> Schemat grafenu (a) oraz tlenku grafenu wraz z grupami funkcyjnymi (b).....	18
<b>Rysunek 11.</b> Zastosowanie tlenku grafenu jako nośnika różnych środków terapeutycznych i biomolekuł. ....	20
<b>Rysunek 12.</b> Metody analityczne wykorzystywane w charakterystyce grafenu i jego pochodnych.....	23
<b>Rysunek 13.</b> Schemat zredukowanego tlenku grafenu (rGO).....	26
<b>Rysunek 14.</b> (a) ostre krawędzie grafenu - typu "zigzag", (b) krawędzie typu "armchair" ...	26
<b>Rysunek 15.</b> Scenariusz zdarzeń w komórce podczas kontaktu z nanocząsteczkami.....	28
<b>Rysunek 16.</b> Wpływ nanocząsteczek na poszczególne komponenty komórki. ....	29
<b>Rysunek 17.</b> Mechanizmy przeciwdziałające reaktywnym formom tlenu w komórce. ....	30
<b>Rysunek 18.</b> Cechy organizmu modelowego na przykładzie <i>Acheta domesticus</i> .....	40
<b>Rysunek 19.</b> Widmo EPR (a) widmo GO+Mn <sup>2+</sup> (b) widmo GO.....	47
<b>Rysunek 20.</b> Zdyspergowany tlenek grafenu.....	47
<b>Rysunek 21.</b> Zdjęcia płatków tlenku grafenu wykonane techniką mikroskopii sił atomowych (AFM); (a) czysty tlenek grafenu GO (b) tlenek grafenu zanieczyszczony jonami manganu GO+Mn <sup>2+</sup> . Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015. ....	48
<b>Rysunek 22.</b> Schemat eksperymentu I. ....	49
<b>Rysunek 23.</b> Schemat poboru tkanek (a) pobór hemolimfy, (b) preparacja jelita. ....	50
<b>Rysunek 24.</b> Model eksperymentu II.....	55
<b>Rysunek 25.</b> Obraz jąder komórkowych po elektroforezie widziany pod mikroskopem fluorescencyjnym (na przykładzie hemocytów) (a) jądro komórkowe bez widocznych	

uszkodzeń DNA (b) jądro komórkowe z niewielkimi uszkodzeniami DNA (c) jądro komórkowe ze znacznymi uszkodzeniami.....	57
<b>Rysunek 26.</b> Insektaria w pokoju hodowlanym.....	61
<b>Rysunek 27.</b> Widmo XPS tlenu grafenu.....	62
<b>Rysunek 28.</b> Zdjęcie płatków tlenu grafenu uzyskane metodą SEM; powiększenie 1000x (a) oraz 5000x (b).....	63
<b>Rysunek 29.</b> Schemat eksperymentu III.....	65
<b>Rysunek 30.</b> Samice <i>A. domesticus</i> podczas składania jaj do podłoża.....	66
<b>Rysunek 31.</b> Aktywność katalazy (CAT) w hemolimfie i jelicie <i>A. domesticus</i> narażonych na działanie czystego chemicznie tlenu grafenu (GO) oraz tlenu grafenu zanieczyszczonego jonami manganu (GO+Mn <sup>2+</sup> ) w kolejnych punktach czasowych (1 h, 24 h, 48 h, 72 h) po iniekcji nanocząsteczek. Objaśnienie: zielona linia wskazuje grupę kontrolną. Średnie, procentowe udziały grup traktowanych nanocząsteczkami były obliczane względem grupy kontrolnej odpowiadającej danemu punktowi czasowemu; * - wskazuje statystycznie istotną różnicę pomiędzy owadami intoksykowanymi względem grupy kontrolnej; różne litery (a, b) – oznaczają różnice pomiędzy grupami GO i GO+Mn <sup>2+</sup> osobno w każdym punkcie czasowym. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015.....	70
<b>Rysunek 32.</b> Aktywność peroksydazy glutationowej (GSTPx) w hemolimfie i jelicie <i>A. domesticus</i> narażonych na działanie czystego chemicznie tlenu grafenu (GO) oraz tlenu grafenu zanieczyszczonego jonami manganu (GO+Mn <sup>2+</sup> ) w kolejnych punktach czasowych (1 h, 24 h, 48 h, 72 h) po podaniu nanocząsteczek. Objaśnienie: jak w Rys. 23. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015.....	71
<b>Rysunek 33.</b> Poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) w hemolimfie i jelicie <i>A. domesticus</i> narażonych na działanie czystego chemicznie tlenu grafenu (GO) oraz tlenu grafenu zanieczyszczonego jonami manganu (GO+Mn <sup>2+</sup> ) w kolejnych punktach czasowych (1 h, 24 h, 48 h, 72 h) po podaniu nanocząsteczek. Objaśnienie: jak w Rys. 23. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015.....	72
<b>Rysunek 34.</b> Poziom białek szoku cieplnego (HSP 70) w hemolimfie i jelicie <i>A. domesticus</i> narażonych na działanie czystego chemicznie tlenu grafenu (GO) oraz tlenu grafenu zanieczyszczonego jonami manganu (GO+Mn <sup>2+</sup> ) w kolejnych punktach czasowych (1 h, 24 h, 48 h, 72 h) po podaniu nanocząsteczek. Objaśnienie: jak w Rys.23. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015.....	73
<b>Rysunek 35.</b> Wskaźniki stresu oksydacyjnego w jelicie oraz hemolimfie <i>A. domesticus</i> w trakcie 10 dniowej ekspozycji na tlenek grafenu w pokarmie (a) aktywność katalazy w jelicie	

(b) aktywność katalazy w hemolimfie (c) poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w jelicie (d) poziom całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w hemolimfie. Objaśnienie: zielona linia wskazuje grupę kontrolną. Średnie oraz procentowe udziały grup traktowanych nanocząsteczkami były obliczane względem grupy kontrolnej odpowiadającej danemu punktowi czasowemu; \* - statystycznie istotne różnice pomiędzy owadami intoksykowanymi względem grupy kontrolnej (LSD, ANOVA  $p < 0.05$ ). Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.....75

**Rysunek 36.** Parametr TDNA (ilość DNA w ogonie komety) charakteryzujący stopień uszkodzenia DNA w hemocytach *A. domesticus* w trakcie 10 dniowej ekspozycji na tlenek grafenu (GO i GO+Mn<sup>2+</sup>) w pokarmie. Objaśnienie: różne litery (a, b) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi K, GO i GO+Mn<sup>2+</sup> osobno w każdym punkcie czasowym (test Kruskala-Wallisa,  $p < 0.05$ ). Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.....76

**Rysunek 37.** Parametry TL (tail lenght; długość ogona komety) oraz OTM (olive tail moment) charakteryzujące stopień uszkodzenia DNA w hemocytach *A. domesticus* w trakcie 10 dniowej ekspozycji na tlenek grafenu (GO i GO+Mn<sup>2+</sup>) w pokarmie. Objaśnienie: różne litery (a, b) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi K, GO i GO+Mn<sup>2+</sup> osobno w każdym punkcie czasowym (test Kruskala-Wallisa,  $p < 0.05$ ). Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.....77

**Rysunek 38.** Całkowity poziom reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach jelita *A. domesticus* po 2 dniach oraz 10 dniach ekspozycji na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> w pokarmie. Wyniki otrzymane za pomocą testu Muse® Oxidative Stress Kit. Objaśnienie: litery (a, b) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi K, GO i GO+Mn<sup>2+</sup> osobno w każdym punkcie czasowym (test Kruskala-Wallisa,  $p < 0.05$ ). Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017. ....78

**Rysunek 39.** Stopień apoptozy w komórkach jelita J w komórkach jelita *A. domesticus* po 2 dniach oraz 10 dniach ekspozycji na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> w pokarmie. Wyniki otrzymane za pomocą testu Muse® Annexin V & Dead Cell assay. Objaśnienie: jak w Rys. 32. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017. ....79

**Rysunek 40.** Stopień apoptozy w komórkach jelita *A. domesticus* po 2 dniach oraz 10 dniach ekspozycji na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> w pokarmie. Wyniki otrzymane za pomocą testu Muse® MultiCaspase Assay Kit. Objaśnienie: jak w Rys. 32. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017. ....79

**Rysunek 41.** Udział poszczególnych faz cyklu komórkowego w komórkach jelita *A. domesticus* po 2 dniach oraz 10 dniach ekspozycji na GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> w pokarmie. Wyniki

- otrzymane za pomocą testu Muse® Cell Cycle Assay Kit. Objasnienie: jak w Rys. 32. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.....80
- Rysunek 42.** Przekrój przez jelito przednie *A. domesticus* po 10 dniach ekspozycji na pokarm zawierający GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> (A) kontrola (TEM; Bar = 1,2 μm) (B) grupa traktowana GO (TEM; Bar = 1,2 μm) (C) grupa traktowana GO+Mn<sup>2+</sup> (TEM; Bar = 1,4 μm). Objasnienia: światło jelita przedniego (L), kutikula (Cu), mitochondria (m), jądro (N), mięśnie trzewne (MC), hemocyty (H), krople lipidowe (LP), mikrokosmki (strzałki); zdjęcia opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.....82
- Rysunek 43.** Przekrój jelita środkowego *A. domesticus* po 10 dniach ekspozycji na pokarm zawierający GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> (A) kontrola (TEM; Bar = 0,7 μm) (B) grupa traktowana GO (TEM; Bar = 0,9 μm) (C) grupa traktowana GO+Mn<sup>2+</sup> (TEM; Bar = 1,4 μm). Objasnienia: cysterny retikulum endoplazmatycznego szorstkiego (RER), mitochondria (m), jądro (n), ciała wielopęcherzykowe (MB), mikrokosmki (MV), wakuole (v), autofagosomy (UA), ziarnistości o dużej gęstości elektronowej (strzałki); zdjęcia opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.....84
- Rysunek 44.** Przekrój jelita tylnego *A. domesticus* po 10 dniach ekspozycji na pokarm zawierający GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> (A) kontrola (TEM; Bar = 1,4 μm) (B) grupa traktowana GO (TEM; Bar = 0,9 μm) (C) grupa traktowana GO+Mn<sup>2+</sup> (TEM; Bar = 2 μm). Objasnienia: mitochondria (m), retikulum endoplazmatyczne szorstkie (RER), jądro (n); zdjęcia opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017.....85
- Rysunek 45.** Przekrój przez fragmenty gonad *A. domesticus* po 10 dniach ekspozycji na pokarm zawierający GO oraz GO+Mn<sup>2+</sup> (A-C) kontrola (A) mikroskopia świetlna, Bar = 70 μm. (B) TEM, Bar = 1 μm (C), TEM, Bar = 0,5 μm (D-F) grupa traktowana GO. (D) mikroskopia świetlna, Bar = 20 μm (E) TEM. Bar = 1 μm (F), TEM. Bar = 0,5 μm (G-I) grupa traktowana GO+Mn<sup>2+</sup> (G) mikroskopia świetlna, Bar = 20 μm (H) TEM, Bar = 1 μm. (I), TEM, Bar = 0,5 μm. Centriole (C), jądro (n), pęcherzyki jąder (t); zdjęcia opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2017. ....87
- Rysunek 46.** Parametry sukcesu reprodukcji dla trzech grup doświadczalnych (K, GO20, GO200): ogólna liczba złożonych jaj przez samice, ocena wylęgu z dokładnością do jednej larwy przypadającej na jedną samicę oraz ogólny procent wylęgu w grupach. Objasnienie: różne litery (a, b, c) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi (NIR, ANOVA, p < 0.05).....88
- Rysunek 47.** Jaja złożone przez samice z grupy kontrolnej (K) oraz grupy o najwyższym stężeniu tlenku grafenu (GO200).....88



- Rysunek 48.** Zawartość ATP w tkankach *A. domesticus* po długotrwałej ekspozycji na GO w pokarmie. Objaśnienie: różne litery (a, b, c) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi (NIR, ANOVA,  $p < 0.05$ ) .....89
- Rysunek 49.** Stosunek ilości ADP do ATP w tkankach *A. domesticus* po długotrwałej ekspozycji na GO w pokarmie. Objaśnienie: różne litery (a, b) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi (NIR, ANOVA,  $p < 0.05$ ) .....90
- Rysunek 50.** Stopień uszkodzeń w komórkach jelita *A. domesticus* po jedno- i dwupokoleniowej ekspozycji na GO w pokarmie. Wyniki otrzymane za pomocą testu Muse® Count & Viability Assay. Objaśnienie: różne litery (a, b, c) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi, \* - oznacza różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi w pokoleniu L1 i L2 (NIR, ANOVA,  $p < 0.05$ ). .....91
- Rysunek 51.** Procentowy udział jąder wyznakowanych fluoresceiną (FITC) w trzech grupach doświadczalnych z uwzględnieniem kontroli pozytywnej i negatywnej. Procent liczony względem 1000 analizowanych jąder. Objaśnienie: różne litery (a, b, c) oznaczają różnice pomiędzy grupami doświadczalnymi (test t-Studenta,  $p < 0,05$ ) .....92
- Rysunek 52.** Obrazy mikroskopowe jąder hemocytów *A. domesticus* po długotrwałym traktowaniu nanocząsteczkami tlenku grafenu. Wyniki przedstawiono dla trzech grup eksperymentalnych z uwzględnieniem kontroli pozytywnej i negatywnej. Czerwona wartość [%] oznacza ilość jąder wyznakowanych FITC - procent uszkodzonych jąder (powiększenie 20x; Olympus BX40 Trinocular). .....93

**IX. SPIS TABEL**

<b>Tabela 1.</b> Procentowy udział pierwiastków w próbce tlenku grafenu uzyskany metodą XPS oraz SEM (EDX).....	62
<b>Tabela 2.</b> Procentowy udział wiązań chemicznych w strukturze tlenku grafenu GO .....	63
<b>Tabela 3.</b> Analiza GLM (ang. general linear model, ogólny model liniowy, $p < 0,05$ ) dla czterech parametrów stresu oksydacyjnego na podstawie wyników otrzymanych z hemolimfy i jelita <i>A. domesticus</i> po ekspozycji na tlenek grafenu (GO oraz GO+Mn <sup>2+</sup> ). Parametry zmierzono w kolejnych punktach czasowych (1 h, 24 h, 48 h, 72 h) po iniekcji nanocząsteczek. Objasnienia: (E) Eksperyment: odnosi się do grup traktowanych porównanych względem grupy kontrolnej, (T) Czas: oznacza liczbę godzin od iniekcji nanocząsteczek do poboru tkanek, (N) Narząd: oznacza hemolimfę lub jelito. Wyniki opublikowane w Dziewięcka i wsp. 2015.....	69