

UNIwersytet JANA KOCHANOWSKIEGO W KIELCACH
WYDZIAŁ NAUK ŚCISŁYCH
I PRZYRODNICZYCH

Anna Maria Grzesiakowska

Nr albumu 924

**Wpływ nanocząstek srebra na integralność chromatyny jądrowej
w komórkach somatycznych wybranych przedstawicieli *Canidae***

Rozprawa doktorska
napisana pod kierunkiem
**Prof. dr hab. lek wet.
Olgi Szeleszczuk**

Praca przyjęta pod względem
merytorycznym i formalnym
w formie papierowej i
elektronicznej

.....
/data i podpis promotora/

Kielce 2021

Pani Prof. dr hab. Oldze Szeleszczuk składam serdeczne podziękowania za poświęcony czas, za opiekę merytoryczną i cierpliwość w trakcie realizacji pracy doktorskiej.

Panu dr Markowi Kasprowiczowi dziękuję za zainteresowanie mnie tematyką nanocząstek, przygotowanie materiału badawczego oraz za cenne uwagi i wyjaśnienia zagadnień fizycznych.

Pani dr Marcie Kuchcie-Gładysz dziękuję za ogromną pomoc i wsparcie w trakcie realizacji badań oraz za udzielenie cennych wskazówek podczas przygotowywania i realizacji pracy doktorskiej.

Pani dr hab. inż. Agnieszce Otwinowskiej-Mindur za pomoc w opracowaniu statystycznym.

Bardzo dziękuję Hodowcom lisów z Dębicy i Opola oraz Panu lek.wet. Przemysławowi Baranowi z Przychodni Weterynaryjnej Salamandra w Krakowie za udostępnienie materiału biologicznego do badań.

Mojej Rodzinie i Wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy serdecznie dziękuję za wsparcie i cierpliwość.

*Niniejszą Pracę Dokorską
dedykuję moim Kochanym Rodzicom.*

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	6
1. Wstęp	9
1.1. Nanocząstki srebra	11
1.1.1. Ogólna charakterystyka nanocząstek srebra.....	11
1.1.2. Metody otrzymywania nanocząstek srebra	13
1.1.3. Drogi przenikania nanocząstek srebra do wnętrza organizmów	19
1.1.4. Wpływ nanocząstek srebra na komórki eukariotyczne	21
1.2. Struktura i organizacja chromatyny jądrowej.....	23
1.3. Zaburzenia integralności chromatyny.....	29
1.4. Wykrywanie niestabilności chromatynowej.....	34
1.4.1. Łamliwe miejsca chromosomu – Fragile site.....	34
1.4.2. Test mikrojądrowy.....	39
1.4.3. Test kometowy	43
1.5. Pies domowy – ogólne informacje o gatunku	47
1.5.1. Kariotyp psa domowego.....	49
1.5.2. Pies jako gatunek modelowy w badaniach.....	53
1.6. Lis polarny – ogólne informacje o gatunku	55
1.6.1. Kariotyp lisa polarnego	56
1.6.2. Lis polarny jako gatunek modelowy w badaniach.....	59
2. Cel pracy	62
3. Materiały i metody	63
3.1. Materiał do badań.....	63
3.1.1. Nanocząstki srebra	63
3.1.2. Materiał biologiczny	63
3.2. Metody badawcze	64
3.2.1. Ekspozycja na roztwory koloidalne srebra	64
3.2.2. Ocena żywotności komórek – barwienie błękitem trypanu 0,4%.....	64
3.2.3. Test Fragile site.....	65
3.2.4. Izolacja limfocytów z pełnej krwi obwodowej do testu mikrojądrowego i kometowego.....	66
3.2.5. Test mikrojądrowy w wariacie z zablokowaniem cytokinezy CBMN	67
3.2.6. Test kometowy (SCGE)	68
3.3. Analiza statystyczna	69

4.	Wyniki.....	70
4.1.	Ocena żywotności komórek.....	70
4.2.	Test <i>Fragile site</i>	76
4.3.	Test mikrojądrowy - <i>CBMN</i>	85
4.4.	Test kometowy.....	101
5.	Dyskusja.....	113
5.1.	Charakterystyka nanocząstek srebra	114
5.2.	Żywotność komórek.....	122
5.3.	Test <i>Fragile site</i>	125
5.4.	Test mikrojądrowy - <i>CBMN</i>	128
5.5.	Test kometowy.....	134
5.6.	Porównanie genomu wybranych psowatych.....	137
6.	Wnioski.....	140
7.	Literatura	142
8.	Spis rycin, fotografii i wykresów	168
9.	Spis tabel	170
10.	Streszczenie	173
11.	Summary.....	175

Wykaz stosowanych skrótów:

2n – diploidalna liczba chromosomów

°C: stopień Celsjusza

aCFS: pospolite miejsca łamliwe indukowane przez afidikolinę

Ag⁺: jon/kation srebra

AgNO₃: azotan (V) srebra

AgNP: nanocząstki srebra bez czynnika stabilizującego, otrzymane metodą HVAD

AgNPs: ang. *silver nanoparticles*, nanocząstki srebra

AgNP+C: nanocząstki srebra z dodatkiem trójcytrynianu sodu jako stabilizatora

ALS: ang. *alkali-labile sites*, miejsca alkalicznie labilne

ATP: adenylozotrójfosforan

BER: ang. *base excision repair*, naprawa przez wycięcie uszkodzonej zasady

BNC: ang. *binucleated cell*, komórka dwujądrzasta

BNC+1MN: komórka dwujądrzasta z jednym mikrojądrem

BNC+2MN: komórka dwujądrzasta z dwoma mikrojądrami

BrdU: 5-bromo-2'-deoksyurydyna

CA: ang. *chromosomal aberration*, aberracje chromosomowe

CBMN: ang. *cytokinesis-block micronucleus assay*, test z zahamowaniem cytokinezy przez cytochalazynę B

CFS: ang. *common fragile sites*, pospolite miejsca łamliwe

CIN: ang. *chromosomal instability*, niestabilność chromosomowa

cm: centymetr

CpG: C cytozyna, p reszta kwasu fosforowego, G guanina

Cyt-B: cytochalazyna B

DDR: ang. *DNA damage response*, szlaki naprawy DNA

DMSO: dimetylosulfotlenek

DNA: kwas deoksyrybonukleinowy

DSB: ang. *double-strand break*, pęknięcia dwuniciowe

dTTP: ang. *thymidine triphosphate*, trifosforan deoksytymidyny

EDTANa₂: wersenian disodu

EMn: ang. *erythrocyte micronucleus assay*, erytrocytarny test mikrojądrowy

ERFS: ang. *early replicating fragile sites*, wczesnie replikujące miejsca łamliwe

FDA: ang. *fluorescein diacetate*, dwuoctan fluoresceiny

FdU: fluorodeoksyurydyna

FISH: ang. *fluorescence in situ hybridization*, technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*

FRA, FS: ang. *fragile site*, miejsca łamliwe chromosomów

Gb: giga/miliard par zasad

GCR: ang. *gross chromosomal rearrangements*, poważne rearanżacje chromosomowe

GIN: ang. *genomic instability*, niestabilność genomowa

h: godzina

HR: ang. *homologous recombination*, szlak rekombinacji homologicznej

HVAD: ang. *High Voltage Arc Discharge*, technika

wysokonapięciowych wyładowań w łuku elektrycznym

K⁺: jon/kation potasu

kb = kpz: kilo par zasad

kg: kilogram

KH₂PO₄: diwodorofosforan potasu

kV: kilovolt

LMP: ang. *low melting point*, agarozą o niskiej topliwości

lncRNA: ang. *long non-coding RNA*, długie cząsteczki niekodującego RNA

MAR: ang. *matrix-associated region*, region połączenia z matriks

M: mol, molowy

m: metr

mm: milimetr

m³: metr sześcienny

ml: mililitr

Mb = Mpz: mega/milion par zasad

Min: minuty

miejsca AP: miejsca apurynowe i apirymidowe

MMR: ang. *mismatch repair*, naprawa niedopasowań

MN: ang. *micronucleus*, mikrojądra

MNC: ang. *multinucleated cell*, komórka wielojądrzasta

mV: mega volt

NaCl: chlorek sodu

NaOH: wodorotlenek sodu

Na₂HPO₄: wodorofosforan sodu

NBUD: ang. *nuclear bud*, pąki jądrowe

NDCN: ang. *non-detectable cell nuclei*, niewykrywalne jądra komórkowe

NHEJ: ang. *non-homologous end joining*, szlak niehomologicznego łączenia końców

NHGRI: ang. *US National Human Genome Research Institute*, Amerykański Narodowy Instytut Badań nad Genomem Ludzkim

NER: ang. *nucleotide excision repair*, naprawa przez wycięcie nukleotydów

NF: liczba ramion chromosomalnych

nm: nanometr

NMP: ang. *normal melting point*, agarozą o normalnej topliwości

NOR: ang. *nucleous organizer region*, obszar jąderkotwórczy

NP: ang. *nanoparticles*, nanocząstki

NPB: ang. *nucleoplasmic bridge*, mostki nukleoplazmatyczne

NuRD: kompleks remodelujący nukleosomy i deacetylazy

OECD: ang. *Organisation for Economic Co-operation and Development*, Organizacja Współpracy Gospodarczej i Rozwoju

PBS: ang. *phosphate buffered saline*, buforowana fosforanem sól fizjologiczna

PCE: ang. *polychromatic erythrocytes*, erytrocyty polichromatyczne

pH: ujemny logarytm stężenia jonów wodorowych

PI: ang. *propidium iodide*, jodek propidyny

piRNA: ang. *piwi-interacting RNA*, niekodujące cząsteczki RNA

PVP: poliwinylpiperolidon

pz: par zasad

q: ramię długie chromosomu

RFSs: ang. *rare fragile sites*, miejsca łamliwe typu rzadkiego

RNA: kwas rybonukleinowy

ROS: ang. *reactive oxygen species*, reaktywne formy tlenu

SAR: ang. *scaffold attachment region*, region połączenia z rusztowaniem

SCE: ang. *sister chromatid exchange*, wymiana chromatyd siostrzanych

SCGE: ang. *single cell gel electrophoresis*, elektroforeza pojedynczych jąder interfazowych

SDS: ang. *sodium dodecyl sulfate*, dodecylosiarczan sodu

siRNA: ang. *small interfering RNA*, małe interferujące RNA

SSB: ang. *single-strand break*, pęknięcia jednoniciowe

SSBR: ang. *single-strand break repair*, mechanizm naprawy przerwania pojedynczej nici

S/m: simens na metr, jednostka przewodnictwa właściwego

TM: ang. *tail moment*, moment ogonowy

TSC: trójfosforan sodu

UV: ultrafiolet

µg: mikrogram

µg/ml: mikrogram na mililitr

µl: mikrolitr

µl/hodowlę: mikrolitr na hodowlę

µm: mikrometr

µM: mikromol

V/cm: volt na centymetr

WCPP: ang. *whole chromosome paint probe*, sondy malujące całe chromosomy

1. Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się szeroki rozwój nanotechnologii i nanomateriałów. Duże zainteresowanie nanomateriałami powiązane jest ze zmianą właściwości fizykochemicznych metali czy substancji, powiązanych ze zmniejszeniem rozmiarów poniżej 100 nm. Obecnie ponad 24% nanoproductów zawiera w swoim składzie nanocząstki srebra (AgNPs), których produkcja wzrasta każdego roku (Bhowmik i wsp. 2019). AgNPs mogą zawierać od 10 do 15 000 atomów srebra (Ag^0) i charakteryzują się odmiennymi właściwościami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi w porównaniu do ich materiałów macierzystych (Ahmadi 2020). Ogromne zastosowanie AgNPs w produktach konsumenckich wynika z ich działania antybakteryjnego, antygrzybicznego oraz przeciwzapalnego. Wraz z ciągłym rozwojem nanotechnologii i zapotrzebowaniem na nanomateriały w różnych dziedzinach przemysłu aktualnym pozostaje pytanie o ich wpływ na środowisko i organizmy żywe.

AgNPs mogą zostać uwolnione do środowiska na różnym etapie swojego obiegu, między innymi podczas ich otrzymywania, obróbki w produkcji, czy jego użytkowania. Przedostanie się AgNPs do środowiska, w sposób zamierzony lub niezamierzony, powoduje, że cząstki wchodzi w interakcję z otaczającymi ją elementami ekosystemu, w tym florą, fauną, osadami czy glebą. W związku z tym prowadzonych jest coraz więcej badań dotyczących ekotoksyczności nanocząstek srebra na różne poziomy troficzne, w tym z wykorzystaniem kręgowców jako markerów biologicznych (Tortella i wsp. 2020).

Bardzo ważnym elementem przy stosowaniu AgNPs w produktach, opracowywaniu nowych metod ich otrzymywania czy wykorzystania jest aspekt ich możliwych interakcji z istotami żywymi i wpływu na ich genom. Uwolnione do środowiska cząstki lub obecne w licznych produktach konsumenckich AgNPs mogą przedostawać się do wnętrza organizmów różnymi drogami. Ze względu na swoje niewielkie rozmiary AgNPs mogą przenikać przez błony komórkowe i oddziaływać na elementy komórkowe, zaburzając ich funkcjonowanie. Dostępnych jest wiele danych literaturowych na temat potencjalnego cytotoksycznego i genotoksycznego wpływu AgNPs na komórki eukariotyczne. Jednak efekty te zależne są od czynników związanych z budową i syntezą tych cząstek.

Człowiek i zwierzęta mogą być narażeni na szkodliwe działanie AgNPs na wielu płaszczyznach. Niezamierzona ekspozycja może być wynikiem uwolnienia nanocząstek do środowiska, jak również ich nagromadzenia w niższych ogniwach łańcucha troficznego. Ocena potencjalnego narażenia człowieka na niekorzystne działanie AgNPs może być określona przy wykorzystaniu zwierząt towarzyszących i hodowlanych jako modelu badawczego. Zwierzęta towarzyszące człowiekowi, ze względu na wspólne środowisko bytowania są dobrym wskaźnikiem narażenia na nanocząstki srebra pochodzące z różnych produktów konsumenckich. Natomiast mięsożerne zwierzęta hodowlane, skarmiane produktami odpadowymi z przemysłu spożywczego, rybnego, zbożowego i mleczarskiego, przetwarzanymi na paszę wysokiej jakości, mogą być narażone na ekspozycję nanocząstek srebra wynikające z nagromadzenia AgNPs w łańcuchu troficznym czy z ekspozycji środowiskowej (Kuźniewicz i Filistowicz 1999). Szkodliwe działanie różnych czynników, w tym nanomateriałów na organizmy żywe może mieć ogromne znaczenie na stabilność ich genomu. Zwiększona niestabilność genomu, w tym nagromadzenie uszkodzeń DNA może prowadzić do rozwoju mutacji i wzrostu procesów nowotworzenia (Langie i wsp. 2015).

W przedstawionej dysertacji przeprowadzono ocenę szkodliwego wpływu nanocząstek srebra na komórki somatyczne zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem dwóch gatunków *Carnivora* – psa domowego i lisa polarnego. Zastosowane AgNPs były produkowane metodą fizyczną, HVAD, jako alternatywy dla technik chemicznej syntezy. Ekspozycji w warunkach *in vitro* poddano komórki krwi obwodowej pochodzącej od psowatych, jako zwierząt towarzyszących i hodowlanych, będących modelem dla narażenia ludzi. Zmiany integralności chromatyny po działaniu AgNPs analizowano przy wykorzystaniu cytogenetycznych testów niestabilności.

1.1. Nanocząstki srebra

1.1.1. Ogólna charakterystyka nanocząstek srebra

Nanocząstki (ang. *nanoparticles*, NPs), nazywane również nanomateriałami (ang. *nanomaterial*), zostały zdefiniowane jako naturalnie i przypadkowo powstające lub jako wytworzony materiał zawierający cząstki w stanie wolnym lub jako agregaty czy aglomeraty, w którym przynajmniej 50% cząstek ma jeden lub więcej wymiarów w zakresie od 1 do 100 nm (Komisja Europejska 2011/696/EU).

Nanomateriały stają się znaczącym elementem naszego życia codziennego. Obecnie wytwarzane są w setkach tysięcy ton rocznie, a ich produkcja wzrasta każdego roku, wraz ze wzrostem zainteresowania i zapotrzebowania. Największym zainteresowaniem w skali nano cieszą się pierwiastki lub związki chemiczne, takie jak: srebro, złoto, cynk, selen, dwutlenek tytanu, węgiel. W 2014 roku światowa produkcja nanocząstek srebra mieściła się w przedziale 135 – 420 ton (Pulit-Prociak i Banach 2016). Według Rodrigues-Garraus i wsp. (2020) każdego roku produkowanych jest około 320 ton nanocząstek srebra.

Nanocząstki srebra (ang. *silver nanoparticles*, AgNPs) są jednym z najczęściej używanych nanomateriałów. Wynika to z ich antybakteryjnych właściwości oraz cech fizykochemicznych (Pulit-Prociak i Banach 2016, Crisan i wsp. 2021). Nanosrebro, określane jako srebro koloidalne, najczęściej występuje w postaci zawiesiny, składającej się z cząstek, których co najmniej jeden wymiar jest poniżej 100 nm (Arora i wsp. 2008, Pulit-Prociak i Banach 2016). Zawiesina nanocząstek srebra charakteryzuje się żółtym, żółtawobrazowym, brązowoszarym lub czerwonym zabarwieniem (Sidharta 2013). Jest to efekt częściowej absorpcji światła związanej z powierzchniowym rezonansem plazmonowym (ang. *surface plasmon resonance*), który jest charakterystyczny dla nanocząstek metali (Smitha i wsp. 2008, Pryshchepa i wsp. 2020). W zjawisku tym część energii świetlnej padającej pod ściśle określonym kątem może oddziaływać z zdelokalizowanymi elektronami w warstwie metalu zmniejszając w ten sposób natężenie światła odbitego (Pattnaik 2005). Właściwości biologiczne nanocząstek srebra zależą przede wszystkim od ich morfologii i charakterystyki fizykochemicznej cząstek. Kształt i wielkość cząstek zależy głównie od metody ich syntezy (Iravani i wsp. 2014, Pryshchepa i wsp. 2020). Dodatkowym czynnikiem jest obecność powłoki stabilizującej strukturę nano oraz zapobiegającej

agregacji cząstek. Jako stabilizatory najczęściej stosowane są cytrynian sodu, polimery, białka lub cukry. Wszystkie te czynniki mają wpływ na końcowe właściwości fizykochemiczne AgNPs i ich stabilność (Wei i wsp. 2015, Akter i wsp. 2018).

Nanocząstki srebra są jednym z głównych składników produktów i materiałów o działaniu antyseptycznym, dlatego znalazły zastosowanie w różnych gałęziach przemysłu, Stosuje się je w kosmetykach (takich jak: kremy przeciwsłoneczne, pasty do zębów, dezodoranty), detergentach, środkach odkażających, farbach i powłokach urządzeń AGD (w tym: zmywarek, pralek, lodówek), w systemach do uzdatniania wody, tekstyliach, materiałach sportowych, opakowaniach żywności i innych. Szerokie zastosowanie AgNPs znalazły w medycynie, w tym do pokrycia narzędzi chirurgicznych, protez kości, czy komponentów dentystycznych. Są również wykorzystywane do prewencji i zwalczania wielu chorób, takich jak malaria, toczeń, tyfus, tężec, czy gruźlica ponieważ odkryto, że AgNsP może hamować wzrost bakterii, grzybów, czy nawet wirusów (Dobrzyńska i wsp. 2014, Akter i wsp. 2018, Ferdous i Nemmar 2020, Rodriguez-Garraus i wsp. 2020).

Każdego roku wzrasta globalny popyt na nanomateriały, tym samym zwiększając ich przenikanie do środowiska. Wpływ nanocząstek na środowisko może mieć wiele form, w tym znaczny efekt wywierany na funkcjonowanie organizmów żywych. Nanocząstki, które raz zostaną wprowadzone do środowiska wpływają na zanieczyszczenie gleb, wód powierzchniowych i gruntowych, florę oraz faunę. W środowisku mogą wiązać się z osadami lub ciałami stałymi, gdzie mogą być akumulowane, a następnie dostać się do źródeł wody pitnej lub wejść do łańcucha pokarmowego. Dodatkowo ze względu na swoją charakterystyczną antybakteryjną stabilność AgNPs zostają przez dłuższy czas w środowisku i w organizmie po wniknięciu (Dobrzyńska i wsp. 2014, Tortella i wsp. 2020). Z tego względu AgNPs uważane są za toksyczne zagrożenie biologiczne (Pulit-Prociak i Banach 2016).

1.1.2. Metody otrzymywania nanocząstek srebra

W celu otrzymania, syntezy nanocząstek srebra stosowane są dwa podejścia metodologiczne. Obejmuje podział na metody zwane „top-down” oraz „bottom-up” (Biswas i wsp. 2012, Barkat i wsp. 2017, Khan i wsp. 2018, Pryshchepa i wsp. 2020). Pierwsze podejście, czyli „top-down” lub inaczej „top to bottom”, rozumiane jako „z góry na dół”, polega na tworzeniu NPs w skali makro w wyniku dezintegracji cząstek z powierzchni metalu. W podejściu tym nanocząstki są zwykle syntetyzowane przez odparowanie i kondensację oraz podział materiału masowego/objętościowego na drobne cząstki poprzez zmniejszenie rozmiaru za pomocą różnych technik. Do tych metod zaliczane są ablacja laserowa, rozkład termiczny oraz wyładowania w łuku elektrycznym, trawienie chemiczne lub mechaniczne (Biswas i wsp. 2012, Barkat i wsp. 2017, Khan i wsp. 2018, Pryshchepa i wsp. 2020). Synteza NPs w metodzie „bottom-up” lub „bottom to up”, rozumiane jako „z dołu do góry”, polega na budowaniu od podstaw, czyli atom po atomie. Obejmuje różnorodne techniki syntetyczne, wykorzystujące składniki molekularne, atomowe lub jonowe do wytworzenia bardziej złożonych nanostruktur. W metodzie tej mogą być wykorzystane również podejścia biologiczne związane z niezależnym łączeniem się atomów w nowe jądra, które rozwijają się w cząstki w nanoskali (Biswas i wsp. 2012, Khan i wsp. 2018, Pryshchepa i wsp. 2020). Synteza w podejściu „bottom-up” następuje w wyniku redukcji soli metali i wiąże się z wykorzystaniem procesów elektrochemicznych i sonochemicznych (Kasprowicz i wsp. 2016, Barkat i wsp. 2017).

Techniki syntezy nanocząstek srebra można podzielić również na kategorie w zależności od wykorzystywanych procesów, to jest metody chemiczne, fizyczne i biologiczne. Wybór techniki syntezy AgNPs determinuje właściwości cząstek (Pryshchepa i wsp. 2020).

Metody chemiczne

Powszechnie stosowane są metody chemiczne, stanowiące najliczniejszą grupę technik. Obejmują one redukcję chemiczną, fotoindukowaną redukcję, techniki mikroemulsyjne, elektrochemiczne metody syntezy, fotoredukcję inicjowaną promieniowaniem UV i metody napromieniowania (Iravani i wsp. 2014, Crisan i wsp. 2021). Synteza chemiczna wiąże się z przemianami materiałów wyjściowych, a sam proces wymaga obecności trzech głównych składników, to jest: prekursora metalu,

czynnika redukującego i środków stabilizujących, kapsułkujących. Ważnym składnikiem w syntezie NPs jest rozpuszczalnik (Zhang i wsp. 2016). Jednym z częściej stosowanych szlaków chemicznego otrzymywania AgNPs jest metoda redukcji, czyli redukcji soli srebra przez czynnik redukujący. W pierwszym etapie tego procesu powstają wolne atomy srebra w wyniku reakcji redoks (Iravani i wsp. 2014). Elektrony, które pochodzą z reduktora są przenoszone na atom srebra. Dalej, w wyniku zderzania się atomów srebra powstają stabilne jądra nanocząstek. Kolejny etap to wzrost nanocząstek srebra w związku z dalszą redukcją jonu srebra na powierzchni powstałych jąder. Etap ten trwa aż do wyczerpania jonów metalu (Iravani i wsp. 2014, Suriati i wsp. 2014). Na kształt i wielkość produkowanych metodą redukcji nanocząstek ma wpływ wiele czynników, takich jak: pH, temperatura, mieszanie, czas reakcji, stosowane odczynniki (Malina i wsp. 2010). Najczęstszym źródłem jonów srebra jest azotan srebra (AgNO_3), ale wykorzystywane są także inne sole tego metalu. Jako reduktora jonów srebra stosuje się wiele różnych substancji, jak: borowodorek sodu, etanol, cytrynian sodu, kwas askorbinowy, wodór elementarny, odczynnik Tollensa i inne (Iravani i wsp. 2014, Pryshchepa i wsp. 2020). Prowadzone są badania nad wykorzystywaniem do syntezy mniej toksycznych reduktorów. W niektórych przypadkach stosuje się substancję, która jednocześnie może pełnić rolę reduktora i stabilizatora, na przykład cytrynian sodu (Desai i wsp. 2012). Istnieją również metody chemiczne, które nie wymagają stosowania reduktora. Wykorzystuje się alkoholowe roztwory AgNO_3 , ciągle mieszanie, a po redukcji atomów srebra dodawany jest stabilizator (Hah i wsp. 2003, Tian i wsp. 2019).

Kolejną techniką otrzymywania AgNPs na drodze chemicznej jest wykorzystanie miceli typu woda w oleju. Krople wody zawieszono w rozpraszającej fazie olejowej i stabilizowano na granicy faz przez surfaktant (Zhang i wsp. 2007a). Takie krople wody stanowią mikroreaktory, w których dochodzi do reakcji syntezy. AgNPs są syntezowane w micelach, w których zachodzi proces nukleacji i wzrostu, ograniczany przez surfaktant, pełniący także rolę stabilizatora, który zapobiega agregacji cząstek (Zhang i wsp. 2007b). Możliwa jest również synteza AgNPs w układzie odwrotnej miceli. W tej technice miesza się dwie emulsje zawierające sól srebrną i reduktor. W wyniku wymieszania emulsji następuje kolizja kropli i wymiana reagentów między micelami na zasadzie dyfuzji. Następnie jony srebra są redukowane

i wytwarzane jest jądro nanocząstki, które wzrasta wewnątrz miceli (Zhang i wsp. 2008a).

Metody fizyczne

Metody fizyczne w ostatnich latach są powszechniej wykorzystywane do syntezy AgNPs, w związku z licznymi zaletami. Pozwalają na otrzymywanie jednolitych rozmiarowo nanocząstek bez zanieczyszczeń pochodzących z rozpuszczalników chemicznych (Iravani i wsp. 2014). Ograniczeniami tych metod jest fakt, że czasami wymagają specjalistycznej aparatury, dużego nakładu energii lub czasu (Zhang i wsp. 2016). Jednym z przykładów metod fizycznych jest technika odparowywania w połączeniu ze skraplaniem. W tym przypadku przeprowadza się ogrzewanie srebra w wysokiej temperaturze, w wyniku czego dochodzi do jego odparowywania i powstawanie jonów Ag^+ . Dalej w procesie nukleacji powstają zarodki, które dojrzewając dają nanocząstki, których kondensacja zachodzi w wyniku procesu schładzania (Jung i wsp. 2006, Iravani i wsp. 2014).

Jedną z pierwszych i najczęściej stosowanych metod fizycznych do syntezy nanocząstek jest ablacja laserowa (Mafuné i wsp. 2000, Kang i wsp. 2019). Wytwarzanie NPs przebiega poprzez ablację laserową stałego obiektu (usuwanie materiału przez wiązkę laserową), który znajduje się w środowisku ciekłym lub gazowym. Powstałe nanocząstki są zbierane w postaci roztworu koloidalnego lub nanoproszku (Semaltianos 2010). Wydajność ablacji laserowej i charakterystyka wytworzonych AgNPs zależy od wielu parametrów, między innymi od długości fali lasera padającego na metaliczny cel, czasu trwania pojedynczych impulsów laserowych, medium ciekłego czy obecności środków powierzchniowo czynnych (Kim i wsp. 2005, Tarasenko i wsp. 2006). Istotną zaletą tej techniki jest brak odczynników chemicznych w roztworach, co pozwala na otrzymanie czystych i niezanieczyszczonych koloidów metali (Tsuji i wsp. 2002, Semaltianos 2010).

Inną metodą fizyczną syntezy AgNPs jest technika wysokonapięciowych wyładowań w łuku elektrycznym (HVAD, ang. *High Voltage Arc Discharge*) opracowana przez Kasproicz i wsp. (2010). Prekursorem tej techniki była metoda wyładowania iskrowego (ang. *spark discharge method*), którą po raz pierwszy opisał Tien i wsp. (2008). Do wytworzenia nanocząstek srebra wykorzystywano w tej metodzie elektryczne wyładowania iskrowe do dezintegracji powierzchni prętów

srebrowych w dejonizowanej wodzie bez dodatku środków powierzchniowo czynnych. W wyniku tego procesu otrzymano metaliczne AgNPs o wielkości 10 nm oraz srebro jonowe (Tien i wsp. 2008). Natomiast w metodzie HVAD wykorzystano zjawisko wyładowań elektrycznych pomiędzy dwoma elektrodami wykonanymi ze srebra i zanurzonymi w cieczy – woda, roztwór cytrynianu sodu czy etanol. Nanocząstki powstają w wyniku dezintegracji srebra z powierzchni elektrod w skutek przyłożonego napięcia. Metoda HVAD poprzez zmianę parametrów takich jak: napięcie, odległość między elektrodami, liczba impulsów elektrycznych czy typ rozpuszczalnika, wpływa na stężenie otrzymanych nanocząstek srebra oraz ich kształt i wielkość (Kasprowicz i wsp. 2010, Kasprowicz i wsp. 2016).

Metody pośrednie

Istnieją także liczne metody pośrednie łączące ze sobą powyższe warianty jako metody fizykochemiczne. Należą do nich między innymi metoda elektrochemicznej syntezy, z wykorzystaniem naświetlania światłem laserowym, metoda sonochemiczna i fotochemiczna. Metody te są jednak zdecydowanie rzadziej wykorzystywane niż metody chemiczne. Synteza elektrochemiczna pozwala na wytworzenie stabilnych AgNPs o określonym kształcie i rozmiarze. W tej technice przeprowadza się redukcję soli srebra na elektrodzie katodowej, w wyniku tej reakcji otrzymuje się nanocząstki, które są stabilizowane przez sól. Rolę stabilizatora w tej technice może pełnić matryca DNA (Johans i wsp. 2002, Jin i wsp. 2011). Z kolei w technice naświetlania światłem laserowym, procesowi poddawane są wodne roztwory azotanu srebra i dodecylosiarczanu sodu (SDS). Dochodzi do fotolizy wody i powstania wolnych rodników oraz elektronów. Następnie elektrony mogą redukować jony srebra do formy metalicznej tworząc zarodki nanocząstek, które dalej rosną w wyniku fotoredukcji kolejnych jonów na swojej powierzchni (Abid i wsp. 2002). Inną metodą fizykochemiczną jest technika sonoelektrochemii wykorzystująca naprzemienne impulsy soniczne i elektryczne do mechanicznej manipulacji materiałem i tworzenia nanocząstek zawieszonych w roztworze (Iravani i wsp. 2014). Metoda ta pozwala na kontrolowanie rozmiarów syntezowanych cząstek (Socol i wsp. 2002). Natomiast w metodzie fotochemicznej wykorzystuje się promieniowanie ultrafioletowe (Jara i wsp. 2021). W metodzie tej roztwory zawierające prekursorzy metali (np. sól) naświetla się światłem UV. W procesie wymagana jest obecność czynnika redukującego, a niekiedy także czynnika stabilizującego (Abedini i wsp. 2013). Zredukowany

prekursor metalu w stanie zerowym tworzy centrum nukleacji lub jądra, które następnie rosną i agregują dając początek metalicznym NPs (Mallick i wsp. 2001). Kontrola czasu naświetlania pozwala na kontrolowaną redukcję metalu (Darroudi i wsp. 2011). Z kolei zmiana długości użytego światła umożliwia monitorowanie morfologii powstałych nanostruktur. Metoda ta pozwala na szybką syntezę jednorodnych NPs (Jara i wsp. 2021).

Metody biologiczne

Biologiczne metody syntezy AgNP stanowią alternatywę dla technik chemicznych i fizycznych, dlatego cieszą się wzrastającym zainteresowaniem. Metody te są stosunkowo szybkie, nisko budżetowe, a przede wszystkim przyjazne dla środowiska (Rauwel i wsp. 2015). Synteza biologiczna NPs opiera się na tych samych zasadach co metody chemiczne, jedynie czynniki redukujące, kapsułkujące i stabilizujące biorące udział w reakcjach powinny być pochodzenia biologicznego (Pryshchepa i wsp. 2020). Podstawowym wymogiem zielonej syntezy AgNPs jest obecność roztworu jonów metalu, w tym przypadku srebra oraz redukującego czynnika biologicznego. W większości przypadków substancje redukujące lub inne składniki obecne w komórkach działają jako czynniki stabilizujące i kapsułkujące, dlatego związki te nie muszą być podawane z zewnątrz. Natomiast źródłem jonów Ag^+ jest najczęściej wodny roztwór $AgNO_3$ (Srikar i wsp. 2016, Rafique i wsp. 2017). Mechanizm syntezy AgNPs przez jednostki biologiczne wiąże się z obecnością w ich komórkach dużej liczby organicznych związków chemicznych zdolnych do oddania elektronów w celu redukcji jonów Ag^+ do Ag^0 . Do biologicznych związków o właściwościach redukujących, należą między innymi: węglowodany, tłuszcze, białka, enzymy, koenzymy, fenole, flawonoidy, alkaloidy. Zastosowana substancja aktywna, odpowiedzialna za redukcję jonów srebra zmienia się w zależności od użytego organizmu lub ekstraktu (Jha i wsp. 2009). Metody biologicznej syntezy dzielą się na trzy kategorie: 1) bazująca na wykorzystaniu mikroorganizmów, takich jak bakterie, grzyby i promieniowce; 2) oparta na wykorzystaniu roślin i ich ekstraktów, oraz 3) związane z wykorzystaniem szablonów, matryc takich jak wirusy, DNA (Rafique i wsp. 2017, Jorge de Souza i wsp. 2019).

Synteza AgNPs przez mikroorganizmy opiera się głównie na wykorzystaniu bakterii i grzybów. Zdolność do syntezy nanocząstek srebra wykazują między innymi

bakterie z rodzaju *Pseudomonas stutzeri* (Prabhu i Poullose 2012), *Lactobacillus spp.* (Nair i Pradeep 2002), *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli* i *Enterobacter cloacae* (Shahverdi i wsp. 2007), *Bacillus spp.* (Kalimuthu i wsp. 2008), *Staphylococcus aureus* (Nanda i Saravanan 2009), *Enterobacteriaceae spp.* (Samadi i wsp. 2009). Bakterie syntetyzują AgNPs na drodze bioredukcji, w której reduktazy przekształcają jony Ag^+ do AgNPs. Kolejną grupą mikroorganizmów wykazującą potencjał do syntezy metalicznych NPs są grzyby, które posiadają zdolność do bioakumulacji metali i ich tolerancję (Sastri i wsp. 2003, Dhillon i wsp. 2012). Zdolność do syntezy AgNPs wykazują między innymi grzyby: *Fusarium oxysporum* (Duran i wsp. 2007), *Aspergillus flavus* (Vigneshwaran i wsp. 2007), *Trichoderma reesei* (Vahabi i wsp. 2011). Reakcja syntezy prowadzona przez mikroorganizmy może zachodzić w środowisku wewnątrzkomórkowym, jak i zewnątrzkomórkowym, w zależności od miejsca redukcji jonów srebra (Mukherjee i wsp. 2001, Javid i wsp. 2018).

Inną, szeroko wykorzystywaną techniką biologicznej syntezy AgNPs są metody oparte o zastosowanie roślin lub ich ekstraktów. Rośliny, będące w całości lub ich części (liście, kora, korzeń, łodyga, nasiona, owoce) są wykorzystywane jako źródło czynnika redukującego w celu przekształcenia prekursora metalicznego srebra w nanocząstki. Metoda ta ma zdolność do minimalizowania toksyczności i charakteryzuje się niewielkim wpływem na środowisko (Rauwel i wsp. 2015). Rafique i wsp. (2017) w swoim artykule przeglądowym, przedstawili zestawienie prawie 100 doniesień literaturowych dotyczących syntezy AgNPs w oparciu o różne gatunki roślin i wykorzystywane ekstrakty. W tych doniesieniach, prekursorem jonów srebra był $AgNO_3$. Ekstrakty roślinne zawierają wyższe stężenia biomolekuł, które działają zarówno jako czynnik redukujący, jak i stabilizujący. Zaliczane są do nich między innymi polisacharydy, fenole, alkaloidy, flawony, aminokwasy, enzymy, białka (Mittal i wsp. 2013, Rafique i wsp. 2017). Synteza z wykorzystaniem ekstraktów roślinnych generuje nanocząstki o dobrze zdefiniowanym kształcie, strukturze i morfologii (Patete i wsp. 2011).

1.1.3. Drogi przenikania nanocząstek srebra do wnętrza organizmów

Nanocząstki srebra mogą wnikać do organizmu, człowieka czy zwierząt, czterema różnymi drogami. Na drodze absorpcji i penetracji przez skórę, inhalacji przez układ oddechowy, połknięcia czy celową iniekcję (Pulit-Prociak i Banach 2016, Ferdous i Nemmar 2020). Wziewnie nanocząstki srebra docierają do płuc, skąd przenikają do krwioobiegu, a dalej mogą dostawać się do narządów wewnętrznych (Świdwińska-Gajewska i Czerczak 2014). AgNPs wykazują tendencje do akumulowania się w różnych organach. Ich zwiększoną obecność stwierdzono głównie w wątrobie, śledzionie, nerkach i płucach, a szczególnie niebezpieczne jest zaleganie tych cząstek w wątrobie. Srebro ulega absorpcji i przemianom metabolicznym w tkankach miękkich. Istnieją dane literaturowe dotyczące badań na zwierzętach i prób klinicznych na ludziach, które wykazały, że AgNPs wnikają do tkanek centralnego układu nerwowego, mogąc tam powodować uszkodzenia neurotoksyczne (Panyala i wsp. 2008).

AgNPs, które dostaną się do organizmu przez układ oddechowy, może powodować zmiany i uszkodzenia w obrębie płuc. Nanosrebro może indukować powstawanie rodników powierzchniowych i ROS (reaktywnych form tlenu), które są szkodliwe dla pęcherzyków płucnych. Wykazano, że ekspozycja na AgNPs może powodować stres oksydacyjny w komórkach epitelialnych i makrofagach pęcherzyków płucnych (Panyala i wsp. 2008). W badaniach histopatologicznych płuc szczurów po 28-dniowym doustnym podawaniu AgNPs stwierdzono chroniczne zapalenie pęcherzyków płucnych i małe zmiany ziarniniakowe (Park i wsp. 2010). Świdwińska-Gajewska i Czerczak (2014) u szczurów po takim samym czasie ekspozycji na AgNPs drogą inhalacyjną, stwierdzili ich zwiększoną zawartość w płucach i mózgu. Z kolei, w dłuższym eksperymencie z wykorzystaniem aerozolu nanocząstek srebra, zaobserwowano u szczurów zwiększoną zawartość srebra we krwi, wątrobie, mózgu i nerkach. Natomiast po 10-dniowym inhalacyjnym narażeniu myszy na małe cząstki AgNPs, o wielkości 2 – 5 nm, stwierdzono że około 4% podanej dawki zostało zdeponowane w płucach (Świdwińska-Gajewska i Czerczak 2014).

Drugą drogą wnikania AgNPs do wnętrza organizmu jest droga pokarmowa. Świdwińska-Gajewska i Czerczak (2014) sugerują, że nanocząstki srebra po wnikięciu do organizmu drogą pokarmową, mogą być wchłaniane z jelit do krwi, a dalej transportowane do innych narządów. Po 28-dniowym eksperymencie, w którym AgNPs

podawano szczurom drogą pokarmową, stwierdzono obecność tych cząstek w wątrobie, śledzionie, nerkach, mózgu, jajnikach i jądrach. Ferdous i Nemmar (2020) jako potencjalne źródło zakażenia doustnego wskazują na możliwą obecność AgNPs w suplementach diety, skażonej wodzie czy w wyniku nagromadzenia cząstek w łańcuchu troficznym. Ostatnie badania Mackevica i wsp. (2016) dowiodły, że AgNPs zawarte w opakowaniach do żywności, mogą z nich migrować do przechowywanych produktów w zależności od warunków magazynowania.

Kolejną możliwością wnikania AgNPs do organizmu jest kontakt skórny i iniekcje. Prowadzone były liczne badania na zwierzętach z narażeniem na działanie AgNPs przez kontakt skórny, jednak ich wyniki nie były jednoznaczne. Zaobserwowano, że AgNPs mogą działać drażniąco na skórę i prowadzić do zmian nie tylko w jej obrębie, ale także w innych narządach oraz tkance mięśniowej i kostnej (Świdwińska-Gajewska i Czerczak 2014). Park i wsp. (2011) prowadzili badania, w których przez 28 dni domięśniowo podawano szczurom AgNPs. Autorzy zaobserwowali, że wszystkie cząstki zostały rozprowadzone do narządów o dużej liczbie komórek fagocytujących, czyli do wątroby, śledziony i płuc. Możliwość przenikania AgNPs przez skórę ludzką w warunkach *in vivo* zbadali George i wsp. (2014) wykazując zdolność cząstek do jej penetracji i akumulacji srebra wyłącznie w warstwie skóry właściwej.

Stwierdzono również, że AgNPs wykazują silnie toksyczne działanie na układ rozrodczy. W przypadku układu rozrodczego męskiego wynika to ze zdolności nanocząstek do przekraczania bariery krew-jądra, wywierając niekorzystny wpływ na plemniki (McAuliffe i Perry 2007, Ema i wsp. 2017). Wykazano, że AgNPs mogą wpływać na spermatogenezę, a także zmniejszać ilość nasienia w najądrzach czy zwiększać poziom uszkodzeń komórek rozrodczych (Gromadzka-Ostrowska i wsp. 2012, Han i wsp. 2016). Ekspozycja na nanosrebro może indukować zmiany w poziomie hormonów płciowych oraz zmieniać morfologię oraz żywotność plemników co zaobserwowano u szczurów i królików (Ema i wsp. 2017). Szkodliwy wpływ nanosrebra wykazano również w odniesieniu do żeńskiego układu rozrodczego (Ema i wsp. 2017). W badaniach prowadzonych na samicach myszy po iniekcji AgNPs stwierdzono zmniejszenie liczby pęcherzyków jajnikowych oraz zahamowanie ich dojrzewania i atrezji dojrzałych pęcherzyków (Han i wsp. 2016). Melnik i wsp. (2013) zaobserwowali na przykładzie szczurów, że AgNPs mogą pokonywać barierę krew-

łożysko oraz w przypadku ekspozycji na produkty zawierające nanocząstki srebra mogą się one przedostawać od matek do płodów, czy do mleka matek karmiących. Zdolność do przenikania bariery krew-jądra, krew-jajniki, krew-łożysko jest charakterystyczna dla najmniejszych nanocząstek srebra o średnicy do 20 nm, dodatkowo mogą się one odkładać w tkankach i narządach płodów (Ema i wsp. 2017).

Zwiększona lub przedłużająca się ekspozycja na srebro (koloidalne, jak również jego sole) powoduje zdeponowanie metalicznego srebra pod skórą. Tym samym wiąże się to z wystąpieniem specyficznych objawów klinicznych choroby skóry, takich jak algyria (srebrzyca). Osoby cierpiące na srebrzycę charakteryzują się szaro-niebieskim zabarwieniem skóry i tkanek w wyniku osadzania się nierozpuszczalnych albuminianów srebra (Panyala i wsp. 2008, McShan i wsp. 2014).

1.1.4. Wpływ nanocząstek srebra na komórki eukariotyczne

Wpływ nanocząstek srebra na komórki może mieć różny charakter. Jednak w dostępnej literaturze przewagę stanowią informacje o niekorzystnym, wręcz szkodliwym działaniu AgNPs na komórki eukariotyczne. Efekt, jaki nanocząstki srebra wywierają na komórki somatyczne zależy od wielu czynników, takich jak: metoda produkcji, wielkość, kształt, stężenie, czynnik opłaszczający i inne. Zagłębiając się w mechanizmy i ścieżki oddziaływania AgNPs należy rozróżnić charakter cytotoksyczny od genotoksycznego nanosrebra. Działanie cytotoksyczne rozumiane jest jako indukowanie zaburzeń na różnych poziomach organizacji i funkcjonowania komórki, przez zaburzenia podziałów komórkowych czy wywoływanie stresu oksydacyjnego. Natomiast efekt genotoksyczny wiąże się z działaniem, które wywołuje mutacje punktowe, insercje, delecje, amplifikacje genów, zmiany liczbowe chromosomów (aneuploidie) lub rearanżacje chromosomowe (Phillips i Arlt 2009). Działanie genotoksyczne AgNPs może przebiegać bezpośrednio, albo być efektem pośrednim niekorzystnych zmian zachodzących w komórce, między innymi na skutek stresu oksydacyjnego (Dobrzyńska i wsp. 2014).

Cytotoksyczny charakter nanocząstek srebra potwierdzają liczne dane literaturowe, wskazując na indukowanie ROS, stresu oksydacyjnego oraz zaburzenie cyklu komórkowego. Panyala i wsp. (2008) wskazują, że AgNPs wiążą się z białkami i enzymami w komórkach ssaków. Tym samym mogą wchodzić w adhezyjną interakcję

z błoną komórkową i produkować wysoko reaktywne, toksyczne rodniki, jak reaktywne formy tlenu (ROS), które z kolei powodują stany zapalne w komórce i niszczą elementy komórkowe, w tym mitochondria. Przez działanie AgNPs w komórce może dochodzić do zakłócenia łańcucha oddechowego mitochondriów. Uszkodzenia strukturalne i funkcjonalne mitochondriów mogą powodować zahamowanie procesów metabolicznych, a następnie zmniejszenie wydajności ATP (AshaRani i wsp. 2009). W prawidłowo funkcjonującej komórce, ROS powstają w małym stężeniu podczas oddychania komórkowego na mitochondrialnym łańcuchu przenoszenia elektronów, gdyż pełnią funkcję sygnalizacyjną w komórce. Działanie AgNPs na komórkę zwiększa produkcję ROS przez zakłócanie funkcjonowania mitochondriów i innych enzymów szlaku oddychania komórkowego, co generuje poziom toksyczności (Kruszewski i wsp. 2011).

Naidu i wsp. (2015) sugerują, że AgNPs po wniknięciu do komórki mogą ulegać jonizacji, aktywując tym samym kanały jonowe i zmieniając przepuszczalność błony komórkowej dla jonów sodu i potasu. Kolejnym procesem może być interakcja cząstek z mitochondriami i indukcja szlaku apoptozy przez produkcję zwiększonej liczby reaktywnych form tlenu, które prowadzą do śmierci komórki. Stwierdzono, że nanocząstki srebra mogą indukować powstawanie czynników apoptotycznych, które prowadzą do śmierci komórki lub nekrozy (Panyala i wsp. 2008). Stres oksydacyjny będący wynikiem nadmiernego wytwarzania ROS indukuje procesy apoptozy komórek (Ahamed i wsp. 2008)

Z kolei innym efektem obecności AgNPs w jądrze komórkowym może być jego wpływ na przebieg podziału komórkowego. Magdolenova i wsp. (2014) zaobserwowali, że cząstki małe, których średnica wynosi 8 – 10 nm mogą przedostawać się do wnętrza jądra przez pory w otoczce jądrowej. Natomiast większe AgNPs, 15 – 60 nm średnicy, zawieszane w cytoplazmie w trakcie interfazy, mogą mieć dostęp do materiału genetycznego podczas podziału komórkowego kiedy zanika otoczka jądrowa i wtedy mogą powodować zaburzenia tego procesu. Stres oksydacyjny powstający w wyniku działania AgNPs może indukować uszkodzenia DNA i tym samym zaburzać cykl komórkowy. Komórki z uszkodzonym DNA gromadzą się w poszczególnych fazach cyklu: w przerwie G1, w fazie S, G2 oraz na granicy G2 i mitozy. Z kolei komórki o nieodwracalnych uszkodzeniach ulegają apoptozie, tym samym prowadząc do akumulacji komórek w fazie subG1. Natomiast wzrost komórek w fazie G1 i ich

nagromadzenie w fazie G2/M występuje na skutek obniżenia poziomu ATP po ekspozycji na AgNPs (AshaRani i wsp. 2009). Park i wsp. (2010) dodatkowo stwierdzili, że AgNPs może doprowadzić do całkowitego zablokowania syntezy DNA.

Genotoksyczne właściwości nanocząstek srebra są silnie powiązane z ich niekorzystnym wpływem na funkcjonowanie komórki. Stwierdzono, że stres oksydacyjny powstający w wyniku ekspozycji na AgNPs powoduje uszkodzenia DNA, w tym powstawanie wielokrotnych uszkodzeń oksydacyjnych zasad, indukcję przerw jednoniciowych i dwuniciowych oraz miejsc azasadowe (Ahamed i wsp. 2008). Natomiast Bastos i wsp. (2017) sugerują, że bezpośrednie działanie AgNPs podczas mitozy może skutkować aberracjami, uszkodzeniem DNA w postaci fragmentacji chromosomów, mutacjami punktowych i tworzeniem adduktów DNA. Podczas mitozy AgNPs mogą bezpośrednio reagować z chromosomami prowadząc do klastogenicznych lub aneugenicznych efektów jak pęknięcia chromosomów (Magdolenova i wsp. 2014). Tym samym, genotoksyczność wykazywana przez AgNPs może nie tylko prowadzić do uszkodzenia DNA, ale również powodować różnorodne reakcje w odpowiedzi na te uszkodzenia, w tym zatrzymanie cyklu komórkowego, naprawę uszkodzeń czy apoptozę (Wang i wsp. 2017).

1.2. Struktura i organizacja chromatyny jądrowej

Chromatyna jest dużym kompleksem nukleoproteinowym utworzonym z kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) i białek chromatynowych, występującym w jądrze komórkowym. Charakteryzuje się budową hierarchiczną zależną od stopnia skondensowania, czyli upakowania genomu. Niewielkie rozmiary jądra komórkowego wymuszają liczne procesy przebudowania struktury chromatyny. Zmiany zachodzące w trakcie tego procesu dodatkowo wymagają utrzymania równowagi dynamicznej między aktywną i nieaktywną frakcją chromatyny. Przekształcenia te wpływają bezpośrednio na zmiany w ekspresji genów, determinując prawidłowy rozwój organizmu oraz jego reakcję na zmianę warunków środowiskowych (Prieto i Maeshima 2019, Sacharowski i Sarnowski 2019).

Podstawowym poziomem organizacji chromatyny jest nukleosom. Jest to fragment nici DNA zawierający około 146 par zasad dwukrotnie nawinięty na

rdzeniowy oktamer histonowy. Utworzony jest on z zasadowych białek histonowych: H2A, H2B, H3 i H4. Kolejne nukleosomy powiązane są ze sobą łącznikowym DNA, czyli odcinkiem kwasu nukleinowego niezwiązanym z histonami rdzeniowymi. DNA łącznikowy charakteryzuje się zmienną długością, wynoszącą według źródeł: 10 – 90 pz (Widłak 2002) lub 20 – 75 pz (Trzaskoma i Magalska 2019). Odcinek ten jest wrażliwy na działanie nukleaz i bierze udział w stabilizacji struktury poprzez przyłączenie pojedynczej cząsteczki histonu łącznikowego H1. Obecność histonu H1 jest częściej obserwowana we frakcji heterochromatyny, co wiąże się z wyższym stopniem jej upakowania, niż w euchromatynie (Sacharowski i Sarnowski 2019). Nukleosomy, jako jednostka podstawowa, pełnią dwie różne funkcje. Są strukturalnym składnikiem włókna chromatynowego oraz odgrywają rolę modulatora w ekspresji genów (Gilbert i wsp. 2005). Struktura utworzona przez nukleosomy połączone łącznikowym DNA określana jest włóknom nukleosomowym lub włóknom 10 nm (Prieto i Maeshima 2019). Włókno nukleosomowe charakteryzuje się 6-krotnym współczynnikiem upakowania nici DNA (Żegała i wsp. 2006). Uważa się, że w nukleosomach zawarte jest 80% chromatynowego DNA (Allison 2009, Brown 2009).

Kolejnym poziomem organizacji i kondensacji jest włókno chromatynowe, występujące w jądrze komórek eukariotycznych o wielkości 30 nm (Brown 2009). Ze względu na trudności z utrzymaniem w formie nienaruszonej tej delikatnej struktury proteinowo-nukleinowej w trakcie izolacji, jej dokładna budowa jest słabo poznana. W wyniku licznych badań, prowadzonych również z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej, zaproponowano alternatywne modele organizacji włókna chromatyny. Pierwszym i akceptowanym przez naukowców przez wiele lat modelem była struktura solenoidu (włókna solenoidowego 30 nm). Nukleosomy (włókno 10 nm) są zorganizowane w spiralny układ, w którym na jeden skręt helisy przypada sześć do ośmiu nukleosomów, a histon H1 zlokalizowany jest po wewnętrznej stronie struktury. Nowsze badania sugerują, że w komórkach aktywnych transkrypcyjnie nukleosomy nie tworzą struktury solenoidu. Przyjmują natomiast formę struktury wstęgi o zygzakowatym kształcie, które zwiijając się tworzą superskręty. W modelu zygzaka, nukleosomy układają się naprzemiennie w dwóch równoległych rzędach, a między nimi występuje łącznikowy DNA. Występowanie włókna 30 nm w jądrze interfazowym uznawane jest przez naukowców za dyskusyjne (Gilbert i wsp. 2005, Trzaskoma i Magalska 2019). Dane eksperymentalne przedstawione przez Maeshima i wsp. (2016)

sugerują, że chromatyna w warunkach *in vivo* tworzy włókna o mniejszej średnicy 10 nm, przypominające koraliki zawieszane na sznurku. Potwierdzili, że chromatyna składa się z połączonych przez łącznikowy DNA nukleosomów z przyłączonymi białkami zewnętrznymi. Jednak nie zaobserwowali oni włókien 30 nm w warunkach *in vivo* (Sacharowski i Sarnowski 2019). Obrazowanie *in vivo* z wykorzystaniem spektroskopii elektronowej również pozwoliło na zaobserwowanie włókien 10 nm w jądrze interfazowym, przy jednoczesnym braku identyfikacji włókien 30 nm w skondensowanych obszarach heterochromatynowych (Prieto i Maeshima 2019). Obecnie nie ma danych jednoznacznie stwierdzających brak struktury 30 nm w jądrach komórkowych w warunkach *in vivo*. Wraz z rozwojem nowych technik prowadzone są ciągłe badania nad poznaniem dokładnej struktury na tym poziomie organizacji chromatyny (Prieto i Maeshima 2019).

Chromatyna w jądrze interfazowym występuje w dwóch formach o odmiennych właściwościach fizycznych. Heterochromatyna jest frakcją mocniej skondensowaną, o większej gęstości elektronowej i ciemniej wybarwiona w obrazie mikroskopowym. Uorganizowana jest w dwa typy: konstytutywną i fakultatywną. Heterochromatyna konstytutywna jest stale skondensowana i występuje we wszystkich komórkach. Jej zwarta struktura może być zachowana ze względu na obecność niekodujących sekwencji DNA, głównie sekwencji wielokrotnie powtórzonych (minisatelity, mikrosatelity, czy powtórzenia tandemowe jak DNA telomerowe i centromerowe) (Gilbert i wsp. 2005, Nair i wsp. 2017). Stopień kondensacji heterochromatyny konstytutywnej jest zbliżony do współczynnika upakowania występujący w chromosomie metafazowym. Jest wynikiem modyfikacji nici DNA, głównie metylacji cytozyny w obrębie wysp CpG i modyfikacji potranslacyjnej histonów w obrębie rdzenia nukleosomu. Dekondensacja tej frakcji zachodzi tylko podczas replikacji, pod koniec fazy S cyklu komórkowego (Żegała i wsp. 2006). Dodatkowo heterochromatyna konstytutywna charakteryzuje się zdolnością do asocjacji z błoną jądrową, na co wskazuje na jej umiejscowienie w pobliżu błony. Drugi typ heterochromatyny, czyli fakultatywna, przyjmuje okresowo zwiniętą postać. Występuje w określonych typach komórek i zawiera swoiste sekwencje genowe podlegające ekspresji na różnych etapach cyklu komórkowego. W związku z tym heterochromatyna fakultatywna wykazuje zdolność do rozluźniania swojej struktury i tym samym wykazywania aktywności transkrypcyjnej. Z kolei, przeważającą formą chromatyny

jądrowej jest zdekondensowana i jaśniej się barwiąca – euchromatyna. W większości zawiera aktywne transkrypcyjnie sekwencje DNA, w których geny są luźniej upakowane, co ułatwia ich ekspresję (Gilbert i wsp. 2005, Brown 2009). Występuje w każdym typie komórek i stanowi najniższy stopień kondensacji chromatyny interfazowej. Jest to związane z brakiem metylacji reszty lizyny 9 w histonie H3 przy równoczesnej ich acetylacji oraz metylacji reszty lizyny 4 histonu H3 (Żegała i wsp. 2006, Nair i wsp. 2017). W mikroskopie elektronowym, euchromatyna tworzy pętle z włókna chromatynowego o średnicy 30 nm i długości od 40 do 100 kb.

W jądrze interfazowym włókno chromatynowe 30 nm podlega dalszej kondensacji, jednak dokładne mechanizmy nie są jeszcze poznane. W wyniku ciągłego procesu spiralizacji powstają wypętlone domeny, określane jako pętle chromatyny lub włókna chromatyny interfazowej (Widłak 2002, Żegała i wsp. 2006). Zawierają one od 50 do 100 kbp DNA, a długość pętli wynosi około 0,25 μm . Wypętlania powstają na skutek przyłączenia DNA do białek tworzących macierz jądrową i ich wspólnego oddziaływania. Macierz (matrix) jądrowa stanowi wewnątrzjądrową strukturę szkieletową. Do połączenia między pętlą a macierzą dochodzi w regionach bogatych w powtórzenia AT, określane jako MAR – region połączenia z matriks (ang. *matrix-associated region*) lub SAR – region połączenia z rusztowaniem (ang. *scaffold attachment region*) (Żegała i wsp. 2006, Brown 2009). Organizacja genomu w formie domen, stanowi funkcjonalny rozdział aktywnej transkrypcyjnie euchromatyny od frakcji heterochromatynowej, w obrębie której wyciszona jest ekspresja genów (Trzaskoma i Magalska 2019). Włókno chromatyny jądrowej utworzone jest z sześciu pętli chromatynowych uorganizowanych w tzw. rozetki wokół białek matrix jądrowej. Stopień upakowania DNA w trakcie interfazy jest 1000-krotny. Chromatyna interfazowa jest strukturą o średnicy od 240 do 300 nm i umożliwia około 1700-krotne upakowanie genomu (Żegała i wsp. 2006).

Najwyższym poziomem uorganizowania chromatyny są chromosomy metafazowe, które formują się i są widoczne w trakcie podziału jądra komórkowego. Upakowanie szeregu pętli chromatynowych do postaci chromosomów wymaga obecności kompleksu białkowego w postaci kondensyny oraz topoizomerazy II, enzymu hydrolizującego ATP (Allison 2009, Trzaskoma i Magalska 2019). Kondensyna stanowi najliczniej występujący element strukturalny „rusztowania” chromosomów metafazowych (Prieto i Maeshima 2019). Każdy chromosom

występujący w jądrze komórkowym zawiera pojedynczą cząsteczkę DNA. Chromosomy są ostatnim poziomem upakowania chromatyny jądrowej, na którym materiał genetyczny uległ 10 000-krotnej kondensacji w porównaniu do DNA pozbawionego białek. Chromosom metafazowy zbudowany jest z dwóch chromatyd siostrzanych połączonych w centromerze. Średnica włókna chromosomu wynosi około 800 nm (Żegała i wsp. 2006). Po zakończeniu podziału komórkowego, mitotycznego lub mejotycznego, struktura chromosomów ulega dekondukcji, zmniejsza się i nie można ich już łatwo wyróżnić jako odrębnych struktur. Dotychczas proces odtwarzania chromatyny interfazowej jest mało poznany. Wykazano jednak, że DNA należące do poszczególnych chromosomów tworzy specyficzne terytoria chromosomowe w jądrze interfazowym (Żegała i wsp. 2006). Zastosowanie techniki FISH z sondami malującymi pozwoliło określić lokalizację poszczególnych chromosomów w jądrze komórkowym. W badaniach Bolzer i wsp. (2005) wykazano, że rozmieszczenie chromosomów jest zależne od jego wielkości i liczby genów w nim zawartych. W związku z tym, większe chromosomy o mniejszej liczbie genów są peryferyjnie zlokalizowane w jądrze, natomiast jego centrum zajmują chromosomy małe, zawierające więcej sekwencji kodujących (Cremer i Cremer 2010). W każdym chromosomie zawarta jest cząsteczka DNA o długości od 55 do 250 Mbp (Żegała i wsp. 2006).

Integralność chromatyny stanowi ciągły przedmiot zainteresowania naukowców wraz z rozwojem nowych technik jej wizualizacji. Jedną z takich technik jest metoda ChromEMT opracowana przez Ou i wsp. (2017). Metoda ta łączy znakowanie fluorescencyjne chromatyny (ChromEM) i tomografię elektronową (EMT). Umożliwia to ukazanie chromatyny interfazowej oraz chromosomów mitotycznych, gdzie w obu strukturach zaobserwowano włókna o średnicy od 5 do 24 nm, zamiast 30 nm włókien. Występowanie włókien podobnej wielkości w chromosomach i chromatynie interfazowej mogłoby stanowić wyjaśnienie szybkości kondensacji chromatyny (Trzaskoma i Magalska 2019).

Poszczególne poziomy organizacji struktury chromatyny oraz stopień jej kondensacji podlegają regulacji przez różne czynniki. Integralność chromatyny zależy od modyfikacji histonów, głównie: metylacji, fosforylacji, acetylacji oraz metylacji DNA (Widłak 2002). W przebudowie nukleosomowej struktury chromatyny ważną funkcję pełnią kompleksy remodelujące chromatynę zależne od ATP. Mogą one powodować przesunięcia nukleosomów wzdłuż tej samej nici DNA lub między różnymi

nićmi. Ich działanie może wiązać się z usunięciem oktameru histonowego z obszaru regulatorowego DNA, zmiany struktury nukleosomu bez modyfikacji jego pozycji w nici DNA lub też z rozluźnieniem struktury nukleosomu, co prowadzi do powstania pętli DNA, może też powodować tworzenie struktury Z-DNA obecnej w euchromatynie (Sacharowski i Sarnowski 2019). Chemiczna modyfikacja zasad DNA, jak metylacja cytozyny (5mC) może brać udział w formowaniu heterochromatyny i euchromatyny (Żegała i wsp. 2006).

Kolejnym istotnym czynnikiem koniecznym do prawidłowego formowania chromatyny są odpowiednie stężenia kationów magnezowych, potasowych i sodowych oraz równowaga między nimi. Jony magnezu i sodu prowadzą do kondensacji chromatyny, a K^+ do rozluźnienia struktury nukleosomowej (Sacharowski i Sarnowski 2019).

Innym czynnikiem wpływającym na integralność chromatyny są cząsteczki niekodującego RNA (piRNA, siRNA oraz lncRNA). Cząsteczki lncRNA (ang. long non-coding RNA) są zaangażowane w pozycjonowanie nukleosomów i tworzenie pętli chromatynowych (Sacharowski i Sarnowski 2019). W utrzymanie stabilności struktury chromatyny wyższego rzędu zaangażowany jest kompleks remodelujący nukleosomy i deacetylazy (NuRD), tym samym promując stabilność genomu (Nair i wsp. 2017).

Struktura chromatyny stanowi istotną rolę w regulowaniu odpowiedzi komórki na uszkodzenia DNA. Dodatkowo organizacja włókna chromatynowego stanowi bezpośrednią ochronę dla nici DNA, tworząc tym samym barierę fizyczną dla zmian egzogennych w obrębie struktury i sekwencji DNA (Nair i wsp. 2017).

1.3. Zaburzenia integralności chromatyny

Zachowanie integralności genomu jest nadrzędnym celem w trakcie proliferacji komórek, aby umożliwić dokładne powielanie genomu. Niestabilność genomowa GIN (ang. *genomic instability*) odnosi się do zwiększonego poziomu mutacji w komórkach (Langie i wsp. 2015). Powiązana jest z podwyższoną częstotliwością prostych i złożonych mutacji genomu. Zaliczane są do nich zmiany w sekwencji nukleotydów, pęknięcia DNA, insercje i delecje, translokacje chromosomalne oraz nieprawidłowa liczba chromosomów (Langie i wsp. 2015). Niestabilność genetyczna może pełnić określoną fizjologiczną rolę w generowaniu zmienności w procesach regulowanych rozwojowo. Jednak niestabilność zwykle jest związana ze zmianami patologicznymi, jak przedwczesne starzenie się w przypadku ludzi, predyspozycją do rozwoju procesów nowotworowych czy chorób dziedzicznych (Aguilera i Gómez-González 2008). W zdrowym organizmie DNA w trakcie fazy S cyklu komórkowego jest najbardziej narażone na uszkodzenia. W wyniku działania czynników endogennych i egzogennych każda z komórek organizmu narażona jest na powstawanie wielu pojedynczych uszkodzeń, głównie związanych ze zmianą integralności genomu (Papamichos-Chronakis i Peterson 2013, Pentzold i wsp. 2021). Nagromadzenie mutacji w trakcie podziału komórkowego może mieć różnorodny wpływ na organizm. Utrzymanie stabilności genomowej jest niezbędne dla zachowania integralności komórkowej, aby zapobiec błędom replikacji DNA, zmianom na skutek stresu oksydacyjnego czy uszkodzeniom DNA w wyniku egzogennych czynników rakotwórczych (Yao i Dai 2014).

Nukleosomowa struktura chromatyny i jej chemiczne oddziaływania z czynnikiem uszkadzającym, mają decydujący wpływ na powstawanie uszkodzeń DNA danego typu. Są czynnikiem warunkującym przebieg procesów naprawczych (Widłak 2002). Niedawno stwierdzono, że dekondensacja chromatyny i zwiększona elastyczność jej włókien towarzyszy degradacji histonów w odpowiedzi na uszkodzenia DNA (Nair i wsp. 2017).

Głównymi czynnikami endogennymi indukującymi uszkodzenia DNA są reaktywne formy tlenu (ROS), czynniki metylujące, aldehydy pochodzące z peroksydacji lipidów, hydroliza DNA, deaminacja hydrolityczna czy stres karbonylowy. Stres genotoksyczny związany z transkrypcją i replikacją może

powodować powstawanie endogennych uszkodzeń, jeśli przekracza wysoką precyzję ich naprawy. Znaczącą większość endogennych uszkodzeń, bo aż 75%, stanowią SSB pęknięcia jednoniciowe (ang. *single-strand break*), które mogą przekształcić się w DSB pęknięcia dwuniciowe (ang. *double-strand break*). Pierwotnie, pęknięcia dwuniciowe występują rzadziej, jednak są o wiele bardziej niebezpieczne, ponieważ stanowią całkowite fizyczne przerwanie szkieletu DNA. Z racji tego, że chromatyna jest fizjologicznym wzorcem dla mechanizmów naprawczych DNA, kontekst jej struktury może ułatwiać lub utrudniać czynnikom naprawczym utrzymanie i przywrócenie integralności genomu (Nair i wsp. 2017). Aby zapewnić stabilność całego genomu, komórki wykształciły wyspecjalizowane szlaki naprawy DNA – DDR (ang. *DNA damage response*). Przykładem takich ścieżek naprawczych jest naprawa niedopasowań (MMR, ang. *mismatch repair*) korygująca niedopasowanie zasad podczas replikacji czy mechanizm wycinania uszkodzonych zasad BER (ang. *base excision repair*) (Aguilera i García-Muse 2013). Z kolei większe addukty DNA naprawiane są przez wycięcie nukleotydów NER (ang. *nucleotide excision repair*) (Langie i wsp. 2015). W przypadku pęknięć DNA, SSB usuwane są przez mechanizm naprawy przerwania pojedynczej nici (SSBR, ang. *single-strand break repair*), natomiast DSB przez szlak niehomologicznego łączenia końców (NHEJ, ang. *non-homologous end joining*) lub szlak rekombinacji homologicznej (HR, ang. *homologous recombination*) w zależności od fazy cyklu komórkowego (Langie i wsp. 2015, Nair i wsp. 2017). Szlak HR jest aktywny na przełomie fazy S i G2, z kolei NHEJ jest aktywny we wszystkich fazach cyklu (Yao i Dai 2014, Nair i wsp. 2017). Oba te procesy wiążą się z różnymi zmianami w chromatynie. W zależności od tego, który ze szlaków naprawy uszkodzeń został wykorzystany w przypadku danej nieprawidłowości, warunkuje to wystąpienie niestabilności genomowej GIN (ang. *genome instability*). Przykładowo, niesprawny szlak rekombinacji homologicznej powoduje, że głównym typem GIN są poważne rearanżacje chromosomowe (GCR, ang. *gross chromosomal rearrangements*). W przypadku wielu zaburzeń genetycznych obserwowana nieprawidłowość dotyczy HR i GCR (Aguilera i Gómez-González 2008). Naprawa uszkodzeń szlakiem rekombinacji homologicznej wymaga obecności homologicznych dupleksów DNA, będących matrycą donorową dla naprawy DNA zależnej od syntezy. Wyjaśnia to powszechność jej występowania w fazie replikacji cyklu komórkowego. Zazwyczaj jako matryca homologiczna wykorzystywana jest chromatyda siostrzana. Natomiast szlak niehomologicznego łączenia końców (NHEJ) jest najczęściej wykorzystywany w fazie

G1 i jest preferowaną ścieżką przez wiele komórek ssaków. Mimo, że NHEJ wymaga niewielkiego przetwarzania końców DNA, może prowadzić do naprawy bezbłędnej, jak i podatnej na błędy (Papamichos-Chronakis i Peterson 2013, Langie i wsp. 2015). W obu procesach, HR i NHEJ, chromatyna jest zaangażowana w regulację dostępności DSB oraz pomaga koordynować i integrować cały szlak DDR. W wyniku upośledzenia mechanizmów naprawczych MMR czy HR lub poślizgu widełek replikacyjnych może dochodzić do niestabilności mikrosatelitarnej i minisatelitarnej, prowadzącej do powtarzającego się wydłużania i kurczenia nici DNA (Aguilera i Gómez-González 2008).

Podział genomu na domeny heterochromatynowe i euchromatynowe może mieć wpływ na regionalną niestabilność genomu w komórkach somatycznych. W komórkach nowotworowych głównym czynnikiem determinującym tempo mutacji jest strukturalna organizacja chromatyny. Powiązane jest to ze zwiększoną substytucją zasad w regionach heterochromatynowych i domenach późno replikujących, a rzadziej obserwowaną we wczesno replikujących obszarach chromatyny. Mechanizmy MMR są bardziej wydajne w obrębie euchromatyny, tłumiąc akumulację mutacji w jej obrębie. Z kolei, w regionach heterochromatynowych może dochodzić do zróżnicowania zdolności do sygnalizowania naprawy lub zwiększonej wrażliwości ekspozycyjnej na mutageny na obrzeżach jądra komórkowego (Nair i wsp. 2017). Zmiany w obrębie przycentromerowego satelitarnego DNA prowadzą do całkowitej zmiany integralności heterochromatyny, co doprowadza do defektów mitotycznych, a tym samym do powstania zwiększonej liczby uszkodzeń podwójnej nici DNA (Nair i wsp, 2017). Inny czynnik powodujący zaburzenie struktury heterochromatyny według Nair i wsp. (2017) może stanowić utrata składników kompleksu NuRD, takich jak: RBBP4, RBBP7 czy HDAC1, co upośledza tworzenie oraz utrzymanie modyfikacji histonowych i organizacji chromatyny wyższego rzędu. Według Widłak (2002) powstawanie dwuniciowych pęknięć DNA powoduje przemieszczenie białek Ku i Sir z obszarów telomerowych, do miejsc uszkodzeń, gdzie zaangażowane są w naprawę i formowanie w tym miejscu heterochromatyny.

Jedną z głównych przyczyn niestabilności genomu jest niedozwolona rekombinacja pomiędzy dużymi sekwencjami powtarzalnymi DNA, znajdującymi się w większości genomów eukariotycznych. Zdarzenia te są hamowane przez upakowanie powtórzonego DNA w skondensowaną strukturę heterochromatyny. W trakcie fazy S

cyklu komórkowego, te struktury heterochromatyny muszą być wiernie replikowane, aby zapewnić stabilność genomu (Papamichos-Chronakis i Peterson 2013).

Zaburzenia budowy chromatyny na niższych stopniach jej upakowania mogą być w efekcie obserwowane nawet na poziomie chromosomowym (strukturalnym lub funkcjonalnym). Niestabilność chromosomowa (CIN, ang. *chromosomal instability*; CA, ang. *chromosomal aberration*) jest definiowana jako trwale podwyższony wskaźnik błędnej segregacji chromosomów prowadzący do wystąpienia dodatkowego chromosomu czy utraty całego chromosomu lub jego fragmentu (Geigl i wsp. 2008, Bakhoun i wsp. 2014). Nieprawidłową segregację chromosomów w wyniku opóźnień w anafazie mitozy wykazano na skutek wystąpienia defektów mitotycznego punktu kontrolnego z zaburzeniem mikrotubul, przedwczesnej separacji chromatyd, liczby centrosomów (Cahill i wsp. 1998, Zhang i wsp. 2008b, Bakhoun i wsp. 2014). Chromosomy, których dotyczą te błędy pozostają w płaszczyźnie równikowej wrzeczona, podczas gdy pozostałe chromosomy poruszają się w kierunku jego biegunów. W wyniku przedmitotycznego stresu replikacyjnego powstają w mitozie częściowo zreplikowane chromosomy, co skutkuje wystąpieniem strukturalnych i liczbowych nieprawidłowości chromosomowych poprzez powstawanie mostków chromosomowych i acentrycznych fragmentów chromosomów w anafazie (Bakhoun i wsp. 2014).

Aberracje strukturalne chromosomów są wywoływane przez działanie czynników mutagennych, zarówno o charakterze chemicznym, jak i fizycznym. Uruchamiają one mechanizmy molekularne będące w większości konsekwencją bezpośredniego uszkodzenia DNA. Należą do nich, m. in. przerwanie nici DNA – pęknięcia jednoniciowe (SSB) lub dwuniciowe (DSB), hydroliza lub uszkodzenie zasad, powstawanie dimerów pirymidynowych czy wiązania krzyżowego DNA. Pośrednio powstanie nieprawidłowości może być efektem procesu zahamowania topoiizomerazy I i II, wytwarzania reaktywnych form tlenu czy zaburzenia równowagi nukleotydowej. Zmiany struktury chromosomów, jak rearanżacje czy występowanie przerw, wiążą się z pozostawionym bez naprawy lub niewłaściwie naprawionym uszkodzeniem powstałym, w sposób bezpośredni lub pośredni (Mosesso i Cinelli 2019).

Aberracje chromosomowe dzielą się na dwa typy: pęknięcia i wymiany. Są wynikiem powstawania na obu końcach pęknięć dwuniciowych tzw. „lepkich końców”,

które są do siebie przyciągane. Jeśli w komórce występuje tylko jedno pęknięcie, istnieją wtedy tylko dwa końce, które mogą się połączyć ponownie bez powodowania widocznych uszkodzeń lub końce te mogą nie zostać ze sobą połączone, co skutkuje widoczną aberracją - pęknięciem lub delecją (Danford 2012). Drugim często występującym mechanizmem prowadzącym do powstania widocznych CA jest przekształcanie SSB w DSB. Mechanizm ten powoduje, że w wyniku usuwania uszkodzonego fragmentu DNA powstaje przerwa jednoniciowa. Jeżeli przed zakończeniem naprawy takiego pęknięcia DNA zostanie zsyntezowane, to może zostać przekształcone w przerwę dwuniciową (Danford 2012). Naprawa uszkodzeń DNA lub jego dokładna replikacja nie miałyby znaczenia, gdyby chromosomy nie były prawidłowo segregowane i równo dziedziczone podczas podziału komórki. Nieprawidłowości w segregacji chromosomów zwiększają tempo wystąpienia CIN podczas mitozy, prowadząc tym samym do aneuploidii. Niestabilność chromosomowa może wpływać na zahamowanie cytokinezy, w wyniku nierozwiązanych chromatyd siostrzanych lub przez obecność mostków chromatynowych w obszarze międzykomórkowym łączącym dwie komórki potomne, prowadząc do poliploidii (Papamichos-Chronakis i Peterson 2013). Mimo wielu badań dokładne mechanizmy odpowiedzialne za rearanżację chromatyny na skutek wystąpienia DSB nie są dotychczas poznane.

W ocenie ryzyka związanej z narażeniem na ekspozycję czynnika genotoksycznego stosowane są różne metody cytogenetyczne w zależności od analizowanego rodzaju uszkodzenia. Do analizy fragmentacji DNA stosowany jest test kometowy. Do innych form uszkodzeń zaliczane są wymiany chromatyd siostrzanych (SCE, ang. *sister chromatyd exchange*), mikrojądra (MN, ang. *micronucleus*), aberracje chromosomowe (CA, ang. *chromosomal aberration*) czy polimorfizm niektórych genów. W klasycznej analizie genotoksyczności oceniane są CA, MN, SCE i uszkodzenia DNA, jak pęknięcia nici, miejsca alkalicznie labilne czy wiązania krzyżowe (Valverde i Rojas 2009). Szerokie spektrum dostępnych badań cytogenetycznych pozwala na analizę wielu rodzajów niestabilności chromatyny jądrowej, ze szczególnym naciskiem na niestabilność chromosomową.

1.4. Wykrywanie niestabilności chromatynowej

1.4.1. Łamliwe miejsca chromosomu – Fragile site

Jednym z testów cytogenetycznych pozwalających na ocenę aberracji chromosomowych powstałych w komórkach na skutek zmian integralności chromatyny jest analiza miejsc łamliwych (ang. *Fragile site*, FS, FRA). Zmiany te są widoczne na chromosomach jako złamania i przerwy.

Pierwsze chromosomalne kruche miejsce, zostało zdefiniowane w komórkach ludzkich i opisane przez Dekabana i wsp. w 1965 roku poprzez analizę kariotypu limfocytów krwi (Bjerregaard i wsp. 2018). Po raz pierwszy termin „fragile site” został zastosowany przez Magenis w 1970 roku do opisu zaobserwowanych nieprawidłowości w postaci złamań na chromosomie 16 pary ramienia q u człowieka (Durkin i Glover 2007). W kolejnych latach ujawniono występowanie miejsca łamliwego na chromosomie X (Xq28). Miejsca łamliwe obserwuje się w genomie praktycznie wszystkich organizmów, od drożdży po człowieka. Ich obecność wskazuje, że pełnią ważną rolę w genomie, w tym w organizacji wyższej struktury chromatyny oraz w procesie replikacji. Obszary na chromosomach, w których występują miejsca łamliwe, są najpóźniej replikowane podczas fazy S cyklu komórkowego, ponieważ sygnalizują o zakończeniu replikacji. Dopiero po zakończeniu replikacji tych obszarów komórka może wejść w etap mitozy. Proces ten jest regulowany przez czynniki kontrolujące cykl komórkowy. Na tym etapie kończy się ich rola w regulacji cyklu, a miejsca te są destabilizowane przez zniszczenie genów kontrolujących cykl (Arlt i wsp. 2006). W mikroskopie świetlnym miejsca łamliwe obserwowane są jako niezabarwione dziury lub przerwy, czy silne przewężenia na chromosomach metafazowych. Identyfikację miejsc łamliwych można prowadzić na różnych poziomach organizacji strukturalnej chromatyny. Na poziomie nukleosomowym, oceniana jest zdolność DNA z miejsc łamliwych do kształtowania podstawowych elementów strukturalnych chromatyny. Na wyższych poziomach przez badanie układu struktury nukleosomów występujących powyżej miejsc łamliwych, czy przez ich wizualizację na chromosomach, czyli ostatnim stopniu upakowania chromatyny. Dotychczas nie stwierdzono jednego wspólnego mechanizmu odpowiadającego za zwiększone powstawanie miejsc łamliwych w komórkach. Wyróżniono kilka czynników, które mogą przyspieszać powstawanie FRA. Obejmują one głównie czynniki upośledzające prawidłową replikację DNA, jak czas replikacji,

mikrosatelitarne sekwencje bogate w pary zasad AT lub miejsca o większej elastyczności DNA. W takich miejscach spowolnienie prędkości polimeraz podczas replikacji ma kluczowe znaczenie. W trakcie replikacji powstają jednoniciowe niereplikowane regiony, które następnie mogą tworzyć dwurzędowe struktury DNA, jak struktura spinki do włosów czy krzyża, co w konsekwencji prowadzi do zatrzymania widełek replikacyjnych (Wilhelm i wsp. 2018, Palumbo i Russo 2019). Takie zakłócenia replikacji mogą prowadzić do ekspresji kruchych/łamliwych miejsc chromosomalnych. Są to cytogenetycznie widoczne luki lub przerwy na najbardziej skondensowanej formie chromatyny – chromosomach metafazowych. Najprawdopodobniej FS nie reprezentują rzeczywistych złamanych, czyli naciętych struktur, a raczej zdecondensowaną interkalarną, czyli późno replikującą, chromatynę. Ostatnie badania wskazują na brak prawidłowego wiązania kondensyn do miejsc łamliwych przed rozpoczęciem mitozy, co prowadzi do niedostatecznego zagęszczenia chromatyny, przypominającego charakterystyczne mitotyczne FS (Pentzold i wsp. 2021).

Miejsca łamliwe, rozumiane są jako odcinki chromatyny, w których chromosomy wykazują większą podatność i częstość występowania złamań i przerw. Miejsca te klasyfikowane są jako rzadko lub pospolicie występujące. Miejsca typu rzadkiego mają charakter dziedziczny, zgodnie z prawami Mendla i spontanicznie pojawiają się w populacji. Natomiast miejsca pospolite uznaje się za powszechnie występujące w genomie danego gatunku, a ich liczba może się wahać. Zarówno w przypadku powszechnych, jak i rzadkich FRA, stwierdzono, że ich regiony zawierają pewną liczbę genów mikroRNA (Durkin i Glover 2007).

Miejsca łamliwe typu rzadkiego (RFSs, ang. *rare fragile sites*) są obserwowane poniżej 5% w populacji i dziedziczą się w sposób mendlowski (Palumbo i Russo 2019). Wzrost liczby złamań w tym obszarze najczęściej wynika ze wzrostu powtórzeń nukleotydowych. Najczęściej gromadzone są powtórzenia 3-nukleotydowe z przewagą sekwencji CGG. Ten typ uszkodzeń ujawnia się w trakcie prowadzenia hodowli komórkowej w specjalnych warunkach, np. w medium z niskim poziomem tymidyny czy pozbawionym kwasu foliowego.

Główną grupą rzadkich FRA są miejsca wrażliwe na brak kwasu foliowego (ang. *folate sensitive*) i powiązane ze wzrostem powtórzeń CGG. Mikrosatelitarne

powtórzenia w miejscach wrażliwych wynoszą powyżej 100 – 1000 kopii powtórzeń CGG, w przeciwieństwie do alleli niewykazujących kruchości, które posiadają krótkie odcinki 4 – 50 kopii powtórzeń CGG. Cechą charakterystyczną rzadkich FRA jest opóźniona replikacja, najprawdopodobniej wynikająca z możliwości powstawania struktur drugorzędowych, jak struktura spinki do włosów, zsuniętej nici DNA czy struktury tetrahelikalnej, w miejscach powtórzeń AT i CGG, na skutek blokowania postępu na widełkach replikacyjnych (Schwartz i wsp. 2006, Durkin i Glover 2007). Zdolność tworzenia stabilnych struktur drugorzędowych jest skorelowana z czystością powtórzeń CGG oraz długością sekwencji powtórzonych. To z kolei jest powiązane z ich wpływem na niestabilność genetyczną przez zahamowanie replikacji DNA. Dodatkowo stwierdzono, że kruchość sekwencji bogatych w trójnukleotydydowe powtórzenia CGG może wynikać z niskiej wydajności tworzenia nukleosomów (Schwartz i wsp. 2006).

Drugi typ rzadkich miejsc łamliwych, stanowią miejsca niewrażliwe na brak kwasu foliowego (ang. *nonfolate sensitive*). Charakteryzują się dużymi obszarami bogatymi w powtórzenia par AT, dlatego mogą być indukowane przez inhibitory syntezy dTTP, jak BrdU (5-bromo-2’deoksyurydynę), FdU (fluorodeoksyurydynę) lub distamycynę-A. Pierwszą grupę stanowią miejsca kruche indukowane przez BrdU, czyli analog tymidyny, który jest włączony do DNA podczas replikacji i może hamować syntezę DNA. Druga grupa RFS jest indukowana distamycyną-A, małym oligopeptydowym antybiotykiem, która wiąże się do małego obszaru DNA bogatego w A/T (Schwartz i wsp. 2006). Rozbudowa powtórzeń w *loci* niefolianowrażliwych rzadkich miejsc kruchych powoduje zaburzenia replikacji DNA w tych regionach genomu. Wykazano, że zaburzona replikacja jest widoczna wzdłuż dużego regionu genomowego, flankującego rozszerzone sekwencje powtórzonych, co wskazuje, że cytogenetycznie rzadkie miejsca niestabilne mogą obejmować długie obszary genomowe. Dotychczas nie potwierdzono, czy ten typ RFS może tworzyć stabilne drugorzędowe struktury DNA, jak w przypadku powtórzeń CGG wrażliwych na foliany. Stwierdzono jednak, że obszary wrażliwe bogate w A/T mogą zakłócać prawidłowe formowanie chromatyny, na etapie składania nukleosomów (Schwartz i wsp. 2006).

Klasycznym przykładem rzadkiego miejsca łamliwego jest zespół łamliwego chromosomu X u człowieka. Choroba ta powoduje upośledzenie umysłowe u mężczyzn i jest dziedziczona w wyniku sprzężenia z chromosomem płci X (Wójcik i wsp. 2009).

Pospolite miejsca łamliwe (CFSs, ang. *common fragile sites*) stanowią największą grupę FRA i zostały stwierdzone w genomie wszystkich gatunków ssaków, m.in. u psów, kotów, koni, świń, krów i gryzoni. Stanowią część normalnej struktury chromatyny (Arlt i wsp. 2006). Nie powstają w wyniku nagromadzenia powtórzeń nukleotydowych. Uznaje się, że ze względu na swój powszechny charakter są stabilne w komórkach somatycznych. W zmienionych warunkach hodowlanych, w obecności czynników indukujących w medium, jak BrdU, afidikoliny (inhibitor polimerazy DNA) czy 5-azacytydyny (analog cytozyny), mogą przejawiać cechy niestabilności chromatyny w postaci złamań, przerw czy przegrupowań. CFS stanowią duże obszary niestabilności genomu, w których następuje zmiana struktury chromosomu i często powiązana jest z delecją. CFS stanowią gorące miejsca indukujące wymianę chromatyd siostrzanych, translokacje czy delecje (Fungtammasan i wsp. 2012, Palumbo i Russo 2019). Wrażliwość miejsc pospolitych może zależeć od spowolnionej lub nieprawidłowej replikacji DNA, co może powodować utrzymanie jednoniciowego DNA do fazy G2/M, jak również nieprawidłową kondensację chromatyny. Ostatnie badania wskazują, że dynamika replikacji w CFS nie wymaga rozległego spowalniania czy zatrzymania widełek replikacyjnych. Zamiast tego niestabilność może wynikać ze specyficznych wzorców aktywacji miejsc rozpoczęcia replikacji, jak niedostatek miejsc startu replikacji czy strefy przejściowe między wczesnymi/późnymi początkami replikacji (Palumbo i Russo 2019). Według Fungtammasan i wsp. (2012) niektóre regiony pospolitych miejsc łamliwych indukowanych przez afidikolinę – miejsca aCFS, ulegają opóźnionej lub przedłużonej elongacji w fazie S, a w komórkach wchodzących w fazę S tylko 50% *loci* aCFS jest całkowicie zreplikowane. Dodatkowo uważa się, że pęknięcia DNA w obrębie aCFS są konsekwencją nieukończenia replikacji i/lub nierozwiązania zatrzymanych widełek replikacyjnych przed końcem telofazy i segregacją chromosomów.

W ostatnich latach pojawiła się propozycja nowego podziału FS na CFS i wcześniej replikujące miejsca łamliwe ERFS (ang. *early replicating fragile sites*), pomijając jednocześnie miejsca łamliwe typu rzadkiego, z uwagi na ich bezpośrednie powiązanie z określonymi elementami sekwencji nukleotydowej (powtórzenia CGG) (Pentzold i wsp. 2021). ERFS charakteryzują się replikacją we wczesnej fazie chromatyny, wysoką gęstością miejsc rozpoczęcia replikacji oraz dużą zawartością par G-C. W przypadku ERFS integralność replikacji jest zaburzona przez wzrost zdarzeń

inicjujących, powodujących konflikty replikacyjno-transkrypcyjne lub wyczerpanie puli nukleotydów.

Łamliwość specyficznych regionów chromosomowych w komórkach somatycznych może prowadzić do niebezpiecznych skutków na poziomie indywidualnym, przez amplifikację onkogenów, a tym samym przyczynianie się do kancerogenezy (Wilhelm i wsp. 2018). Dodatkowo, z regionów FS pochodzi nawet 50% delecji związanych ze zmianami nowotworowymi.

Wystąpienie łamliwości chromosomów i ich nieprawidłowej naprawy podczas mejozy czy krótko po zapłodnieniu komórki, może prowadzić do utrwalonych z pokolenia na pokolenie dziedzicznych zmian w genomie. Potwierdzona została korelacja między FS a dziedzicznymi aberracjami chromosomowymi (Wilhelm i wsp. 2018).

Miejsca łamliwe na chromosomach działają jako ewolucyjnie elastyczne i szybko zmieniające się regiony. Można je wykorzystać w porównywaniu ewolucyjnym gatunków, czy obserwacji śladów pozytywnej selekcji w populacyjnych bazach danych (Wilhelm i wsp. 2018).

Wykorzystanie tych zmienności chromosomów w badaniach dotyczących niestabilności chromosomów wykazały zwiększenie częstotliwości ich występowania w określonych warunkach hodowli *in vitro* lub w wyniku działania specyficznymi związkami chemicznymi (Wójcik i wsp. 2009).

1.4.2. Test mikrojądrowy

Innym z cytogenetycznych biomarkerów analizy niestabilności chromatyny są mikrojądra obecne w komórkach. Są to poza jądrowe struktury, zawierające całe chromosomy (w wyniku uszkodzenia wrzeczona podziałowego) lub fragmenty chromatyny powstałe w skutek pęknięć DNA (Błaszczuk i Mielżyńska-Švach 2012).

Mikrojądra (MN, ang. *micronucleus*) zostały po raz pierwszy rozpoznane pod koniec XIX wieku przez Howell i Jolly, którzy stwierdzili obecność małych dodatkowych elementów w komórkach badanych próbek krwi pobranych od szczurów i kotów. Te dodatkowe niewielkie elementy, inkluzje, zaobserwowano również w erytrocytach krwi obwodowej u pacjentów z anemią, a następnie określono mianem ciałek Howell-Jolly (Hayashi 2016). Pierwszą metodę do oceny częstotliwości występowania mikrojąder w erytrocytach opracowali Boller i Schmid w 1970 roku, na podstawie obserwacji szpiku kostnego i krwi obwodowej chomika (Hayashi 2016). Mikrojądra obecne w erytrocytach powstają w dzielących się komórkach prekursorowych normoblastów w szpiku kostnym. W trakcie dojrzewania czerwonej krwinki jądro zostaje wyrzucone a MN pozostaje w komórce. Pomiar częstości występowania erytrocytów z MN w szpiku kostnym i krwi obwodowej był jednym z najczęściej stosowanych testów do oceny genotoksyczności u gryzoni i ludzi (Fenech 2020). Następnie wykazano, że MN ulegają ekspresji także w prekursorach leukocytów szpiku kostnego i limfocytach krwi obwodowej. Wykorzystanie limfocytów krwi do oceny występowania MN pozwoliło na prowadzenie badań w warunkach *in vivo*, *ex vivo* i *in vitro*. Tym samym procedura ta stała się jedną z najczęściej stosowanych metod badania genotoksyczności na komórkach ludzkich (Fenech 2020).

Mikrojądra są małymi owalnymi strukturami zlokalizowanymi w pobliżu jądra komórkowego, a występującymi w pewnych komórkach eukariotycznych. Stanowią one fragment chromatyny jądrowej pokrytej dookoła otoczką jądrową. Ich nazwa, mikrojądra, wskazuje, że charakteryzują się mniejszym rozmiarem niż jądro komórkowe, jednak ich średnica może stanowić od 1/16 do 1/3 średnicy głównego jądra (Fenech 2007). Mikrojądra mogą tworzyć się z całych chromosomów lub ich fragmentów, acentrycznych i centrycznych (Fenech 1997). Występowanie mikrojąder w komórce wiąże się z zaburzeniem podziału komórkowego i równomiernego rozdziału chromosomów do komórek potomnych. Stwierdzenie nieprawidłowości w postaci fragmentów lub całych chromosomów niewłączonych do jądra potomnego świadczy

o zaburzeniu stabilności chromatyny. Powstawanie mikrojąder może być skutkiem aberracji chromosomowej, wynikającej z niewłaściwej struktury nici DNA lub nieprawidłowej naprawy powstałych wcześniej uszkodzeń. Natomiast błędy związane z nieprawidłową segregacją chromosomów (nondyzjunkcją) mogą być spowodowane defektami wrzeciona podziałowego, centromeru lub wynikać z nieprawidłowej kondensacji chromatyny do chromosomów przed metafazą (Fenech i wsp. 2016). Wokół tak odłączonych fragmentów chromatyd lub całych chromosomów, podczas telofazy tworzy się otoczka jądrowa, a nowo powstałe struktury funkcjonują jako mikrojądra. Wraz z rozwojem metod umożliwiających detekcję centromerów i kinetochorów, możliwe było odróżnienie mikrojąder będących wynikiem nondyzjunkcji, od tych związanych z uszkodzeniem chromosomu (Fenech 1997). Według Fenech (2020) można wyróżnić sześć głównych przyczyn nasilonego powstawania mikrojąder. Pierwszą przyczynę stanowią defekty genetyczne obecne w białkach wymaganych do mitozy i jej punktów kontrolnych. Druga to defekty genetyczne w enzymach naprawczych DNA. Trzecią i czwartą była nadmierna ekspozycja odpowiednio na chemiczne genotoksyny i promieniowanie jonizujące. Piątą przyczyną był nadmiar endogennych genotoksyn wytwarzanych w wyniku stresu w procesach metabolicznych. Ostatnim, szóstym czynnikiem był niedobór odżywczych mikroskładników wymaganych, jako kofaktor do procesu replikacji i naprawy DNA.

Innym ważnym wskaźnikiem niestabilności chromatyny, który można analizować przy okazji mikrojąder, są sporadycznie występujące mostki nukleoplazmatyczne (NPB, ang. *nucleoplasmic bridge*). W obrazie mikroskopowym widoczne są jako nić łącząca jądra w komórce dwujądrazastej. Mogą one powstawać w anafazie w wyniku przyciągania centromerów chromosomów dicentrycznych lub chromatyd do przeciwległych biegunów komórki, fuzji końców telomerowych czy nieprawidłowej naprawy DNA (Umegaki i Fenech 2000, Fenech 2007). Do powstawania tych struktur mogą prowadzić różne mechanizmy będące następstwem błędnej naprawy nici DNA. Zazwyczaj przekształcenie zagubionego chromosomu dicentrycznego i fragmentu acentrycznego chromosomu prowadzą do powstania odpowiednio NPB i MN. Błędna naprawa nici DNA może prowadzić do utworzenia chromosomów dicentrycznych lub sprzężonych chromosomów pierścieniowych, które również mogą tworzyć NPB. Alternatywną metodą w wyniku której powstają dicentryki i NPB jest fuzja końców telomerowych. Spowodowana jest skracaniem się telomerów,

utrata białek je ochraniających lub defektami w kohezji telomerów (Fenech 2007). W wyniku zablokowania cytokinezy, NPB nie rozpadają się po zakończeniu podziału, a są gromadzone. W takiej sytuacji pod koniec telofazy błona jądrowa jest formowana wokół chromosomów, umożliwiając tym samym obserwację mostka anafazowego jako NPB. Mostki nukleoplazmatyczne powinny być również analizowane w teście mikrojądrowym, gdyż wskazują na poziom rearanzacji chromosomów. Dostarczają również bezpośrednie dowody uszkodzenia genomu wynikających z nieprawidłowej naprawy przerw DNA lub fuzji telomerów. Postawanie mostków nukleoplazmatycznych w komórkach może być także indukowane przez działanie klastogenów, wolnych rodników czy promieniowania jonizującego (Fenech 1997, Fenech 2000).

Kolejną nieprawidłowością, którą można zaobserwować przy okazji testu mikrojądrowego są pąki jądrowe, czyli NBUD (ang. *nuclear bud*) jako biomarker amplifikacji genów. Proces pączkowania jądra zaobserwowano w hodowlach prowadzonych w warunkach silnej selekcji, indukującej amplifikację genów. Formowanie NBUD stwierdzono również przy umiarkowanym niedoborze kwasu foliowego. Shimizu i wsp. (1998) w badaniach *in vitro* na komórkach ssaków wykazali, że amplifikowane DNA, lokalizowane na obrzeżu jądra komórkowego, jest eliminowane przez pączkowanie jąder, tworząc MN w fazie S mitozy. W związku z tym NBUD charakteryzują się taką samą morfologią jak mikrojądra. Pozostają jednak połączone z jądrem nicią materiału nukleoplazmatycznego, której grubość jest zależna od etapu pączkowania. Dotychczas nie udało się określić czasu trwania procesu pączkowania i mechanizmu wyprowadzania powstałych MN z komórki (Fenech 2007).

Wzrost zainteresowania analizą mikrojąder i szerokie wykorzystanie testu mikrojądrowego w badaniach nastąpiło po opracowaniu metody z zahamowaniem cytokinezy przez cytochalazynę B – test CBMN (ang. *cytokinesis-block micronucleus assay*). Metoda przeprowadzana jest w warunkach *in vitro* i wymaga dodania cytochalazyny B (Cyt-B) do hodowli komórkowej. Dodatek Cyt-B powoduje zahamowanie cytokinezy tuż po podziale jądra komórkowego i formowanie się komórek dwujądrzastych (BNC, ang. *binucleated cell*). W wariacie CBMN analizę występowania mikrojąder przeprowadza się w komórkach dwujądrzastych. Cytochalazyna B to związek organiczny charakteryzujący się plejotropowym wpływem na komórki, a oddziałujący z cytoszkieletem aktynowym. Prowadzi do zablokowania

cytokinezy ograniczając polimeryzację filamentów aktynowych lub powodując fragmentację już istniejących. W swoim działaniu nie wpływa na kariokinezę (Fenech 2007, Heddle i wsp. 2011). Opracowanie techniki CBMN pozwoliło odróżnić komórki będące po pierwszym podziale komórkowym od tych, które jeszcze go nie przeszły. Ten wariant testu mikrojądrowego jest standardową procedurą cytogenetyczną stosowaną w genetycznej toksykologii. Jest też preferowaną metodą do pomiaru MN w hodowlach komórek ludzkich i ssaczych. Rozwój techniki CBMN pozwolił na opracowanie kompleksowej metody pomiaru uszkodzeń chromosomów, nieprawidłowej naprawy DNA, utraty chromosomów, nondyzjunkcji, nekrozy, apoptozy czy cytostazy głównie, ze względu na swoją czułość, łatwość i precyzję w identyfikowaniu komórek dwujądrowych i w zliczaniu mikrojąder (Fenech 2007). Jednak w celu wiarygodnej oceny poziomu niestabilności genomowej test CBMN wymaga analizy wielu komórek (500 – 1000) co zwiększa czasochłonność analizy.

Powstawanie mikrojąder w komórce jest nie tylko skutkiem nieprawidłowości genomu, ale także niesie ze sobą dalsze konsekwencje. Zaobserwowano, że zamknięcie chromosomów w MN może powodować przedwczesną kondensację chromosomu i jego fragmentację. Zjawisko to występuje, gdy replikacja DNA w mikrojądrze jest opóźniona w stosunku do jądra komórkowego. Powstałe fragmenty chromosomów mogą zostać włączone do jednego z jąder potomnych i poddane naprawie błędów szlakiem NHEJ. W wyniku tego procesu powstaje zreorganizowany zmutowany chromosom. W związku z tym MN są nie tylko biomarkerami indukowanej niestabilności chromosomowej, ale także przyczyną dalszej amplifikacji tej niestabilności, która może wystąpić w ciągu dwóch cykli komórkowych. Opóźniona replikacja DNA w MN może być wynikiem stresu replikacyjnego związanego z brakiem enzymów i kofaktorów niezbędnych do naprawy i syntezy DNA. To z kolei może być spowodowane nieprawidłowym formowaniem otoczki jądrowej wokół MN, a tym samym brakiem porów jądrowych. W konsekwencji MN nie mogą prawidłowo importować białek niezbędnych do zachowania integralności otoczki jądrowej i genomu (Fenech 2020).

Test mikrojądrowy – CBMN jest jedną z metod analizy niestabilności chromosomowej, umożliwiającą wiarygodną analizę utraty i uszkodzeń chromosomów. Znalazła zastosowanie w badaniach komórek różnego typu, do monitorowania uszkodzeń chromosomów oraz w analizie i określaniu potencjału genotoksycznego

substancji chemicznych i innych czynników egzogennych. Test mikrojądrowy, stanowi narzędzie do oceny stopnia uszkodzenia chromatyny jądrowej, w organizmie narażonym na ekspozycję *ex vivo* na czynniki genotoksyczne i cytotoksyczne. Wykorzystywany jest również w warunkach *in vitro* do oceny potencjalnej toksyczności nowo syntetyzowanych substancji chemicznych (Fenech i wsp. 2016).

1.4.3. Test kometowy

Jedną z podstawowych metod cytogenetycznych analizy fragmentacji DNA jest test kometowy (ang. *comet assay*), a dokładnie elektroforeza pojedynczych jąder interfazowych (SCGE, ang. *single cell gel electrophoresis*). Test kometowy został po raz pierwszy przedstawiony w 1984 roku przez Östlinga i Johansona jako mikroelektroforetyczna technika do detekcji i wizualizacji uszkodzeń DNA w pojedynczych komórkach (Fairbairn i wsp. 1995). Stosowany jest do określenia poziomu naprawy DNA i sprawności mechanizmów naprawczych oraz umożliwia określenie stopnia wrażliwości komórek, a tym samym osobnika, na określony czynnik genotoksyczny. Zaletą testu kometowego jest uniwersalność zastosowania i czułość. SCGE może zostać przeprowadzony na każdej komórce jądrzastej, z dowolnej tkanki, z której jest możliwość uzyskania zawiesiny komórkowej. W związku ze swoimi właściwościami test kometowy znalazł zastosowanie w toksykologii, zarówno na poziomie *in vivo*, jak i *in vitro*, biomonitoringu genotoksyczności, ocenie mechanizmów naprawczych po terapiach onkologicznych (radioterapii, chemioterapii). Wykorzystywany jest też w badaniach dotyczący żywienia zwierząt i człowieka oraz przy ocenie materiału biologicznego w bankach nasienia czy krwi (Collins 2004, Czubaszek i wsp. 2014). W porównaniu do innych testów cytogenetycznych jego niewątpliwą przewagą w badaniach genotoksyczności jest wiarygodna ocena uszkodzeń w warunkach *in vivo* w komórkach szybko proliferujących (Hartmann i wsp. 2003).

Metoda ta umożliwia identyfikację jednoniciowych i dwuniciowych pęknięć DNA oraz wszelkich modyfikacji w komórce, które mogą przekształcić się w pęknięcie. Do takich nieprawidłowości, należą powstałe na drodze chemicznej miejsca apurynowe czy niestabilne addukty, a w wyniku przemian enzymatycznych – uszkodzenia oksydacyjne. Pomiar pęknięć DNA daje ograniczone informacje. Pęknięcia mogą

powstawać na skutek bezpośredniego działania jakiegoś uszkadzającego czynnika, ale generalnie są one szybko naprawiane.

Test kometowy może być przeprowadzony w dwóch wariantach: neutralnym i alkalicznym. Neutralna elektroforeza pojedynczych jąder interfazowych (ang. *Neutral Single Cell Gel Electrophoresis*) pozwala na identyfikację niskiego poziomu uszkodzeń DNA, a elektroforeza prowadzona jest w neutralnych warunkach. Analiza wykonana przy takich parametrach jest mniej czuła i umożliwia detekcję tylko pęknięć dwuniciowych DNA (Olive i Banáth 2006, Collins i wsp. 2008). Rozwinięcie tej metody zaproponował Olive i wsp. (1991), wskazując na możliwość identyfikacji pęknięć dwuniciowych bez zakłócania detekcji przez SSB. W zaproponowanej modyfikacji testu, liza komórek zawieszonych w agarozie była prowadzona w temperaturze 50°C, co pozwalało na usunięcie większej części białek komórkowych. Autorzy zakładali, że w takich warunkach matryca jądrowa jest zaburzona i możliwa jest obserwacja funkcjonowania DSB lub ich wolnych końców (Collins 2004).

Drugim, bardziej powszechnym w analizie, wariantem testu kometowego jest opcja alkaliczna – ang. *Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis*. Metoda ta została rozwinięta przez Singh i wsp. (1988). Zaproponowano prowadzenie wszystkich etapów testu, od lizy, w warunkach silnie alkalicznych. Zgodnie z modyfikacją liza komórek miała być prowadzona w pH=10 w obecności Tritonu X-100, Sarkosylu i 2,5M NaCl, natomiast etap elektroforezy w roztworze 0,3M NaOH o pH=13. Dodatkowo Olive i wsp. (1990) wprowadzili etap poprzedzający elektroforezę, polegający na inkubacji komórek po lizie w słabym buforze do elektroforezy. Założyli, że niezbędne do ujawnienia przerwania jest rozwijanie, elucja w warunkach alkalicznych, która pozwoli na rozdzielenie dwóch nici DNA wokół miejsca przerwania, powstałego w wyniku denaturacji alkalicznej. Metoda alkaliczna testu kometowego umożliwia wykrycie najszerszego spektrum uszkodzeń DNA i dlatego jest zalecana w większości procedur analitycznych. Możliwe jest uwidacznianie uszkodzeń w postaci pęknięć pojedynczej i podwójnej nici DNA, w postaci przerw miejsc apurynowych i apirymidowych, które są alkalicznie wrażliwe i przekształcają się w SSB. Obserwowane uszkodzenia mogą być również fragmentami DNA, usuniętymi przez mechanizmy naprawcze. Możliwe jest również wykrywanie wiązań krzyżowych DNA-DNA i DNA-białko (Hartmann i wsp. 2003).

Podstawową zasadą testu kometowego jest migracja DNA w żelu agarozowym podczas elektroforezy. Wiąże się to ze zdolnością ujemnie naładowanych fragmentów DNA do przemieszczania się przez żel agarozowy w odpowiedzi na pole elektryczne. Zakres migracji DNA zależy bezpośrednio od uszkodzeń DNA obecnych w komórkach (Kumaravel i wsp. 2009). W obrazie mikroskopowym, komórka przyjmuje postać komety, której głowę stanowi jądrowe DNA, natomiast ogon zawiera fragmenty DNA. Uszkodzone fragmenty dwuniciowe i jednoniciowe DNA migrują w trakcie rozdziału elektroforetycznego w kierunku elektrody ujemnej, anody. Zmienna migracja DNA jest zależna od różnych parametrów, jak stężenie żelu agarozowego, pH, temperatury, natężenia i napięcia prądu oraz czasu trwania elektroforezy (Hartmann i wsp. 2003). Uszkodzenia DNA składające się głównie z przerwanych nici zwiększają migrację DNA, podczas gdy wiązania krzyżowe DNA-DNA czy DNA-białko powodują opóźnienie migracji DNA w porównaniu do kontroli, gdyż struktury te biorą udział w stabilizowaniu chromosomalnego DNA (Brendler-Schwaab i wsp. 2005, Kumaravel i wsp. 2009).

W celu określenia poziomu uszkodzeń, test przeprowadza się na szkiełkach mikroskopowych pokrytych warstwą agarozą o normalnej temperaturze topnienia. Zawiesinę badanych komórek miesza się z agarozą o niskiej temperaturze/punkcie topnienia i rozprowadza się na przygotowanym szkiełku podstawowym. W trakcie lizy komórek w buforze zawierającym detergent i wysokie stężenie soli następuje wytrawienie błon komórkowych i białek histonowych, pozostawiając DNA superzwinięte i przytwierdzone do macierzy jądrowej (Dusinska i Collins 2008). Natomiast odwijanie, rozluźnianie superzwiniętej struktury DNA i migracja uszkodzonych fragmentów przebiega w buforze do elektroforezy w określonych warunkach pH. Przeprowadzenie tych etapów w warunkach neutralnych (pH 7–8) ułatwia wykrywanie pęknięć podwójnej nici, wyciętych niekompletnych miejsc naprawy czy wiązań krzyżowych. Z kolei warunki alkaliczne przy pH 12.1–12.4 rozszerzają możliwości identyfikowanych uszkodzeń o SSB, a podwyższenie pH do 12.6 dodatkowo pozwala na wykrycie uszkodzeń miejsc alkalicznie labilnych (ALS, ang. *alkali-labile sites*). Po wzbudzeniu pola elektrycznego, uszkodzone DNA migruje poza komórkę w kierunku anody, przyjmując formę komety. Wielkość i kształt komety, wizualizowane za pomocą barwników wiążących się z DNA, oraz rozmieszczenie DNA w jej obrębie korelują z zakresem uszkodzenia DNA (Collins i wsp. 2008, Kumaravel i wsp. 2009).

Wykrywane w wariancie alkalicznym testu kometowego miejsca apurynowe i apirymidowe (miejsca AP), powstają w wyniku utraty uszkodzonej zasady, pozostawiając cukier bez zasady w szkielecie DNA (depurynizacja lub depirymidyzacja) (Philips i Arlt 2009). Miejsca AP mogą być pośrednimi produktami procesu naprawy przez wycięcie zasady (ang. *base excision repair*, BER), jednak mogą też postawać spontanicznie z powodu zmienionej stabilności chemicznej wynikającej ze zmian w obrębie zasad lub cukrów. Stwierdzono, że pH równe 13 (czyli takie jak podczas elektroforezy alkalicznej) jest wystarczające, aby miejsca AP przekształciły się w miejsca przerwań. Poniżej tej wartości pH zmiana ta nie jest możliwa (Collins i wsp. 2008).

Test kometowy umożliwia identyfikację komórek będących w stadium apoptozy czy nekrozy. W obrazie mikroskopowym, komórki takie nie przyjmują standardowego wyglądu komety. W przypadku komórek apoptotycznych głowa komety jest bardzo mała lub nie istnieje, z kolei ogon jest duży i rozproszony. Komórki o takim kształcie powszechnie nazywane są „jeżami – hedgehogs”, „komórkami widmowymi”, „chmurami” czy „niewykrywalnymi jądrami komórkowymi – ang. *non-detectable cell nuclei* (NDCN)” (Brendler-Schwaab i wsp. 2005). Ze względu na bardzo niską masę cząsteczkową DNA w komórkach apoptotycznych/nekrotycznych, komórki te mogą zostać utracone w warunkach elektroforetycznych, a tym samym nie będą identyfikowane w obrazie mikroskopowym (Hartmann i wsp. 2003). Według Fairbairn i wsp. (1995) w wyniku testu kometowego możliwe jest rozróżnienie komórek apoptotycznych od nekrotycznych. Zasugerowali, że komórki nekrotyczne wykazują oznaki przepuszczalności błony plazmatycznej i utratę integralności przed późną degradacją DNA. Natomiast w przypadku komórek apoptotycznych zaobserwowali, że zachowują integralność błony powierzchniowej po fragmentacji jądra (Fairbairn i wsp. 1995).

Wraz z rozwojem technik molekularnych pojawiają się modyfikacje testu kometowego, np. w połączeniu z techniką fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) – Comet-FISH. Położenie fluorescencyjnych sygnałów hybrydyzacyjnych w głowie lub ogonie komety wskazuje czy będąca przedmiotem zainteresowania sekwencja leży wewnątrz lub w pobliżu uszkodzonego regionu DNA. Najlepszym wskaźnikiem uszkodzenia DNA przy użyciu Comet-FISH wydaje się być lokalizacja rozszczepionych lub nienaruszonych sygnałów FISH w głowie lub ogonie komety. Taka modyfikacja

testu umożliwia określenie sekwencji DNA lub genów specyficznych dla uszkodzeń i naprawy, lokalizacji domen genowych w obrębie pojedynczej komórki, jak również do zastosowania diagnostycznego. Wykorzystywany jest w badaniach translacyjnych, w ocenie chemiowrażliwości i radiowrażliwości nowotworów (Kumaravel i wsp. 2009).

Test SCGE jest badaniem wskaźnikowym w odniesieniu do wykrywania uszkodzeń DNA i stosowany głównie, jako badanie uzupełniające w warunkach *in vivo* dla substancji z pozytywnymi efektami mutagenności. Badania prowadzone z wykorzystaniem testu kometowego przyczyniają się do identyfikacji zagrożeń, oceny czy dany czynnik ma charakter genotoksyczny, odpowiedzi na dawkę substancji i wywołania niepożądanych efektów (Brendler-Schwaab i wsp. 2005). Test kometowy ma zastosowanie w dziedzinach biomedycznych i środowiskowych, jak biomonitoring populacji ludzkich pod kątem narażenia zawodowego/środowiskowego na czynniki genotoksyczne i stresu oksydacyjnego w związku z różnymi chorobami. Metoda ta jest szczególnie przydatna do monitorowania naprawy DNA po niskich dawkach czynników indukujących uszkodzenia (Dusinska i Collins 2008). W badaniach prowadzonych na ssakach, test kometowy może być stosowany, jako nieswoisty, czuły, szybki i ekonomiczny biomarker do wykrywania uszkodzeń genetycznych w naturalnej faunie (Jha 2008).

1.5. Pies domowy – ogólne informacje o gatunku

Pies domowy, jako gatunek, został zaklasyfikowany w systematyce przez Linneusza w 1758 roku jako *Canis familiaris* oraz synonim *Canis lupus familiaris* (Wilson i Reeder 2005). Nazwa *Canis lupus familiaris*, określana jest jako domowa forma wilka i jest drugą obowiązującą systematycznie nazwą psa domowego, według której pies jest uznawany jako podgatunek wilka, czyli swojego prawdopodobnego przodka (Wilson i Reeder 2005). Pies domowy zaliczany jest do rodziny psowatych, *Canidae*, do której należy 35 gatunków. Uważa się, że około 50 – 60 milionów lat temu rodzina psowatych wyodrębniła się z innych rodzin mięsożernych (Breen 2008). Psy charakteryzują się stosunkowo długim okresem życia. Jako zwierzęta towarzyszące żyją w różnych środowiskach w bliskim kontakcie ze swoimi opiekunami (Hofman i wsp. 2018).

Systematyka psa domowego według Integrated Taxonomic Information System na podstawie systematyki Linneusza (Wilson i Reeder 2005):

Klasa – ssaki (*Mammalia*)

Rząd – drapieżne (*Carnivora*)

Rodzina – psowate (*Canidae*)

Rodzaj – pies/wilk (*Canis*)

Gatunek – wilk (*Canis lupus*)

Podgatunek: pies domowy (*Canis lupus familiaris*, *Canis familiaris*)

Pies domowy uważany jest za pierwsze udomowione zwierzę. Wiele danych wskazuje, że wszystkie rasy psów pochodzą od euroazjatyckiego wilka szarego (*Canis lupus lupus*) (Sutter i Ostrander 2004, Hytönen i Lohi 2016). W krajach basenu Morza Śródziemnego udomowienie psa nastąpiło wcześniej niż na pozostałych terenach Europy, wynikało to z wyższego poziomu kultury i rozwoju. Dodatkowo, liczne szkielety psów domowych znaleziono na terenie Indii, Persji czy Egiptu, a także mumie psów, co wskazuje, że pies był uznawany za zwierzę domowe (Kuczyńska i Barszcz 2013).

Obecnie istnieje 400 ras psów posiadających określone, specyficzne cechy fizyczne i behawioralne (Hytönen i Lohi 2016). Psy ewoluowały przez wzajemnie korzystną relację z ludźmi, dzieląc z nimi pożywienie i przestrzeń życiową. Zmienność fenotypowa w obrębie gatunku jest wynikiem intensywnych prac hodowlanych prowadzonych od ponad 200 lat, w celu otrzymania poszczególnych ras psów. Takie zabiegi pozwoliły na otrzymanie dużej zmienności genetycznej pomiędzy rasami, tym samym z zachowaniem niewielkiej zmienności w obrębie ras. Prowadzona selekcja hodowlana pozwoliła na uzyskanie ras o specjalnych umiejętnościach, jak psy o zdolnościach pasterskich, stróżujących, tropiących oraz wiele innych.

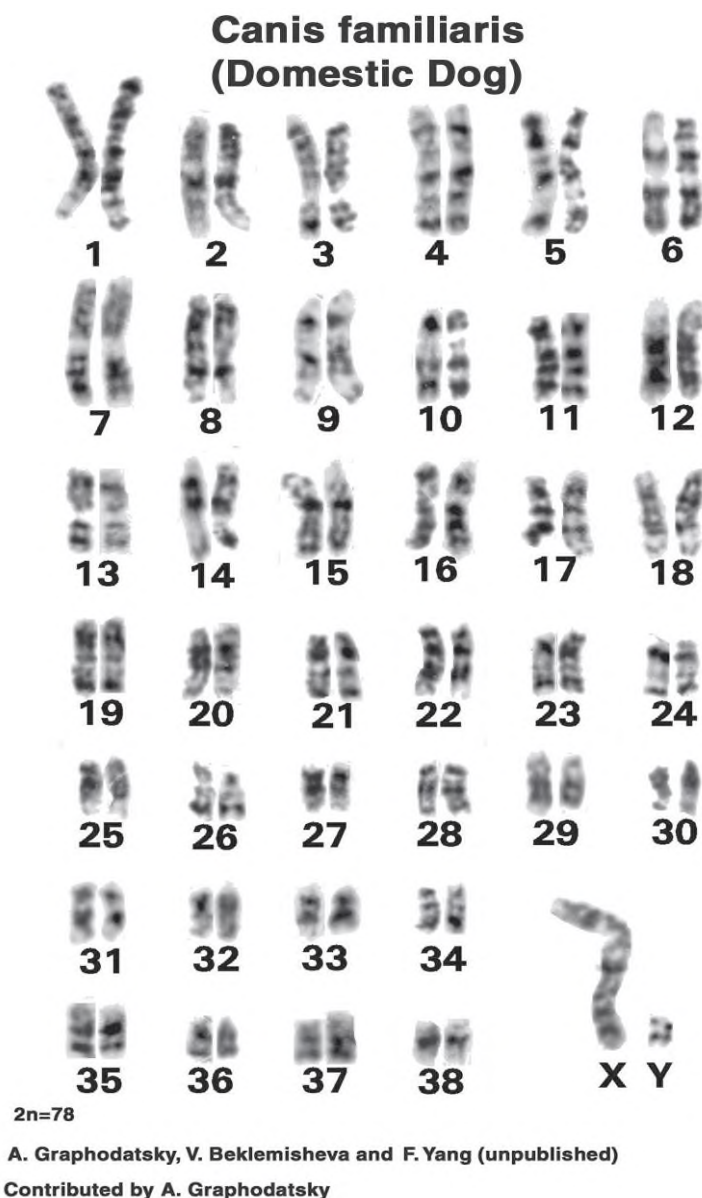
Pies domowy jest gatunkiem o bardzo dużym zróżnicowaniu eksterierowym, u którego zmienność budowy obserwowana jest nawet w obrębie tej samej rasy. Obserwowane różnice dotyczą pokroju zwierząt, budowy anatomicznej różnych struktur, ale przede wszystkim głowy (Lindblad-Toh i wsp. 2005, Kuczyńska i Barszcz 2013).

1.5.1. Kariotyp psa domowego

Pies domowy posiada 78 chromosomów, w tym 76 akrocentrycznych autosomów oraz parę chromosomów płci (Selden i wsp. 1975). Chromosom X jest dużym chromosomem submetacentrycznym, natomiast Y jest małym metacentrykiem (Świtoński i wsp. 2004, Breen 2008). Całkowita liczba ramion chromosomowych (NF) w kariotypie psa wynosi 80 (Breen i wsp. 1999b). Para największych autosomów, chromosomy – 1 pary, mają rozmiar ~ 125 Mb i jest prawie równa długości chromosomowi X. Pozostałe autosomy stopniowo zmniejszają swoje rozmiary (Langford i wsp. 1996, Breen 2008).

Od ponad 30 lat trwają prace nad opracowaniem standardowego wzorca kariotypu psa domowego. Badania te prowadzone były przez kilka zespołów naukowych, a zapoczątkował je w 1975 roku Selden i wsp. wykorzystując technikę barwienia prążków G (GTG). Kolejną próbę opisanie kariotypu psa przedstawił w 1976 roku Manolache i wsp. bazując na technikach prążkowych GTG i prążków Q (Breen i wsp. 1999a). Jednak praca nad kariotypem psa przysporzyła wiele trudności w identyfikacji wielu par małych autosomów. Wynikało to z ich dużego podobieństwa, pod względem wielkości, morfologii i wzoru prążkowego. Kolejność i wzór prążków dla 22 par chromosomów, w tym pierwszych 21 par autosomów i pary chromosomów płci został opracowany i uzgodniony przez Komitet ds. Standaryzacji Kariotypu Psów podczas 11-stego Europejskiego Kolokwium Cytogenetyki Zwierząt Domowych (*11th European Colloquium on Cytogenetics of Domestic Animals*) w Kopenhadze w 1995 roku (Langford i wsp. 1996, Świtoński i wsp. 1996). We wzorcu przedstawiono układ prążków G dla 22 par chromosomów oraz ideogram z 235 prążkami (Świtoński i wsp. 1996). Propozycję kariotypu psa przedstawiono na Ryc. 1. Dalsze prace w kierunku standaryzacji całego kariotypu psa domowego prowadzili Reimann i wsp. (1996), którzy dzięki zastosowaniu sond z powtórzeniem sekwencji centromerowych, byli w stanie przedstawić prawidłową orientację chromosomów. W swojej pracy umieścili rozszerzony opis nomenklatury kariotypu psa, a także przedstawili ideogram na poziomie 460 prążków (Breen i wsp. 1999a). Próbę identyfikacji chromosomów par 22 – 38 podjęła Langford i wsp. (1996) wykorzystując sondy malujące chromosomy (WCPP, ang. *whole chromosome paint probe*) do analizy FISH oraz dwuwymiarowe sortowanie przepływowe chromosomów. Badania te doprowadziły do opracowania wspólnej nomenklatury dla chromosomów par 22 – 38. Następnie połączony system

numeracji wszystkich chromosomów psa został zatwierdzony w 2000 roku przez Międzynarodowe Towarzystwo Genetyki Zwierząt (ISAG, *International Society of Animal Genetics*) (Breen 2008). Opracowanie drugiego niezależnego zestawu sond malujących chromosomy psów przez Yang i wsp. (1999) pozwoliło zintegrować nomenklaturę autorów z nomenklaturą komitetu standaryzacyjnego dla wszystkich chromosomów psa, z wyjątkiem 10-ciu par najmniejszych autosomów (Breen 2008). Z kolei w 1999a roku Breen i wsp. zastosowali specyficzne sondy malujące FISH i wykorzystując technikę prążkową DAPI, otrzymali i po raz pierwszy przedstawili dokładny kariotyp i ideogram 460 prążków DAPI. Układ i nomenklatura zaprezentowana przez Breen i wsp. (1999a) zachowywała maksymalną zgodność ze wzorami prążków GTG opisywanymi przez Reimanna i wsp (1996) za Seldenem i wsp. (1975).



Ryc. 1. Kariogram psa domowego, $2n=78,XY$. Barwienie GTG (O'Brien i wsp. 2006).

Analizę występowania heterochromatyny konstytutywnej techniką prążków C na chromosomach psa przeprowadzili Pathak i wsp. (1982). Autorzy stwierdzili występowanie heterochromatyny konstytutywnej na wielu autosomach w obszarze centromerowym. Wyraźny ciemny prążek C zaobserwowali na siedmiu parach autosomów. Dodatkowo wyraźny ciemny region zaobserwowali na długim ramieniu chromosomu X, podobnie w przypadku ramienia q chromosomu Y. W przypadku autosomów nie stwierdzili ciemnych prążków C w obszarze telomerowym (Pathak i wsp. 1982). Analiza prążków C, przeprowadzona przez Fujinaga i wsp. (1989), wykazała obecność prążków w regionach centromerowych na sześciu parach autosomów: 7, 26, 34, 35, 37, 38.

Z kolei analiza obszarów jąderkotwórczych przy użyciu techniki Ag-NOR wykazała w samczym kariotypie psa siedem NOR. Zlokalizowane były one na trzech parach autosomów w części telomerowej długich ramion oraz na krótkim ramieniu chromosomu Y (Pathak i wsp. 1982). Howard-Peebles i Howell (1983) zaobserwowali, że liczba aktywnych NOR-ów w przypadku samic wahała się między cztery a siedem, a u samców między pięć a osiem. Wyższa liczba obszarów jąderkotwórczych u samców wynikała z obecności NOR na chromosomie Y. Badania Howard-Peebles i Howell (1983) wskazywały też na możliwość występowania NOR na czterech parach autosomów u psów. Z kolei badania przeprowadzone przez Rønne i wsp. (1991) z wykorzystaniem barwienia Ag-NOR wykazały obecność aktywnych sygnałów w obszarach terminalnych na ośmiu autosomach, z par 5, 8, 14, 16, 19, 21, 32, 37. Dodatkowo stwierdzili występowanie aktywnego NOR w regionie telomerowym długiego ramienia chromosomu X na 10% analizowanych metafaz (Rønne i wsp. 1991). Dalsze badania w celu identyfikacji obszarów jąderkotwórczych na chromosomach psa domowego przeprowadzili Pieńkowska i Świtoński (1998). Analiza NOR przy użyciu techniki FISH z sondą komplementarną do sekwencji ludzkiej 28s rDNA wykazała aktywne NOR na trzech parach autosomów oraz na chromosomie Y. Obszary jąderkotwórcze na autosomach zlokalizowano na ramionach q w terminalnej części. Dzięki zastosowaniu techniki prążków Q, stwierdzono, że są to chromosomy pary 7 i 17. Trzeci autosom, na którym zaobserwowano aktywny NOR, należał do grupy małych autosomów, które nie zostały jeszcze wtedy opracowane w standardowym kariotypie. W przypadku samców, aktywne NOR obserwowano w terminalnym odcinku długiego ramienia chromosomu Y (Pieńkowska i Świtoński 1998).

Kolejne badania z wykorzystaniem sortowania chromosomów sugerowały, że haploidalny genom samicy psa mieści się w granicach 2800 Mb. Obecnie uważa się, że fizyczne rozmiary chromosomów psów nie przypominają ich kolejności w ustalonym kariotypie, tworzonym w oparciu o konwencjonalną mikroskopię i ocenę wielkości chromosomów (Breen 2008). Badania nad zsekwencjonowaniem całego genomu psa prowadzone w USA pozwoliły na określenie wielkości genomu psa na poziomie 2,4 Gb (Świtoński i wsp. 2004, Breen 2008). Tym samym potwierdzono, że genom psa jest mniejszy od ludzkiego, wynoszącego 2,9 Gb, co wiąże się najprawdopodobniej z mniejszym odsetkiem sekwencji powtórzonych. Dodatkowo oszacowano, że około

650 Mb sekwencji DNA w sposób jednoznaczny pokrywa się z ludzkim genomem (Świtoński i wsp. 2004).

1.5.2. Pies jako gatunek modelowy w badaniach

Pies jest modelem zwierzęcym i obiektem badań biomedycznych, który pod kątem fizjologicznym i klinicznym jest bardziej podobny do człowieka niż myszy. Ważny w ujęciu modelowym, jest fakt, że psy dzielą ze swoimi właścicielami warunki środowiskowe, czyli „styl życia” (Hytönen i Lohi 2016). Pies uznawany jest za wskaźnik zdrowia ludzkiego, ze względu na jego bliskość do ludzi i podobną dietę (Harley i wsp. 2016).

Pies domowy jest doskonałym modelem w badaniach genetycznej podatności na choroby, ich charakteru, etiologii oraz przebiegu chorób, w tym nowotworów. Zrozumienie genetycznych podstaw zmienności ssaków, w tym ich zdolności do zapadania na choroby jest możliwe dzięki analizom dużej homogenności wewnątrz rasowej psów oraz dużej zmienności heterogenicznej między rasami *Canis familiaris*. Pies i ludzie dzielą wiele chorób genetycznych i nabytych, z których wiele wynika z ich środowiska. Pies jest doskonałym modelowym organizmem do badań chorób dziedzicznych, które dotyczą zarówno psy, jak i ludzi, ponieważ charakteryzują się powstawaniem w podobnych warunkach, właściwościami biologicznymi, histopatologicznymi oraz przebiegiem klinicznym. Dodatkowo pies charakteryzuje się fizjologią bardziej odpowiednią do porównywania z ludzką niż inne tradycyjne organizmy modelowe (Mellersh 2008). Często w przypadku psów i ludzi zachorowalność przebiega z podobną częstotliwością oraz może być powiązana z tymi samymi czynnikami genetycznymi (Shearin i Ostrander 2010). U psa domowego może występować ponad 450 jednostek chorobowych, z których aż 360 posiada analogię do chorób ludzkich, dzięki temu pies jest odpowiednim modelem w przypadku wielu dziedzicznych chorób człowieka. Psy stanowiły model wielu chorób występujących u ludzi, w tym atopowego zapalenia skóry, astmy, alergii pokarmowych czy choroby zwyrodnieniowej stawów. Wyniki uzyskane z takich badań, umożliwiają bardziej adekwatne ich odzwierciedlenie u ludzi, głównie ze względu na bytowanie człowieka i psa w tym samym środowisku (Wheeler i wsp. 2020). Dodatkowo, psy ze względu na podobieństwo budowy kości, wykorzystywane są jako model w badaniach nad układem mięśniowo-szkieletowym oraz w badaniach stomatologicznych (Pearce i wsp. 2007). Z kolei, w pracy Hoffman i wsp. (2018) pies był rozpatrywany jako model badań nad

różnymi aspektami starzenia, ludzkiej śmiertelności i zachorowalności. Zaobserwowali oni, że wiele chorób ludzkich, jak otyłość, cukrzyca, niedoczynność tarczycy, związane z występowaniem chorób współtowarzyszących wiązały się z podobnym poziomem zachorowalności u psów towarzyszących. Ze względu na fakt, że psy domowe są gatunkiem stale przebywającym w towarzystwie i pod opieką człowieka ich obserwacje pozwolą na lepsze zrozumienie czynników genetycznych i środowiskowych, wpływających na długość życia.

Dlatego, aby lepiej zrozumieć niektóre mechanizmy i czynniki genetyczne Amerykański Narodowy Instytut Badań nad Genomem Ludzkim (NHGRI, *US National Human Genome Research Institute*) rozpoczął w 2003 roku badania nad zsekwencjonowaniem całego genomu suczki rasy bokser (Mellersh 2008). Tym samym pies domowy został piątym gatunkiem, po człowieku, szympankach, myszach i szczurach, którego genom został w całości zsekwencjonowany. Natomiast w 2015 roku rozpoczęto międzynarodowy projekt Dog10K Genomes, którego celem było zsekwencjonowanie 10 tysięcy genomów obejmujących jak najwięcej ras psów (Tang i wp. 2019). Opracowano też bazę iDog, stanowiącą bazę sekwencji genomowych psów i wilków, warianty genomowe, cechy fenotypowe i chorobowe, homologii genów (Tang i wsp. 2019).

W badaniach Zentrichová i wsp. (2021) dotyczących wpływu selenu na metabolizm i właściwości organizmu, pies domowy posłużył, jako model w badaniu niedoboru i nadmiaru selenu w diecie. Psy ze względu na wyższą tolerancję selenu, niż np. konie i bydło, pozwoliły na zbadanie nowych aspektów metabolizmu selenu oraz opracowania rekomendacji żywieniowych. Badania dotyczące prawidłowej diety psów przygotowywanej w warunkach domowych prowadzili również Morrelli i wsp. (2021). W swojej pracy skupili się nad aspektami prawidłowego przygotowania i przechowywania pokarmów przyrządzanych przez opiekunów psów, tak by spełniały one normy żywieniowe, były odpowiednio dobrane do wieku psa oraz nie powodowały zatrucia pokarmowego przez nieprawidłowe techniki. Znaczenie jakości mikrobiologicznej pokarmów w diecie psów i ograniczenia ryzyka zawartości mykotoksyn w produktach poruszały Kępińska-Pacelik i Biel (2021).

Innym aspektem badań z wykorzystaniem psa jako organizmu modelowego są badania behawioralne i terapeutyczne. W ostatnich latach obserwuje się rozwój

wykorzystania psów jako przewodników dla osób z niepełnosprawnością wzrokową czy słuchu, psy asystujące osobom z autyzmem, czy cierpiącym na zespół stresu pourazowego. Psy szkolono również do wykrywania niskiego poziomu cukru we krwi u swoich opiekunów czy objawów napadów padaczkowych. Ze względu na szkolenia psów do celów służbowych ważne było sprawdzanie poziomu kortyzolu, jako wskaźnika stresu w procesie szkolenia psów do służby w celu zachowania dobrostanu tych zwierząt (van Houtert i wsp. 2021).

Pies domowy stanowi bardzo dobry model w badaniach nad toksycznością nanocząstek srebra ze względu na swoje podobieństwo do człowieka. Fakt ten, po pierwsze wynika ze współdzielenia warunków środowiskowych, czyli „stylu życia”. Drugim aspektem jest podobieństwo fizjologiczne oraz genetyczne pokrewieństwo w zapadaniu na choroby, w tym nowotwory i ich etiologii.

1.6. Lis polarny – ogólne informacje o gatunku

Lis polarny (*Alopex lagopus* Linnaeus, 1758), określany czasem także jako piesiec lub piesak, jest kolejnym przedstawicielem rodziny psowatych (*Canidae*), należącej do ssaków rzędu drapieżnych (*Carnivora*). W rodzaju *Alopex* wyróżniany jest tylko jeden gatunek, w obrębie, którego charakteryzuje się kilka odmian barwnych.

Systematyka według Corbet i Hill (1991):

Klasa: ssaki (*Mammalia*)

Rząd: drapieżne (*Carnivora*)

Rodzina: psowate (*Canidae*)

Rodzaj: lis (*Alopex*)

Gatunek: lis polarny (*Alopex lagopus*)

Lis polarny w warunkach naturalnych zamieszkuje obszar koła polarnego Ameryki Północnej (od Alaski do Labradoru), jak również strefę arktyczną Europy i Azji. Występuje także na terenach wokół Morza Arktycznego, w tym na Grenlandii i Ziemi Północnej. W Europie główny zakres jego występowania obejmuje tereny Skandynawii (Norodd 1988, Agerbjorn i wsp. 2004).

Ciało lisa polarnego ma zwartą budowę, co stanowi czynnik termoregulacyjny i sposób przystosowania się do surowego arktycznego klimatu. Długość ich ciała waha się od 55 do 75 cm, a masa ciała wynosi od 6 do 8 kg. Lisy polarne charakteryzują się ogonem o długości od 25 do 50 cm (Piórkowska 2010). Samica lisa polarnego rodzi średnio 8 – 12 młodych. Zdarzają się też mioty liczące nawet do 25 osesków (Cholewa 1988).

W obrębie gatunku wyróżnia się odmiany barwne lisa. Do głównych odmian barwnych, wynikających z ogólnego zabarwienia futra, należą: lis niebieski, lis cienisty i lis biały. Różnice w barwie futra lisiego zależą od koncentracji i rodzaju ciemnej eumelaniny, czyli pigmentu, oraz od jego rozmieszczenia (Cholewa 1988). Podstawową odmianą barwną jest lis polarny niebieski, charakteryzuje się ona ogólnie białą barwą pokrywy i pigmentowanymi włosami podszycia. Futro przyjmuje białą barwę z jasnoniebieskim odcieniem (Cholewa 1988, Piórkowska 2010).

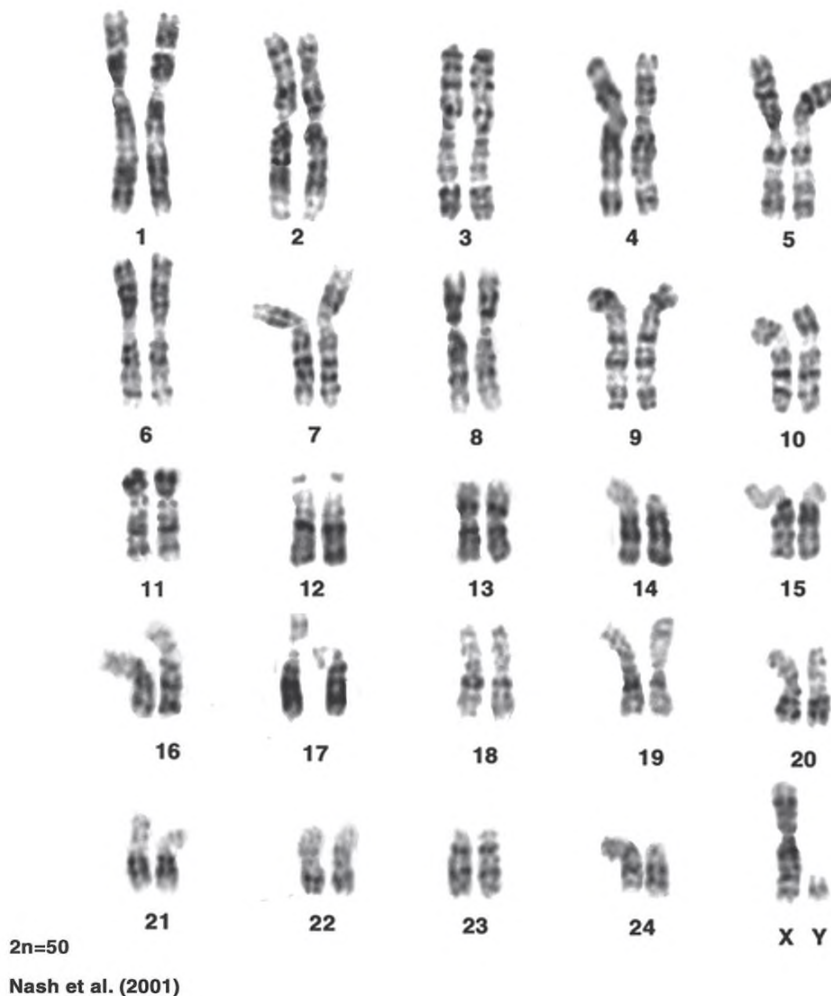
1.6.1. Kariotyp lisa polarnego

Badania nad liczbą chromosomów występującą w komórkach lisa polarnego niebieskiego rozpoczął Lande w 1960 roku, określając diploidalną liczbę chromosomów równą $2n=50$ (Gustavsson i Sundt 1965). Wraz z rozwojem hodowli lisa polarnego w krajach skandynawskich (Finlandia, Szwecja), a także w Danii i Polsce, prowadzono liczne badania nad kariotypem tego gatunku lisa, co pozwoliło zaobserwować występowanie różnej liczby chromosomów u osobników z gatunku *Alopex lagopus*. Lisy polarne charakteryzują się polimorfizmem kariotypowym, czyli zmienną diploidalną liczbą chromosomów, która może wynosić $2n=48$, $2n=49$ lub $2n=50$ chromosomów (Makinen i Gustavsson 1980, Świtoński 1981, Christensen i Pedersen 1982). Zmienność liczby chromosomów, czyli jej polimorfizm wynika z obecności fuzji centrycznych zachodzących między dwoma parami akrocentrycznych autosomów. Wśród osobników posiadających translokację wyróżniono heterozygoty ($2n=49$) lub homozygoty ($2n=48$) (Makinen i wsp. 1981).

Chromosomy stanowiące podstawowy wariant kariotypu lisa polarnego uporządkowano w 4 grupy w oparciu o długość chromosomu oraz położenie centromeru. Według tego podziału Makinen i wsp. (1985) wyróżnili kilka grup autosomów: 9 par chromosomów metacentrycznych, 3 pary submetacentryczne oraz 10 par, obejmujące małe metacentryki i submetacentryki. Ostatnią grupę stanowiły 2 pary

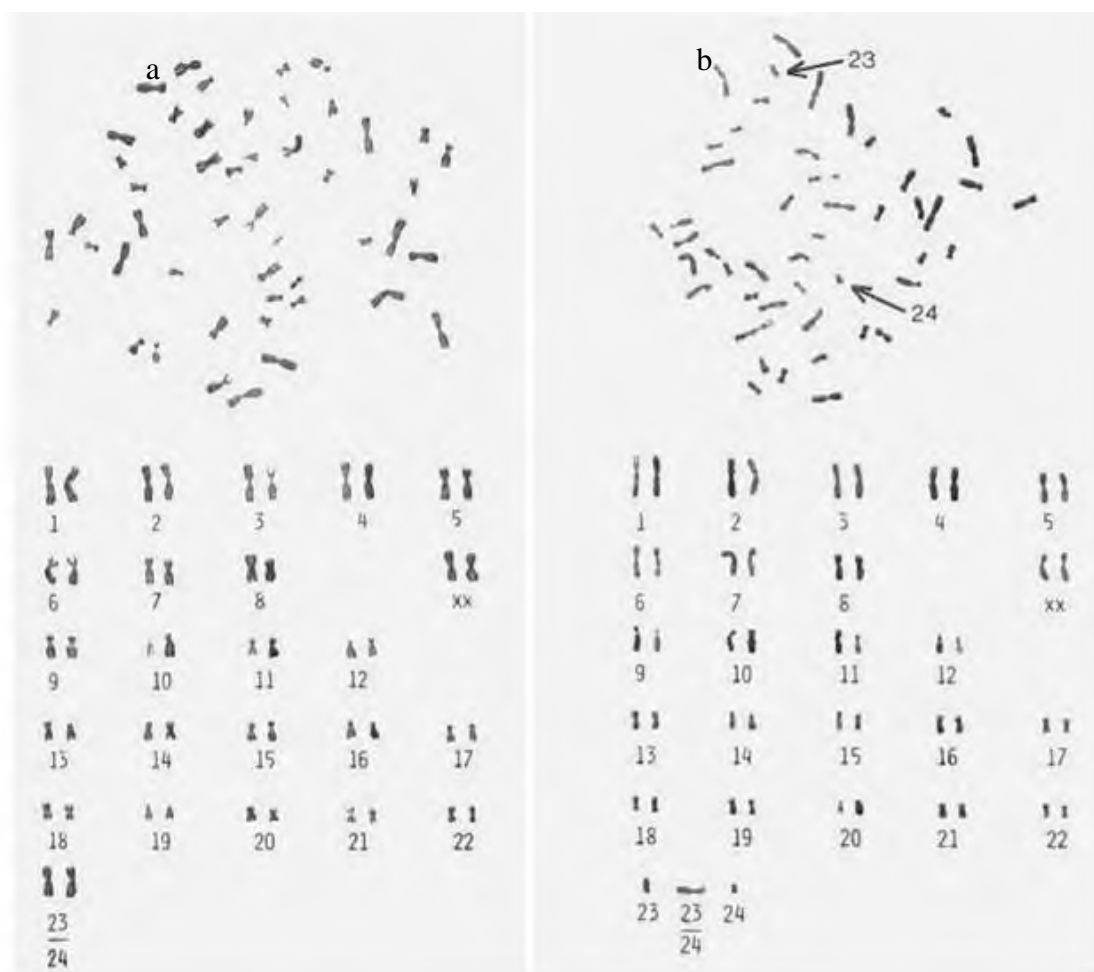
chromosomów akrocentrycznych. Innej klasyfikacji chromosomów dokonał Świtoński (1981), który na podstawie swoich badań uszeregował chromosomy w 3 grupy w zależności od położenia centromeru, tym samym otrzymał: 14 par metacentrycznych chromosomów, 8 par zawierających chromosomy submetacentryczne oraz 2 pary akrocentryków. Obydwaj badacze zgodnie określili chromosom X jako typu metacentrycznego, a chromosom Y jako typ akrocentryczny, będący zarazem najmniejszym w całej puli chromosomów lisa polarnego. Rozkład kariotypu przedstawia się następująco (Ryc. 2): w trzech pierwszych liniach znajdują się chromosomy metacentryczne, w czwartej zawarte są submetacentryki, natomiast na piątą linię układają się po dwie pary submetacentryczne, akrocentryczne oraz para chromosomów płci (Świtoński 1981).

Alopex lagopus (Arctic Fox)



Ryc. 2. Kariogram lisa polarnego, 2n=50, XY. Barwienie GTG (O'Brien i wsp. 2006).

Zjawisko fuzji centrycznych zidentyfikowano u osobników z polimorficzną liczbą chromosomów wynoszącą $2n=49$ lub $2n=48$. Fuzje te zachodzą pomiędzy chromosomami akrocentrycznymi, czyli należącymi do dwóch ostatnich par autosomów, między parą 23 a 24 (Christensen i Pedersen 1982). W wyniku fuzji powstaje większy chromosom metacentryczny. W zależności od liczby występujących fuzji centrycznych u danego osobnika wyróżnia się homozygoty o $2n=48$, nie posiadające chromosomów akrocentrycznych oraz heterozygoty o $2n=49$ posiadające po jednym chromosomie z par 23 i 24 (Ryc. 3). U osobników z normalnym kariotypem, $2n=50$, nie obserwuje się fuzji centrycznych (Møller i wsp. 1985).



Ryc. 3. Polimorfizm liczby chromosomów w kariotypie lisa polarnego (*Alopex lagopus*): a) osobnik posiadający $2n=48$ chromosomów, b) heterozygota z $2n=49$ chromosomów. Strzałkami zaznaczono chromosomy akrocentryczne należące do pary 23 i 24 (Christensen i Pedersen 1982, za Gustavsson 1979).

W kariotypie lisa polarnego obserwuje się również zmienność konstytutywnej heterochromatyny (Makinen i Gustavsson 1982). Heteromorfizm heterochromatyny występuje na 10 parach chromosomów (pary od 13 do 22). Stwierdzono, że każdy z tych autosomów posiada jedno ramię w całości zbudowane z konstytutywnej heterochromatyny. Zjawisko to obserwowano w ramieniu krótkim p. Dodatkowo wykazano, że nie wywołuje ono żadnej zmienności fenotypowej osobników, ani zaburzeń w rozrodzie tych zwierząt (Makinen i wsp. 1981, Świtoński i Gustavsson 1991).

Alopex lagopus jest gatunkiem z rodziny psowatych, u którego zidentyfikowano najwyższą liczbę obszarów jąderkotwórczych na chromosomach. W kariotypie lisa występuje sześć par chromosomów z NOR, które zlokalizowane są w terminalnych odcinkach krótkich ramion chromosomów par 13, 15, 17, 18, 20 oraz 22 (Pieńkowska i Świtoński 1998).

1.6.2. Lis polarny jako gatunek modelowy w badaniach

Lis polarny od wielu lat wzbudza zainteresowanie naukowców jako model badawczy. Wiąże się to ze specyficznym trybem życia tych zwierząt, szerokim zasięgiem występowania i dużymi zdolnościami adaptacyjnymi do warunków środowiskowych. W ostatnich latach, w związku ze spadkiem liczebności stad na niektórych naturalnych terenach występowania, prowadzone są badania nad ochroną gatunku, ale również nad jego rolą w ekosystemach Arktyki (Berteaux i wsp. 2017). W analizach dotyczących zasięgu występowania naturalnych populacji prowadzone są również prace dotyczące charakterystyki genetycznej populacji lisów z wybranych terenów (Ehrich i wsp. 2012). Lis polarny, zarówno jako udomowiony oraz dziko żyjący gatunek psowatych, uznawany jest jako model w badaniach genotoksycznego wpływu zanieczyszczeń środowiska na terenie Arktyki, ze względu na szeroki zasięg występowania. Dodatkowo lis polarny stanowił model w badaniach skażenia wód Arktyki metalami ciężkimi, w szczególności rtęci, oraz ich akumulacji w organizmach morskich, które stanowią pokarm dla lisów (Harley i wsp. 2016).

Bocharova i wsp. (2013) przeprowadzili badania nad związkiem miejsca zerowania lisów polarnych, a stanem zdrowotnym populacji żyjących na wyspach na Morzu Beringa. Przebadali oni lisy pod kątem obecności patogenów oraz stężenia metali ciężkich (ze szczególnym uwzględnieniem rtęci) w organizmie. Wykazali, że

duże znaczenie ma środowisko żerowania w przypadku diety opartej na kręgowcach morskich, gdyż zwiększa ono ryzyko narażenia na absorpcję metali ciężkich co wpływa na stan zdrowia i stabilność osobników, a tym samym na liczebność populacji (Bocharova i wsp. 2013).

Kolejne badania dotyczące możliwości absorpcji szkodliwych związków, takich jak trwałe zanieczyszczenia organiczne, ze spożywanym pokarmem pochodzenia morskiego przez organizmy tego gatunku psowatych badali Fuglei i wsp. (2007). Andersen i wsp. (2015) w swoich badaniach określili stężenia polichlorowanych bifenyli i pestycydów chloroorganicznych w tkankach i narządach lisów. Wysoki poziom tych szkodliwych substancji obserwowany w organizmie lisów polarnych, stanowił też punkt odniesienia dla szkodliwości tych związków dla innych zwierząt arktycznych, jak foki czy renifery (Andersen i wsp. 2015). U lisów polarnych, ze względu na wyższą pozycję w łańcuchu pokarmowym, obserwuje się większe stężenie związków szkodliwych w tkankach w wyniku bioakumulacji tych związków w łańcuchu troficznym, co wskazuje na poziom zanieczyszczenia środowiska (Fuglei i wsp. 2007). Inne badania dotyczące szkodliwego wpływu zanieczyszczeń chloroorganicznych na organizm lisa polarnego badał Sonne i wsp. (2009). Sprawdzano biomechaniczne właściwości tkanki kostnej i gęstość kości po ekspozycji na związki szkodliwe, a pochodzące z karmy.

Lis polarny, stanowił model w badaniach nad strawnością pokarmu. Gugolek i wsp. (2010) sprawdzali czy lis może być skarmiany suchym pokarmem zawierających zwilżane wodą mączki zwierzęce oraz jaka jest strawność takiego pokarmu. Mimo podobnej wartości pokarmowej, w przypadku lisów dieta standardowa wykazywała lepszą strawność pokarmu.

Na podstawie powyżej zacytowanych doniesień i informacji o wykorzystaniu lisa jako modelu badawczego można stwierdzić, że lis polarny jest dobrym modelem w badaniach nad toksycznością, w tym przypadku nanocząstek srebra i ich wpływu na stabilność chromatyny w komórkach ssaków. Wiąże się to z faktem, że lis polarny był już wcześniej był wykorzystywany jako model badawczy do oceny genotoksyczności zanieczyszczeń środowiska. Istotnym aspektem w wyborze tego gatunku jest świadomość, że lisy polarne niebieskie, jako zwierzęta hodowlane mają zróżnicowaną dietę, a ich wysoka pozycja w łańcuchu troficznym może być związana

z nieplanowanym spożyciem nagromadzonych i zabsorbowanych w ogniwach łańcucha związków szkodliwych.

Zwiększające się każdego roku zapotrzebowanie i wykorzystanie AgNPs oraz ich zmienne właściwości wykazujące genotoksyczny charakter powodują, że poszukiwane są alternatywne metody ich otrzymywania. Dlatego w niniejszej pracy podjęto się oceny właściwości AgNPs produkowanych metodą fizyczną – HVAD. Na podstawie przeglądu dostępnej literatury oraz badań pilotażowych, sformułowano cztery hipotezy badawcze:

- Hipoteza 1: Nanocząstki srebra produkowane metodą fizyczną, wysokonapięciowych wyładowań w łuku elektrycznym, działają genotoksycznie na komórki somatyczne ssaków.
- Hipoteza 2: Niskie stężenia nanocząstek srebra, w zakresie od 5 do 20 $\mu\text{g/ml}$, powodują zmiany integralności DNA w komórkach ssaków.
- Hipoteza 3: Dłuższy czas ekspozycji komórek na nanocząstki srebra aktywuje mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA.
- Hipoteza 4: Stabilizacja struktury nanocząstek srebra zwiększa liczbę indukowanych uszkodzeń DNA.

2. Cel pracy

Celem badań była ocena struktury chromatyny oraz integralności DNA jądrowego w komórkach somatycznych dwóch wybranych przedstawicieli rodziny *Canidae*: psa domowego (*Canis familiaris*) i lisa polarnego niebieskiego (*Alopex lagopus*), poddanych działaniu nanocząstek srebra, produkowanych metodą fizyczną HVAD, w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem cytogenetycznych testów diagnostycznych: Fragile site, mikrojądrowego w wariacie CBMN i kometowego.

Dodatkowym celem była próba określenia genotoksycznego profilu nanocząstek srebra w zależności od zastosowanej dawki oraz czasu ekspozycji komórek.

3. Materiały i metody

3.1. Materiał do badań

3.1.1. Nanocząstki srebra

W badaniach wykorzystano nanocząstki srebra, wyprodukowane metodą fizyczną – wysokonapięciowych wyładowań w łuku elektrycznym (HVAD) (Kasprowicz i wsp. 2010, Kasprowicz i wsp. 2016). Synteza roztworów nanocząstek odbywała się w Katedrze Gleboznawstwa i Agrofizyki Wydziału Rolniczo-Ekonomicznego Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie. Dwie okrągłe elektrody o średnicach odpowiednio 10 i 5 mm wykonane ze srebra o czystości 99,9% umieszczono w reaktorze o pojemności około 10 ml i zanurzono w wodzie dwukrotnie destylowanej (przewodnictwo właściwe – $(6-10) \cdot 10^{-6}$ Si/m, OK-102/1 conductivity meter, Radelkis, Budapeszt, Węgry) lub 3,3 μ M wodnym roztworze trój-cytrynianu sodu (TSC) (POCH, Polska). Pomiędzy elektrodami przyłożono napięcie elektryczne 20 kV. Odległość pomiędzy elektrodami wynosiła $2,5 \cdot 10^{-4}$ m. Za pomocą techniki dynamicznego rozpraszania światła rozmiar nanocząstek ustalono na 22 nm w wodzie oraz około 38 nm w TSC (Nano ZS Zetasizer, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK). Zmierzone również potencjał Zeta koloidów, który wynosił -22 mV dla wody oraz -19 mV dla TSC (Nano ZS Zetasizer, Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK).

3.1.2. Materiał biologiczny

Materiał do badań stanowiła pełna krew obwodowa pobrana z żyły odgłowej podramienia (*vena cephalica antebrachi*). Pełną krew obwodową pobrano od dwóch gatunków psowatych: psa domowego (*Canis familiaris*) oraz lisa polarnego (*Alopex lagopus*). Dla każdego z gatunków grupa doświadczalna stanowiła 10 osobników. Od każdego osobnika podczas badań weterynaryjnych pobierano około 12 ml pełnej krwi do jałowych probówek Vacumed (FL Medical, Włochy) z heparyną litową. Próbki krwi od psów domowych – mieszańców, pobierano w lecznicy weterynaryjnej Salamandra w Krakowie przez lekarza weterynarii i za zgodą opiekunów zwierząt. Psy były w wieku od 3 do 6 lat. Próbki krwi od lisów polarnych niebieskich pobierano na fermie w Dębicy i Opolu za zgodą ich właścicieli podczas rutynowych badań kontrolnych prowadzonych przez lekarza weterynarii. Wszystkie zwierzęta były w wieku 12 miesięcy.

3.2. Metody badawcze

3.2.1. Ekspozycja na roztwory koloidalne srebra

Pełną krew obwodową poddano ekspozycji na działanie trzech roztworów koloidalnych srebra. Dwa roztwory stanowiły nanocząstki srebra otrzymane na wodzie destylowanej (AgNP) oraz w roztworze 3,3 μM trójcytrynianu sodu (AgNP+C). Trzeci z badanych roztworów stanowił azotan (V) srebra (AgNO_3 , Sigma Aldrich, Niemcy), będący wskaźnikiem i odnośnikiem dla toksyczności nanocząstek srebra. Dla każdego z badanych roztworów przygotowano trzy stężenia 5, 10 i 20 $\mu\text{g/ml}$. Ekspozycję pełnej krwi obwodowej na działanie trzech roztworów srebra w trzech badanych stężeniach prowadzono przez 3h i 24h w temperaturze pokojowej w sterylnych probówkach. Próbę odniesienia dla badanych roztworów stanowiły próby kontrolne, niepoddane działaniu żadnych roztworów srebra. W wyniku takiego układu doświadczalnego otrzymywano 19 próbek doświadczalnych dla każdego osobnika w każdym wykorzystywanym teście cytogenetycznym (Fragile site, CBMN, kometowym).

3.2.2. Ocena żywotności komórek – barwienie błękitem trypanu 0,4%

Ocenie żywotności poddawano komórki pełnej krwi obwodowej przed rozpoczęciem ekspozycji na badane roztwory srebra oraz bezpośrednio po jej zakończeniu. Dla prób kontrolnych ocena żywotności przeprowadzana była odpowiednio po upływie 3 i 24 godzin odpowiadających ekspozycji. Na szkiełku podstawowym zmieszano 10 μl zawiesiny próbki doświadczalnej z 10 μl 0,4% błękitu trypanu w PBS (Sigma Aldrich, Niemcy) i inkubowano przez 2 minuty. Następnie całość, 20 μl przeniesiono na ogrzaną komorę Bürkera i przykryto szkiełkiem nakrywkowym. Dla każdej próbki zliczano komórki żywe (niewybarwione) i martwe (wybarwione na niebiesko) pod mikroskopem świetlnym CARL ZEISS JENA - JENAVAL (CARL ZEISS, Niemcy) pod powiększeniem 400x w trzech dużych kwadratach siatki komory Bürkera przy pomocy liczydła hematologicznego. Żywotność komórek wyliczano przez określenie procentowej zawartości komórek żywych we wszystkich komórkach zliczonych w trzech dużych kwadratach komory.

3.2.3. Test Fragile site

Po zakończeniu ekspozycji odpowiednio 3 lub 24h, próbki pełnej krwi w objętości po 0,2 ml rozpipetowano do probówek hodowlanych (FL Medical, Włochy) o objętości 15 ml i zawieszono w 2,5 ml gotowego podłoża hodowlanego Lympho Grow (Cytogen, Niemcy). Hodowlę *in vitro* prowadzono według Arakaki i Sparkes (1963) w warunkach 37,5°C przez 72h przy stałej wilgotności w inkubatorze do hodowli komórkowych (Heal Force HF 90, Chiny). Na 6 godzin przed zakończeniem hodowli dodano wskaźnik do testu Fragile site – 5-bromo-2'-deoxyurydynę (BrdU, Sigma Aldrich, Niemcy) po 25 µl/hodowlę (Wójcik i Szostek 2019). Następnie w 70 godzinie hodowli, w celu zatrzymania podziałów komórkowych, dodano kolchicynę (Sigma Aldrich, Niemcy) po 75 µl/hodowlę. Po 72h hodowle komórkowe przeniesiono do probówek wirówkowych (FL Medical, Włochy) i wirowano przez 10 min przy 900 obrotach/minutę (wirówka MPW – 350 High Speed Brushless Centrifuge, MPW, Polska). Następnie odciągnięto supernatant, a próbki poddano hypotonizacji przez dodanie kroplami 5 ml 0,075M chlorku potasu (POCH, Polska) i inkubacji przez 20 min w temperaturze 37,5°C. Po tym czasie próbki wirowano przez 10 min przy 900 obrotach/minutę. Odciągnięto supernatant i dodano kroplami 3 ml zamrożonego utrwalacza Carnoy'a (mieszanina 3:1 metanolu i kwasu octowego, Sigma Aldrich, Niemcy) mieszając na wortexie. Próbki wirowano przy tych samych parametrach, a proces utrwalania powtórzono jeszcze trzy razy. Uzyskane zawiesiny przechowywano w temperaturze -20°C do czasu ich wykorzystania.

Na odłuszczone szkiełka podstawowe nakropiono po 20 µl utrwalonej zawiesiny komórkowej. Preparaty wysuszono i postarzano przez 1 tydzień w temperaturze 37,5°C. Następnie preparaty barwiono techniką prążków G (GTG) według metodyki Wang i Fedoroff (1972). Przygotowano na świeżo 0,1% roztwór trypsyny w PBS (Sigma Aldrich, Niemcy) i ogrzano w łaźni wodnej (BWT-U Universal stirred water bath, Biosan, Łotwa) do temperatury 37°C. Preparaty wytrawiano trypsyną przez 15 sekund, a następnie płukano w roztworze PBS oraz w wodzie destylowanej. Wysuszony preparat wybarwiano 5% roztworem Giemsy (Sigma Aldrich, Niemcy) w buforze Sörensen (mieszanina Na₂HPO₄ oraz KH₂PO₄, pH=6,8, w stosunku (1:1), Sigma Aldrich, Niemcy) przez 5 min. Następnie preparaty wypłukano w wodzie destylowanej, wysuszono i przechowywano w pudełku w temperaturze pokojowej do czasu wykonania analizy mikroskopowej. Preparaty w powtórzeniu poddano również

barwieniu nie różnicowemu w 10% wodnym roztworze Giemsy (Sigma Aldrich, Niemcy) przez 25 minut.

Analizę mikroskopową w teście Fragile site prowadzono przy użyciu mikroskopu optycznego CARL ZEISS JENA – JENAVAL (CARL ZEISS, Niemcy) sprzężonym z kamerą Nikon DS-Fi1 (Nikon, Japonia) pod powiększeniem 400x. Dla każdej próbki doświadczalnej wykonano zdjęcia dobrze rozproszonych płytek metafazowych pod powiększeniem 1000x w programie NIS – Elements F.2.30 (Nikon, Japonia). Analizę uszkodzeń miejsc łamliwych prowadzono przez określenie średniej liczby miejsc łamliwych/komórkę przez analizę 15 płytek metafazowych/próbkę od każdego osobnika. W analizie uwzględniono również postać miejsc łamliwych obserwowaną na chromosomach, czy były to złamania chromatydy, pęknięcia/przerwy chromatydy lub urwane fragmenty chromatydy.

3.2.4. Izolacja limfocytów z pełnej krwi obwodowej do testu mikrojądrowego i kometowego

Do sterylnych stożkowodennych próbek (FL Medical, Włochy) naniesiono około 1,5 ml ogrzanego medium do izolacji Histopaque 1077 (Sigma Aldrich, Niemcy) i nawarstwiono 1 ml pełnej krwi z odpowiedniej próbki doświadczalnej. Zwirowano przez 30 min przy 1500 obrotach/minutę (wirówka MPW – 350 High Speed Brushless Centrifuge, MPW, Polska). W wyniku wirowania otrzymano wyraźną frakcję limfocytów i monocytów na granicy faz osocza i medium Histopaque 1077. Frakcję w całości pobrano przy użyciu pipety automatycznej (Eppendorf, Niemcy) i przeniesiono do próbek wirówkowych (FL Medical, Włochy) zawierających 3 ml świeżego ogrzanego PBS (Sigma Aldrich, Niemcy), a następnie dopełniono PBS do 5 ml i zworteksowano. Próbkę wirowano przez 10 min przy 1100 obrotach/minutę. Następnie odciągnięto supernatant około 3 ml i dwukrotnie powtórzono płukanie w PBS. Po ostatnim wirowaniu, odciągnięto supernatant pozostawiając około 0,5 ml izolatu do rozpipetowania na test MN i SCGE.

3.2.5. Test mikrojądrowy w wariancie z zablokowaniem cytokinezy CBMN

W celu przeprowadzenia hodowli komórkowej na test mikrojądrowy do stożkowodennych sterylnych probówek hodowlanych (FL Medical, Włochy) o objętości 15 ml naniesiono 0,2 ml izolatu limfocytów i monocytów zawieszonych w PBS (Sigma Aldrich, Niemcy) oraz 2,5 ml gotowego podłoża hodowlanego Lympho Grow (Cytogen, Niemcy). Hodowlę *in vitro* prowadzono w warunkach 37,5°C przez 72h przy stałej wilgotności w inkubatorze do hodowli komórkowych (Heal Force HF 90, Chiny). W 44 godzinie hodowli w celu zablokowania cytokinezy i uzyskania komórek dwujądrzastych dodano cytochalazynę B (Sigma Aldrich, Niemcy) w stężeniu 5 µg/ml hodowli. Po zakończeniu hodowli w 72h, komórki przeniesiono do probówek wirówkowych (FL Medical, Włochy) i odwirowano przez 8 minut przy 1000 obrotach/minutę (wirówka MPW – 350 High Speed Brushless Centrifuge, MPW, Polska). Następnie odciągnięto supernatant i komórki utrwalano przez dodanie kroplami 4 ml zmrożonego utrwalacza Carnoy'a (mieszanina metanolu i kwasu octowego w stosunku 3:1, Sigma Aldrich, Niemcy). Próbki zwirowano przy tych samych parametrach, a utrwalanie powtórzono jeszcze dwa razy. Po zwirowaniu ostatni raz z utrwalonych próbek odciągnięto supernatant do objętości około 0,2 ml.

Na oczyszczone szkiełko podstawowe nakropiono 2-3 kropli zawiesiny komórkowej i wysuszono. Następnie preparaty barwiono w 25% roztworze Giemsy (Sigma Aldrich, Niemcy) w buforze Sørensen (mieszanina Na₂HPO₄ oraz KH₂PO₄, pH=6,8, w stosunku (1:1), Sigma Aldrich, Niemcy) przez 35 minut. Po zakończeniu barwienia preparaty przepłukano pod bieżącą wodą, a później w wodzie destylowanej i wysuszono. Barwienie i identyfikację uszkodzeń w teście MN wykonano według Słonina i Gasińska (1997).

Analizę mikroskopową w teście mikrojądrowym prowadzono przy użyciu mikroskopu optycznego CARL ZEISS JENA – JENAVAL (CARL ZEISS, Niemcy) sprzężonym z kamerą Nikon DS-Fi1 (Nikon, Japonia) pod powiększeniem 400x. Na każdą próbkę doświadczalną/osobnika oceniano 500 komórek dwujądrzastych (BNC) spełniających kryteria testu według Fenech (2000), w których oceniano liczbę komórek dwujądrzastych z jednym mikrojądrem (BNC+1MN), z dwoma mikrojądrami (BNC+2MN) oraz inne nieprawidłowości, jak: mostki nukleoplazmatyczne (NPB), pąki jądrowe (NBUD) czy komórki wielojądrzaste (MNC). Komórki zliczano manualnie przy pomocy liczydła hematologicznego.

3.2.6. Test kometowy (SCGE)

Test kometowy w warunkach alkalicznych przeprowadzono zgodnie z metodyką według Singh i wsp. (1988 z późniejszymi modyfikacjami). 20 μ l izolatu frakcji limfocytów i monocytów zmieszano w eppendorfie (Eppendorf, Niemcy) z 75 μ l 1% agarozy o niskiej topliwości LMP w PBS (Sigma Aldrich, Niemcy) i w całości naniesiono na szkiełko podstawowe opłaszczone 1% wodną agarozą o normalnej topliwości NMP (Sigma Aldrich, Niemcy). Całość przykryto szkiełkiem nakrywkowym i wstawiono na 15 min do lodówki w celu zestalenia agarozy. Następnie ściągnięto szkiełko nakrywkowe i naniesiono kolejną warstwę agarozy LMP (75 μ l), przykryto szkiełkiem nakrywkowym i zestalano w lodówce. Po ponownej inkubacji ściągnięto szkiełko nakrywkowe, a preparaty umieszczono w pudełku i zalano buforem lizującym. Roboczy bufor lizujący zawierał bufor podstawowy do lizy (2,5 M NaCl, NaOH, 0,1M EDTANa₂, 10 mM Tris, 1% Sodium Lauryl Sarcosinate - Sigma Aldrich, Niemcy) oraz dodane na świeżo 1% Triton X-100 i 10% DMSO (Sigma Aldrich, Niemcy), schłodzony przez 1 godzinę. Etap lizy prowadzono przez 1h w temperaturze + 4°C bez dostępu światła. Następnie preparaty umieszczono w tanku aparatu do elektroforezy poziomej (PowerPac™ Basic, Bio-Rad, USA) i inkubowano przez 20 min w schłodzonym buforze do elektroforezy zawierającym 30mM NaOH, 2mM EDTANa₂ (Sigma Aldrich, Niemcy) oraz wodę destylowaną, pH=12,5. Elektroforezę prowadzono przez 20 min przy napięciu 0,6V/cm. Następnie przeprowadzono trzykrotnie etap neutralizacji przy użyciu 0,4M roztworu Tris (Sigma Aldrich, Niemcy). Do analizy preparaty barwiono bromkiem etydy (Sigma Aldrich, Niemcy) w stężeniu 20 μ g/ml. Analizę mikroskopową prowadzono przy użyciu mikroskopu z epifluorescencją ZEISS Axio Imager 2 (CARL ZEISS, Niemcy). Dla każdej próbki/osobnika wykonano zdjęcia 50 losowych pól widzenia pod powiększeniem 400x. Zmiany integralności DNA oceniano przez pomiar 50 komórek/próbkę/osobnika w programie CaspLab (CaspLab, Polska). W celu określenia uszkodzenia DNA analizowano procentową zawartość DNA w ogonie komety oraz moment ogonowy (TM). Jest to parametr złożony, wyliczany, jako iloczyn procentowej zawartości DNA w ogonie komety i długości ogona komety.

3.3. Analiza statystyczna

Wszystkie obliczenia wykonano za pomocą pakietu statystycznego SAS (2014). Badania przeprowadzono oddzielnie dla obu gatunków zwierząt. Za pomocą testu Shapiro-Wilka sprawdzono czy analizowane cechy posiadają rozkład normalny.

Ze względu na brak rozkładu normalnego analizowanych cech wykonano testy nieparametryczne. Za pomocą testu Kruskala-Walisa zbadano wpływ roztworu (kontrola, AgNP, AgNP+C, AgNO₃), a następnie zastosowanej dawki (5/10/20 µg/ml) i czasu ekspozycji (3 i 24h) w obrębie roztworów. Do porównań wielokrotnych zastosowano nieparametryczny test Dwassa, Steela, Critchlow-Flignera.

Wszystkie wartości prawdopodobieństwa mniejsze od 0,01 uznano za wysoce istotne statystycznie.

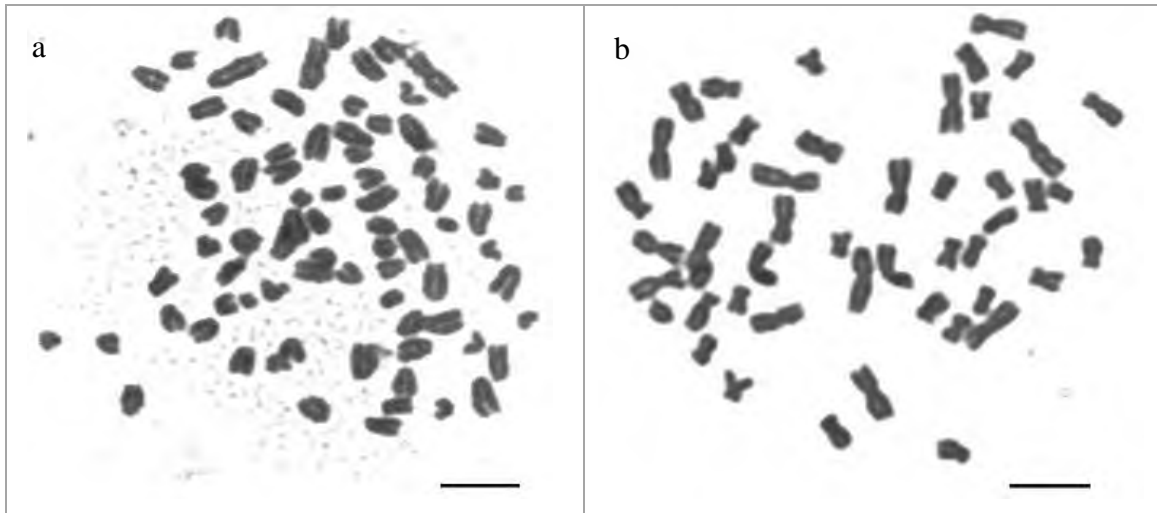
4. Wyniki

Pierwszym etapem analiz była ocena prawidłowości kariotypu badanych zwierząt. W tym celu przeprowadzono kontrolę diploidalnej liczby oraz prawidłowej struktury chromosomów w obrębie kariotypów osobników z grup doświadczalnych obu gatunków, to jest psa domowego i lisa polarnego.

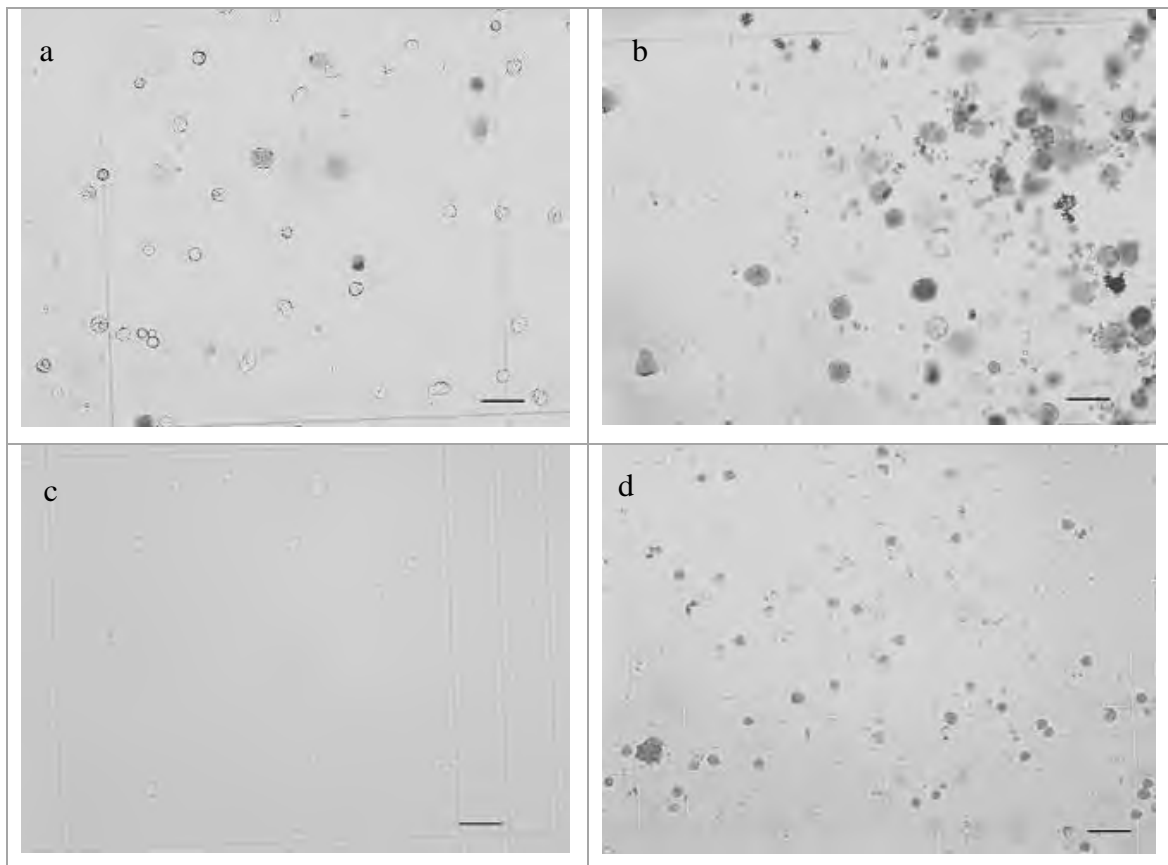
Analiza diploidalnej liczby chromosomów badanych zwierząt wykazała prawidłowość w budowie kariotypu (Fot. 1.). W przypadku psa domowego, w próbkach pochodzących od wszystkich osobników potwierdzono kariotyp równy $2n=78$ chromosomów (Fot. 1a). U osobników lisa polarnego stwierdzono dwie formy kariotypu, heterozygotyczną $2n=49$ chromosomów u 3 osobników (30%) (Fot.1b) oraz homozygotyczną z translokacją robertsonowską $2n=48$ chromosomów u 7 osobników (70%). Nie stwierdzono obecności osobnika z kariotypem homozygotycznym bez translokacji $2n=50$ chromosomów.

4.1. Ocena żywotności komórek

W przeprowadzonej ocenie żywotności komórki zliczano w komorze Bürkera, a następnie na podstawie wyliczonego stosunku komórek żywych do martwych określano ich stopień przeżywalności. W obrazie mikroskopowym komórki żywe były nie wybarwione, natomiast komórki martwe, charakteryzowały się niebieskim zabarwieniem, wynikającym ze zmiany integralności błony komórkowej i tym samym interkalacji barwnika w ich strukturę. Przeżywalność komórek wyrażono w procentach żywych komórek wyliczonych w poszczególnych grupach doświadczalnych. Obraz spod komory Bürkera z ocenianymi komórkami dla obu badanych gatunków przedstawia Fotografia 2 a – d.



Fot. 1. Płytki metafazowe: a) z prawidłowym kariotypem psa domowego $2n=78,XY$; b) wariant kariotypu lisa polarnego $2n=49,XX$. Powiększenie 1000x, skala 10 μm .



Fot. 2. Ocena żywotności komórek po barwieniu błękitem trypanu w komorze Bürkera: a) limfocyty psa domowego z próbki kontrolnej po 3h; b) limfocyty psa domowego po 24h ekspozycji na $\text{AgNP } 20 \mu\text{g/ml}$; c) limfocyty lisa polarnego z próbki kontrolnej po 3h; d) limfocyty lisa polarnego po ekspozycji 3h na $\text{AgNO}_3 \mu\text{g/ml}$. Zdjęcia przedstawione w skali szarości prezentują komórki żywe, jako jasne nie wybarwione natomiast komórki martwe są widoczne na fotografiach jako szare. Powiększenie 250x (a-c) i 125x (d). Skala 10 μm .

Analizę żywotności limfocytów oceniano na podstawie wartości procentowej liczby komórek żywych w danej próbie doświadczalnej. Ocenę prowadzono dla prób kontrolnych, z uwzględnieniem poszczególnych okresów czasowych (0h, 3h i 24h) – które odpowiadały okresom ekspozycji komórek na związki srebra. W Tabeli 1 przedstawiono średnią procentową liczbę komórek żywych dla prób kontrolnych pochodzących od psa domowego i lisa polarnego.

Tabela 1. Średnia procentowa przeżywalność komórek w grupach kontrolnych u badanych gatunków zwierząt

Kontrola	Pies domowy	Lis polarny
0h	95,47±2,48 ^{ab}	85,88±5,35
3h	80,66±5,67 ^a	84,02±7,23
24h	70,06±7,46 ^b	67,01±10,75

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w %

ab – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Średnia żywotność komórek pochodzących od psa domowego wahała się od 70,06 do 95,47%. Analiza żywotności komórek w grupie kontrolnej pomiędzy czasem izolacji (0h), a czasem planowanej ekspozycji w przypadku psa domowego wykazała wysoce istotne różnice ($p < 0,01$) między grupami kontrolnymi 0h a 3h oraz 0h a 24h. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic w żywotności komórek między grupą kontrolną 3h a grupą kontrolną 24h u psa domowego.

Dla lisa polarnego w próbach kontrolnych średnia procentowa żywotność komórek kształtowała się na poziomie 67 – 85%. W przypadku lisa polarnego nie stwierdzono wysoce istotnych różnic pomiędzy grupami kontrolnymi w zależności od czasu – izolacji i planowanej ekspozycji.

Kolejnym punktem analizy żywotności była ocena wpływu badanych roztworów koloidalnych srebra na limfocyty krwi obwodowej. Wyniki tej analizy dla obu gatunków przedstawiono poniżej w Tabeli 2.

Tabela 2. Żywotność komórek po ekspozycji na badane roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych psowatych

Grupa doświadczalna	Pies domowy	Lis polarny
Kontrola	82,06±11,93 ^{abc}	78,97±11,60 ^{ABC}
AgNP	35,67±11,36 ^{ad}	31,22±10,29 ^A
AgNP+C	37,38±11,81 ^{be}	32,49±12,11 ^B
AgNO ₃	22,91±8,36 ^{cde}	25,99±12,52 ^C

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w %

abcde/ABC – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Żywotność komórek po narażeniu na działanie doświadczalnych roztworów koloidalnych srebra kształtowała się w zakresie 22,91 – 37,38% w odniesieniu do 82,06% żywych komórek w grupie kontrolnej. W przypadku psa domowego stwierdzono wysoce istotne różnice w żywotności komórek między próbą kontrolną, a każdym z badanych roztworów srebra. Dodatkowo, wysoce istotne różnice zaobserwowano pomiędzy wybranymi roztworami: AgNP a AgNO₃ oraz dla AgNP+C i AgNO₃ ($p < 0,01$).

Dla lisa polarnego stwierdzono podobną zależność. Żywotność komórek w badanych roztworach koloidalnych srebra w porównaniu do grupy kontrolnej różniła się wysoce istotnie ($p < 0,01$) i kształtowała się na poziomie 25,99 – 32,49%.

Zbadano wpływ dawki: 5/10/20 µg/ml badanych roztworów srebra AgNP, AgNP+C i AgNO₃ na żywotność limfocytów krwi obwodowej. Wyniki tych analiz dla obu gatunków przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Żywotność komórek w zależności od dawki roztworów srebra u badanych psowatych

Roztwór /dawka		Pies domowy	Lis polarny
AgNP	5 µg/ml	29,77±10,44	30,35±12,87
	10 µg/ml	33,12±11,20	32,91±6,79
	20 µg/ml	35,12±12,52	30,40±10,85
AgNP+C	5 µg/ml	33,75±13,01	32,68±13,49
	10 µg/ml	39,54±11,69	30,94±8,59
	20 µg/ml	38,84±10,59	33,86±14,32
AgNO ₃	5 µg/ml	25,40±7,14	25,97±13,48
	10 µg/ml	24,00±9,45	25,21±10,56
	20 µg/ml	19,33±7,64	26,80±14,13

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w %

Żywotność limfocytów psa domowego po działaniu roztworów koloidalnych srebra wynosiła od 19,33 do 39,84%. Najniższą średnią żywotność komórek odnotowano po działaniu AgNO₃. Z kolei, najwyższym odsetkiem żywych komórek charakteryzowały się próbki po działaniu AgNP+C.

W przypadku lisa polarnego stwierdzono żywotność komórek na poziomie 25,21 do 33,86%. Najniższą żywotność komórek obserwowano po działaniu AgNO₃. Nie wykazano wysoce istotnych różnic średniej żywotności komórek pomiędzy badanymi stężeniami roztworów koloidalnych srebra: AgNP, AgNP+C, AgNO₃ zarówno dla psa domowego, jak i dla lisa polarnego.

W kolejnej części analizy sprawdzono wpływ czasu ekspozycji komórek (3h i 24h) i działających na nie roztworów srebra na poziom żywotności komórek. Wyniki zebrane dla badanych gatunków przedstawiono w Tabeli 4.

Tabela 4. Żywotność komórek w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych

Roztwór /czas ekspozycji		Pies domowy	Lis polarny
AgNP	3h	34,00±12,18	32,75±12,27
	24h	31,35±10,61	29,69±7,86
AgNP+C	3h	36,58±10,30	36,45±11,34
	24h	38,17±13,38	28,53±11,34
AgNO ₃	3h	24,67±10,60	30,60±14,79
	24h	21,15±4,95	31,38±7,60

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w %

Średnia żywotność limfocytów pochodzących od psa domowego wahała się od 21,15 do 38,17%, a dla limfocytów pochodzących od lisa polarnego od 28,53 do 36,45%. Nie wykazano wysoce istotnych różnic w żywotności komórek w zależności od czasu ekspozycji – 3h i 24h – dla badanych roztworów srebra zarówno dla psa domowego, jak i dla lisa polarnego.

Szczegółowe dane dotyczące żywotności komórek poddanych ekspozycji na nanocząstki srebra (AgNP, AgNP+C) i roztworu porównawczego AgNO₃ przez 3h i 24h oraz badane warianty stężeń tych roztworów dla obu gatunków psowatych przedstawiono w Tabeli 5.

Tabela 5. Żywotność komórek w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji

Wpływ czasu	dawka	Pies domowy			Lis polarny		
		5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
AgNP	3h	33,63±13,57	34,09±11,79	34,26±13,08	30,38±17,15	34,31±6,95	33,56±12,21
	24h	25,90±4,09	32,16±11,44	35,98±12,93	30,33±8,06	31,52±6,85	27,23±9,10
AgNP+C	3h	31,86±8,35	36,71±11,27	41,17±10,30	32,10±13,73	35,25±8,07	42,02±10,71
	24h	35,63±16,99	42,37±12,26	36,51±11,13	33,27±14,32	26,63±7,17	25,70±12,93
AgNO ₃	3h	26,10±9,95	27,58±12,45	20,32±9,53	29,00±17,04	28,21±12,74	34,60±15,35
	24h	24,68±3,21	20,42±3,71	18,33±5,76	22,93±8,32	22,20±7,64	18,99±7,40

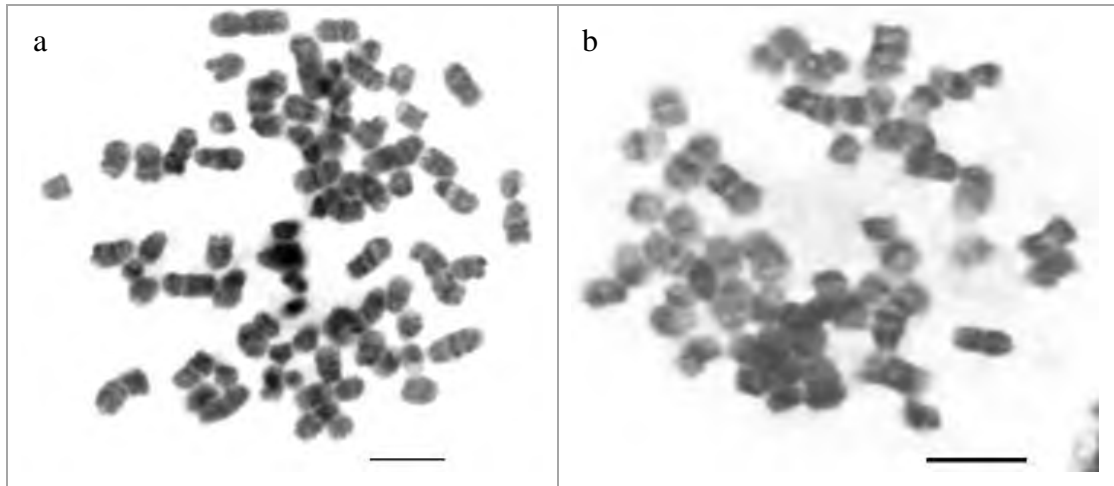
średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w %

Żywotność komórek psa domowego w poszczególnych wariantach doświadczalnych, z uwzględnieniem roztworów srebra, dawki i czasu ekspozycji, mieściła się na poziomie od 18,33 do 42,37%. Najniższe średnie wartości tego parametru obserwowano po działaniu AgNO_3 , a najwyższe po narażeniu na $\text{AgNP}+\text{C}$. Analiza żywotności komórek pobranych od psa domowego nie wykazała istotnych różnic w badanych wariantach dawki poszczególnych roztworów srebra w zależności od czasu ekspozycji (3h lub 24h). W przypadku roztworów AgNP , $\text{AgNP}+\text{C}$ i AgNO_3 nie obserwowano istotnych różnic między stężeniami zarówno po 3h ekspozycji komórek, jak i po 24h.

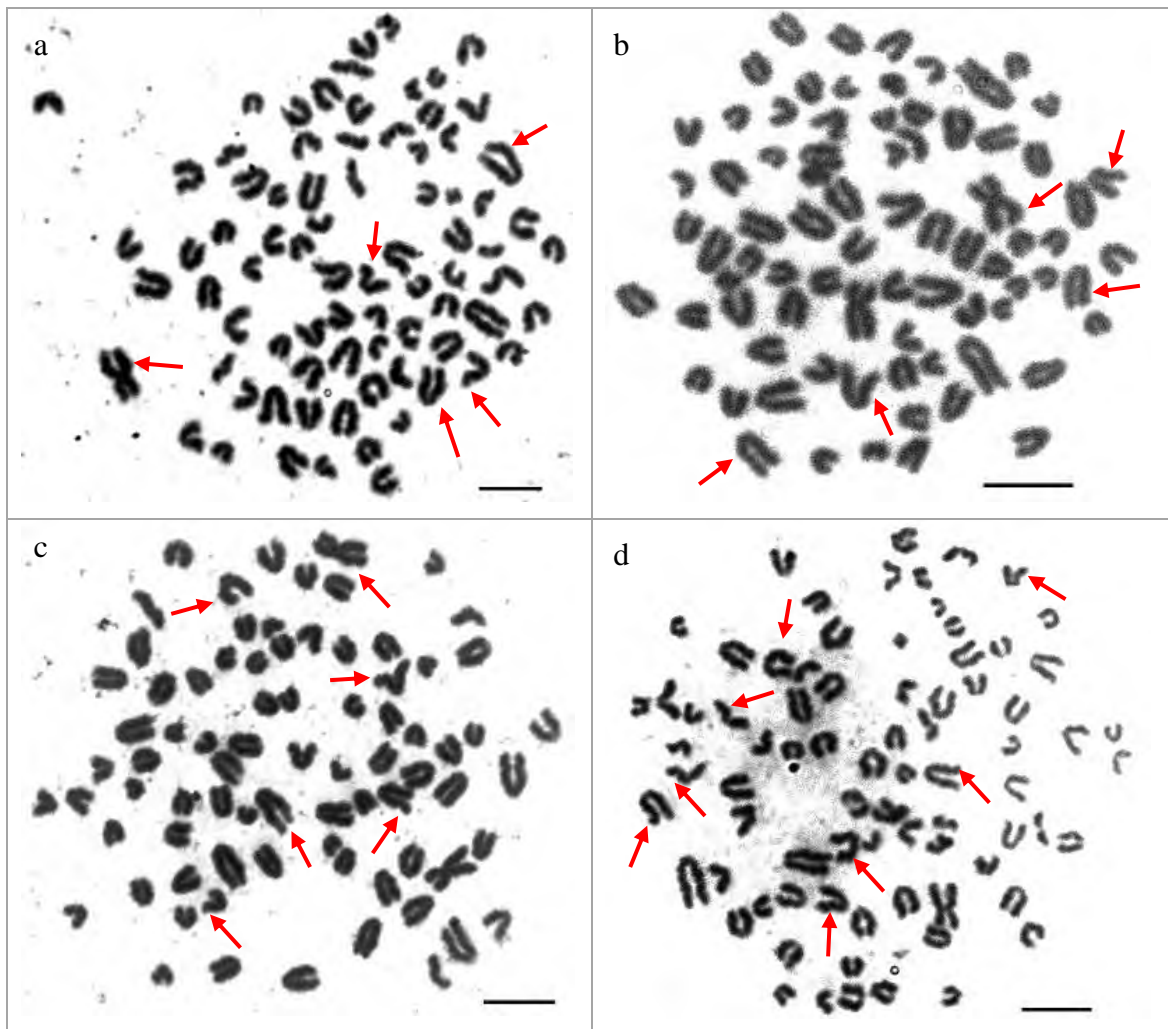
W materiale pobranym od lisa polarnego żywotność komórek w poszczególnych wariantach wahała się od 18,99 do 42,02%. Najwyższym odsetkiem żywych komórek cechowały się próby po działaniu $\text{AgNP}+\text{C}$, a najniższym po narażeniu na AgNO_3 . W przypadku lisa polarnego, na tym etapie analizy żywotności limfocytów nie stwierdzono wysoce istotnych różnic w procencie żywych komórek uwzględniając wpływ dawki, roztworu i czasu jego działania.

4.2. Test Fragile site

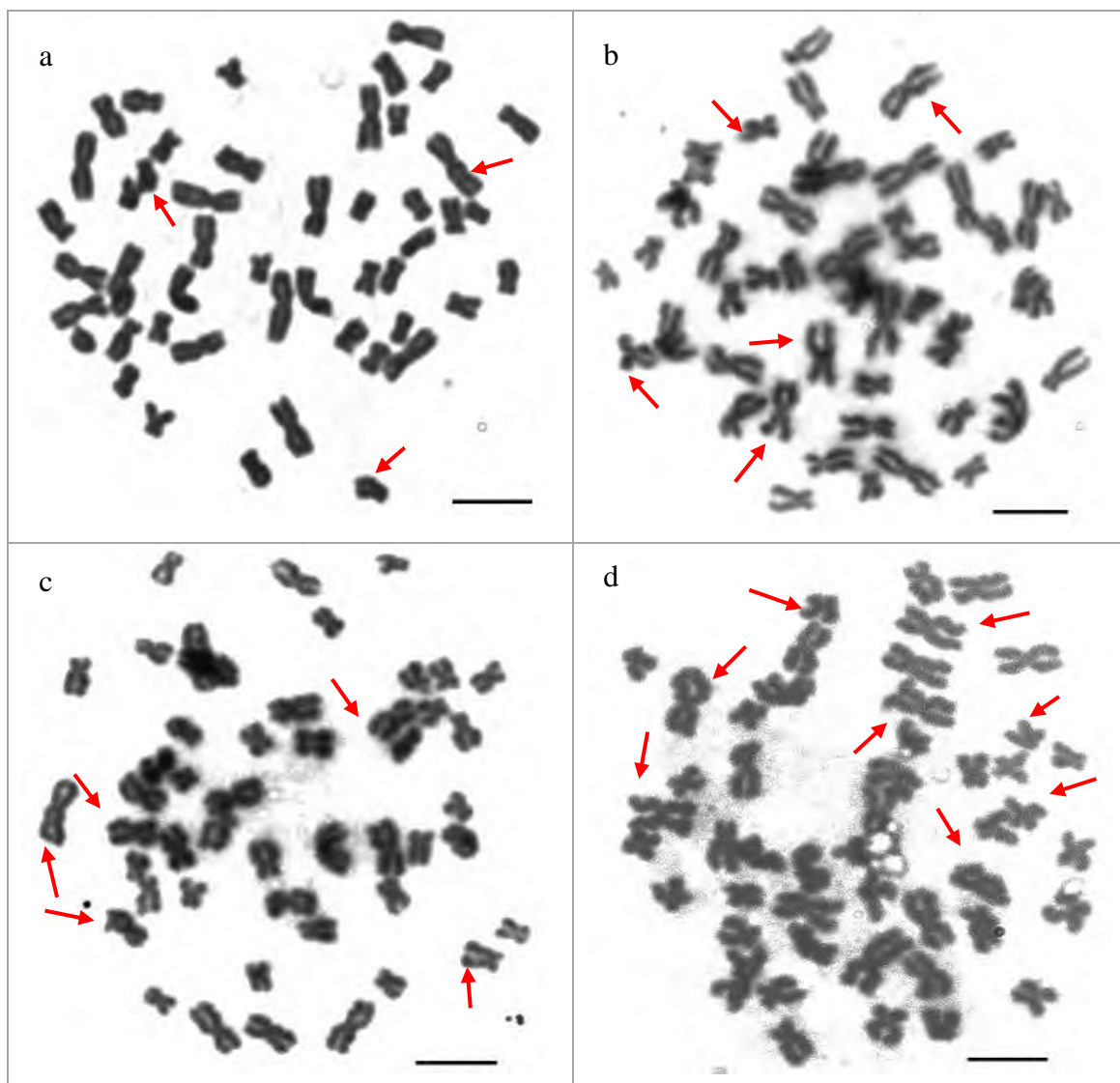
Analizę miejsc łamliwych na chromosomach psa domowego i lisa polarnego prowadzono w oparciu o barwienie komórek konwencjonalne Giemśą. W celu identyfikacji chromosomów w obrębie kariotypów badanych zwierząt, na których doszło do pęknięć FS wykonano barwienie prążkowe G (GTG) (Fot. 3). Pełna analiza liczby i typu miejsc łamliwych na chromosomach została przeprowadzona w oparciu o barwienie Giemśą (Fot. 4 i 5).



Fot. 3. Płytki metafazowe barwione techniką GTG w teście Fragile site: a) psa domowego $2n=78$, XY; b) lisa polarnego $2n=49$, XX. Powiększenie 1000x, skala 10 μm .



Fot. 4. Płytki metafazowe z chromosomami psa domowego: a i d) $2n=78$, XY, b i c) $2n=78$, XX. Chromosomy barwione Giemszą w teście FS z poszczególnych grup doświadczalnych: a) grupa kontrolna; b) po ekspozycji na AgNP; c) po ekspozycji na AgNP+C; d) po ekspozycji na AgNO₃. Powiększenie 1000x, skala 10 μm . Strzałkami zaznaczono przykładowe FS.



Fot. 5. Płytki metafazowe z chromosomami lisa polarnego $2n=49,XX$. Chromosomy barwione Giemszą w teście FS z poszczególnych grup doświadczalnych: a) grupa kontrolna; b) po ekspozycji na AgNP; c) po ekspozycji na AgNP+C; d) po ekspozycji na AgNO₃. Powiększenie 1000x, skala 10 μ m. Strzałkami zaznaczono przykładowe FS.

Przeprowadzono ilościową analizę występowania miejsc łamliwych w badanych komórkach określając liczbę miejsc łamliwych za pomocą parametru średniej liczby FS/komórkę. Ocenę liczby FS w komórkach krwi pochodzącej od psa domowego i lisa polarnego przeprowadzono na kilku poziomach uwzględniając wpływ różnych czynników doświadczalnych. Początkowo porównano wpływ badanych roztworów koloidalnych srebra: nanocząstek srebra, nanocząstek srebra stabilizowanych cytrynianem sodu oraz azotanu srebra w odniesieniu do próby kontrolnej. Wyniki tego etapu przedstawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Średnia liczba miejsc łamliwych w komórkach krwi obwodowej po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do próby kontrolnej u badanych gatunków psowatych

Grupa doświadczalna	Pies domowy	Lis polarny
Kontrola	3,73±1,87 ^{abc}	2,69±1,49 ^{ABC}
AgNP	8,64±5,08 ^a	6,39±2,58 ^A
AgNP+C	8,23±4,56 ^b	6,33±2,28 ^B
AgNO ₃	8,25±4,27 ^c	6,52±2,53 ^C

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone FS/komórkę

abc/ABC – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

W limfocytach z grupy kontrolnej pochodzącej od psa domowego i lisa polarnego stwierdzono występowanie spontanicznych uszkodzeń chromosomów, na poziomie odpowiednio u psa domowego 3,73±1,87 FS/komórkę, a dla lisa polarnego 2,69±1,49 FS/komórkę. Działanie badanych roztworów srebra na limfocyty psowatych powodowało wzrost liczby miejsc łamliwych na zbliżonym poziomie ponad 8 FS/komórkę u psa domowego oraz ponad 6 FS/komórkę u lisa polarnego. Obserwowane różnice w grupach po ekspozycji na poszczególne roztwory srebra, a grupą kontrolą są wysoce istotne ($p < 0,01$), u obu badanych gatunków – psa domowego i lisa polarnego, u których obserwowano taki sam wpływ roztworów koloidalnych.

W kolejnej części doświadczenia zbadano wpływ dawki (5, 10, 20 µg/ml) poszczególnych roztworów koloidalnych na indukowanie powstawania miejsc

łamliwych w limfocytach psowatych. Uzyskane wyniki dla poszczególnych grup przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Średnia liczba miejsc łamliwych w komórkach w zależności od dawki roztworów srebra u badanych gatunków psowatych

Roztwór / dawka		Pies domowy	Lis polarny
AgNP	5 µg/ml	8,91±5,27	6,71±2,65 ^A
	10 µg/ml	8,81±5,22	6,63±2,87 ^B
	20 µg/ml	8,21±4,73	5,83±2,07 ^{AB}
AgNP+C	5 µg/ml	8,53±4,46	6,20±2,41
	10 µg/ml	8,34±4,57	6,39±2,20
	20 µg/ml	7,80±4,62	6,38±2,23
AgNO ₃	5 µg/ml	8,38±4,25	6,60±2,69
	10 µg/ml	8,31±4,07	6,32±2,58
	20 µg/ml	8,06±4,50	6,64±2,29

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w FS/komórkę

AB – wartości oznaczone tymi samymi literami różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

W komórkach pochodzących od psa domowego poszczególne warianty roztworu i jego stężenia indukowały uszkodzenia chromosomów na zbliżonym poziomie wynoszącym od 7,80 do 8,91 FS/komórkę. W przypadku każdego badanego roztworu srebra działającego na komórki psa domowego wraz ze wzrostem jego stężenia obserwowano zmniejszenie poziomu uszkodzeń chromosomów. Analizując wyniki średniej liczby FS/komórkę u psa domowego nie wykazano jednak wpływu dawki roztworów koloidalnych srebra na indukowanie uszkodzeń chromatyny. Nie stwierdzono wysoce istotnych różnic w liczbie FS/komórkę pomiędzy stężeniami w obrębie danego związku srebra.

Zmiany integralności chromatyny u lisa polarnego po działaniu roztworów koloidalnych srebra były związane z uszkodzeniami na poziomie 5,83 do 6,71 FS/komórkę. Dla próbek pochodzących od lisa polarnego stwierdzono wpływ dawki na poziom zmian integralności chromatyny jądrowej tylko w przypadku roztworu czystych nanocząstek srebra (AgNP). Wysoce istotne różnice w średniej liczbie FS/komórkę obserwowano pomiędzy stężeniami 5 i 20 µg/ml oraz między 10 i 20 µg/ml ($p < 0,01$). W przypadku roztworów AgNP+C oraz AgNO₃ nie stwierdzono wpływu dawki na zwiększenie zaburzeń integralności chromatyny.

W dalszej kolejności w ramach testu Fragile site przeprowadzono ocenę wpływu czasu ekspozycji komórek (3h i 24h) na indukowanie miejsc łamliwych w limfocytach. W Tabeli 8 przedstawiono szczegółowe wyniki z tej części analizy.

Tabela 8. Średnia liczba miejsc łamliwych w komórkach w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych

Roztwór / czas ekspozycji		Pies domowy	Lis polarny
AgNP	3h	10,18±5,76 ^a	6,15±2,75 ^A
	24h	7,10±3,71 ^a	6,63±2,38 ^A
AgNP+C	3h	9,14±5,20 ^b	5,63±1,94 ^B
	24h	7,31±3,59 ^b	7,02±2,38 ^B
AgNO ₃	3h	9,21±4,83 ^c	6,07±2,47 ^C
	24h	7,30±3,38 ^c	6,96±2,51 ^C

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w FS/komórkę
abc/ABC – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku i roztworu srebra różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Średnia liczba miejsc łamliwych w limfocytach pochodzących od psa domowego kształtowała się na poziomie 9,14 – 10,18 FS/komórkę po 3 h ekspozycji oraz 7,10 – 7,31 FS/komórkę po 24 h. Analogicznie w próbkach pochodzących od lisa polarnego po 3h ekspozycji na roztwory srebra uzyskano 5,63 – 6,15 FS/komórkę, a po 24h 6,63 – 7,02 FS/komórkę. Na podstawie tych danych zaobserwowano odwrotne zależności – u psa domowego wyższy poziom uszkodzeń obserwowano po 3h ekspozycji niezależnie od działającego roztworu srebra. Natomiast w przypadku lisa polarnego, wyższym zaburzeniem integralności chromatyny charakteryzowały się próbki po dłuższym – 24h okresie ekspozycji, również niezależnie od roztworu srebra. Stwierdzono wysoce istotny wpływ czasu ekspozycji komórek na średnią liczbę miejsc łamliwych. Różnice w średniej FS/komórkę obserwowane pomiędzy czasami 3h i 24h w każdym z ocenianych związków: AgNP, AgNP+C i AgNO₃ były wysoce istotne ($p < 0,01$).

Najbardziej szczegółowym etapem analizy miejsc łamliwych było określenie wpływu dawki w zależności od czasu ekspozycji limfocytów i działającego roztworu koloidalnego. Dane szczegółowe zostały przedstawione w Tabeli 9.

Tabela 9. Średnia liczba miejsc łąmliwych w komórkach krwi w zależności od działania zastosowanej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji

dawka		Pies domowy			Lis polarny		
		5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
Wpływ czasu	3h	10,61±6,25 ^a	11,08±5,87 ^b	8,86±4,87 ^c	6,61±3,15	6,26±2,77 ^A	5,58±2,16 ^B
	24h	7,21±3,28 ^a	6,53±3,14 ^b	7,56±4,51 ^c	6,81±2,05	7,00±2,92 ^A	6,08±1,95 ^B
AgNP	3h	9,85±5,04 ^d	9,21±5,16 ^e	8,36±5,31	5,47±1,94 ^C	5,76±2,04 ^D	5,67±1,85 ^E
	24h	7,21±3,32 ^d	7,47±3,70 ^e	7,25±3,74	6,93±2,61 ^C	7,04±2,17 ^D	7,10±2,36 ^E
AgNP+C	3h	9,21±4,89 ^f	8,99±4,35 ^g	9,43±5,12 ^h	6,08±2,62 ^F	6,00±2,66	6,14±2,09 ^G
	24h	7,55±3,29 ^f	7,64±3,67 ^g	6,70±3,09 ^h	7,01±2,68 ^F	6,63±2,47	7,14±2,38 ^G
AgNO ₃	3h	9,21±4,89 ^f	8,99±4,35 ^g	9,43±5,12 ^h	6,08±2,62 ^F	6,00±2,66	6,14±2,09 ^G
	24h	7,55±3,29 ^f	7,64±3,67 ^g	6,70±3,09 ^h	7,01±2,68 ^F	6,63±2,47	7,14±2,38 ^G

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w FS/komórkę

abcdefghijkl/ABCDEFGH – wartości oznaczone tymi samymi literami pomiędzy wierszami w obrębie wybranego stężenia, roztworu srebra i danego gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

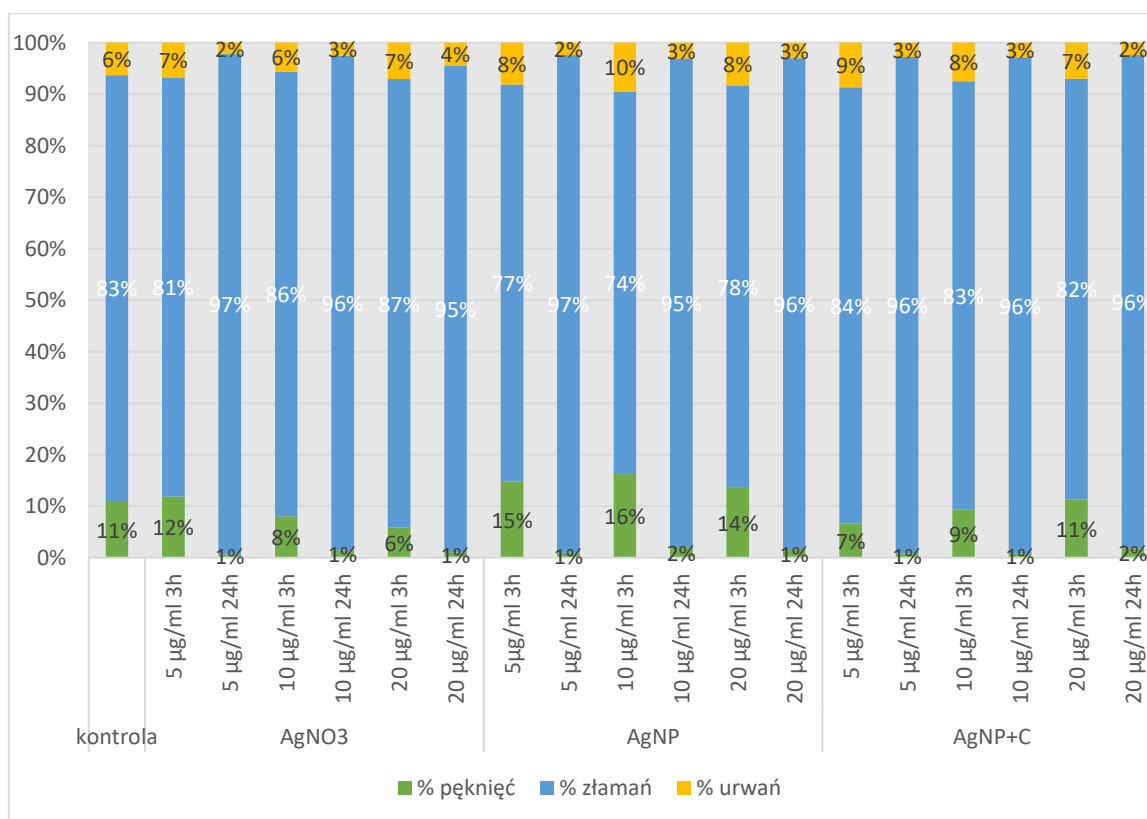
Analiza poszczególnych wariantów doświadczalnych (roztworu srebra, stężenia i czasu ekspozycji) wykazała występowanie miejsc łąmliwych w komórkach pochodzących od psa domowego na poziomie 6,53 – 11,08 FS/komórkę. Niezależnie od dawki i roztworu srebra, wyższe wartości parametru FS/komórkę odnotowano dla prób po 3h ekspozycji w stosunku do odpowiadających im wartości parametrów po 24h. W przypadku psa domowego wysoce istotne różnice w średniej liczbie FS/komórkę obserwowano w prawie każdym z analizowanych przypadków stężenia/czasu ekspozycji/roztworu koloidalnego ($p < 0,01$). Wyjątkiem, dla którego nie stwierdzono istotności była dawka 20 µg/ml AgNP+C w dwóch wariantach ekspozycji (3h i 24h). Stwierdzono jednocześnie, że wpływ dawki danego roztworu srebra w zależności od czasu jego działania na limfocyty psa był wysoce istotny.

W przypadku komórek pochodzących od lisa polarnego analiza różnych wariantów doświadczenia wykazała uszkodzenia w zakresie 5,47 – 7,14 FS/komórkę. Zaobserwowano, że wyższą wartość parametru FS/komórkę wykazywały próby po 24h ekspozycji niezależnie od roztworu srebra i jego dawki w porównaniu do prób po 3h. W większości analizowanych przypadków otrzymano wysoce istotne różnice w średniej liczbie FS/komórkę. Stwierdzono wysoce istotny wpływ dawki działającego roztworu srebra (AgNP, AgNP+C i AgNO₃) na indukowanie miejsc łąmliwych w zależności od długości ekspozycji komórek ($p < 0,01$). Tej zależności nie stwierdzono jedynie

w przypadku próbek po 3h i 24h ekspozycji pochodzących od lisa polarnego w dwóch przypadkach: przy stężeniu 5 $\mu\text{g/ml}$ AgNP oraz dla 10 $\mu\text{g/ml}$ AgNO₃.

Podczas analizy miejsc łamliwych identyfikowanych na chromosomach psa domowego rozpoznano trzy typy uszkodzeń zaliczanych do Fragile site: złamania chromatyd, pęknięcia/przerwy na chromatydzie oraz urwane fragmenty chromatyd (Fot. 4.). Na Wykresie 1 przedstawiono procentowy udział poszczególnych typów uszkodzeń w całkowitej liczbie zidentyfikowanych FS w poszczególnych próbach doświadczalnych.

Wykres 1. Rodzaje uszkodzeń chromosomów w teście Fragile site w komórkach pochodzących od psa domowego

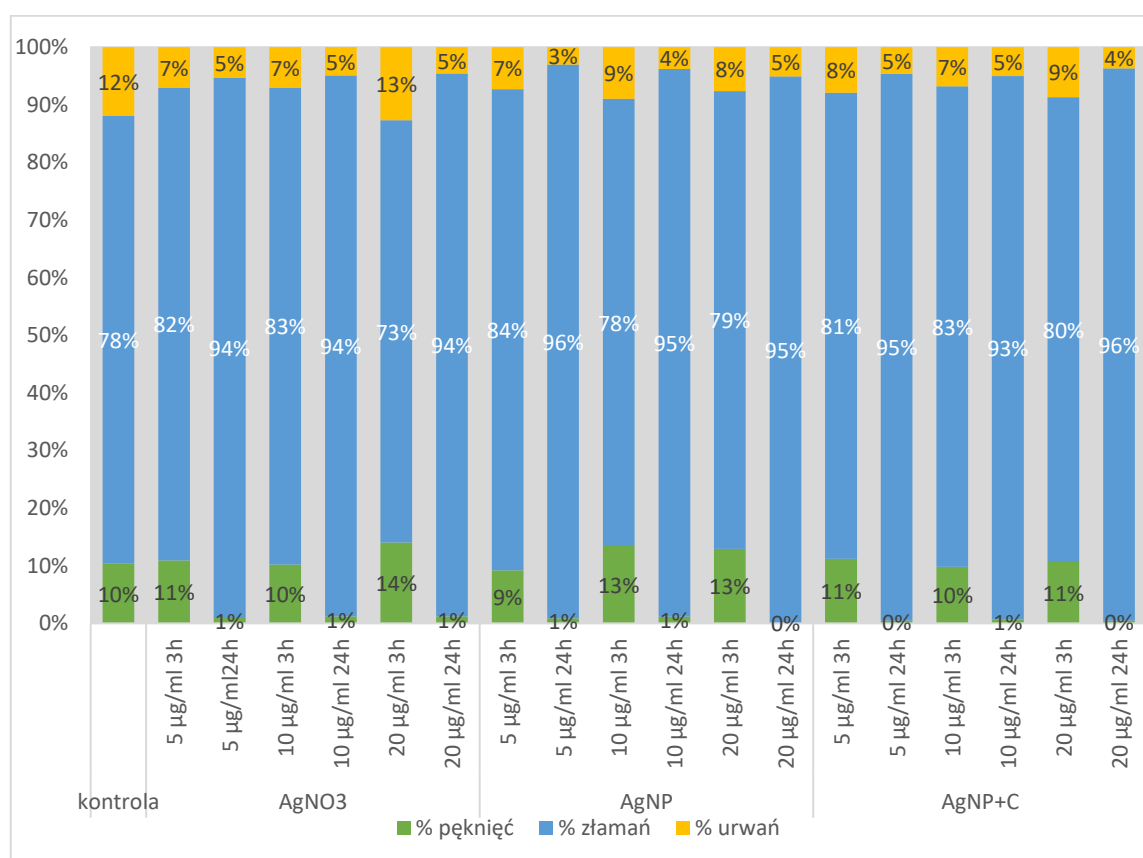


Najczęściej obserwowanym typem uszkodzeń w ramach testu Fragile site w komórkach pochodzących od psa domowego były złamania chromatyd, które w większości prób doświadczalnych stanowiły powyżej 80% zidentyfikowanych miejsc łamliwych. Jedynie w przypadku trzech grup doświadczalnych traktowanych roztworem koloidalnym nanocząstek srebra 5, 10 i 20 $\mu\text{g/ml}$ przez 3h złamania chromatyd stanowiły od 74 do 78% uszkodzeń. Pozostałe dwa typy uszkodzeń, czyli pęknięcia i urwane fragmenty chromatyd stanowiły niewielki odsetek wszystkich analizowanych

FS. Nieznacznie wyższym procentowym udziałem charakteryzowały się pęknięcia chromatyd, których częstotliwość występowania wahała się od 1 do 16%. W pięciu grupach doświadczalnych pęknięcia stanowiły powyżej 10% wszystkich nieprawidłowości, a były to kontrola, AgNO₃ 5 µg/ml 3h, AgNP 5, 10 i 20 µg/ml 3h. Z kolei urwania fragmentów chromatyd obserwowano w każdej z badanych prób na poziomie 2 – 10%. Najwyższy odsetek tego typu uszkodzeń stwierdzono dla komórek traktowanych koloidalnym roztworem AgNP 10 µg/ml przez 3h (Wykres 1).

Na chromosomach lisa polarnego w teście Fragile site, również zidentyfikowano trzy rodzaje miejsc łamliwych: złamania, pęknięcia i urwane fragmenty chromatyd (Fot 5.), których udział procentowy w całkowitej liczbie FS przedstawiono na Wykresie 2.

Wykres 2. Rodzaje uszkodzeń chromosomów w teście Fragile site w komórkach pochodzących od lisa polarnego



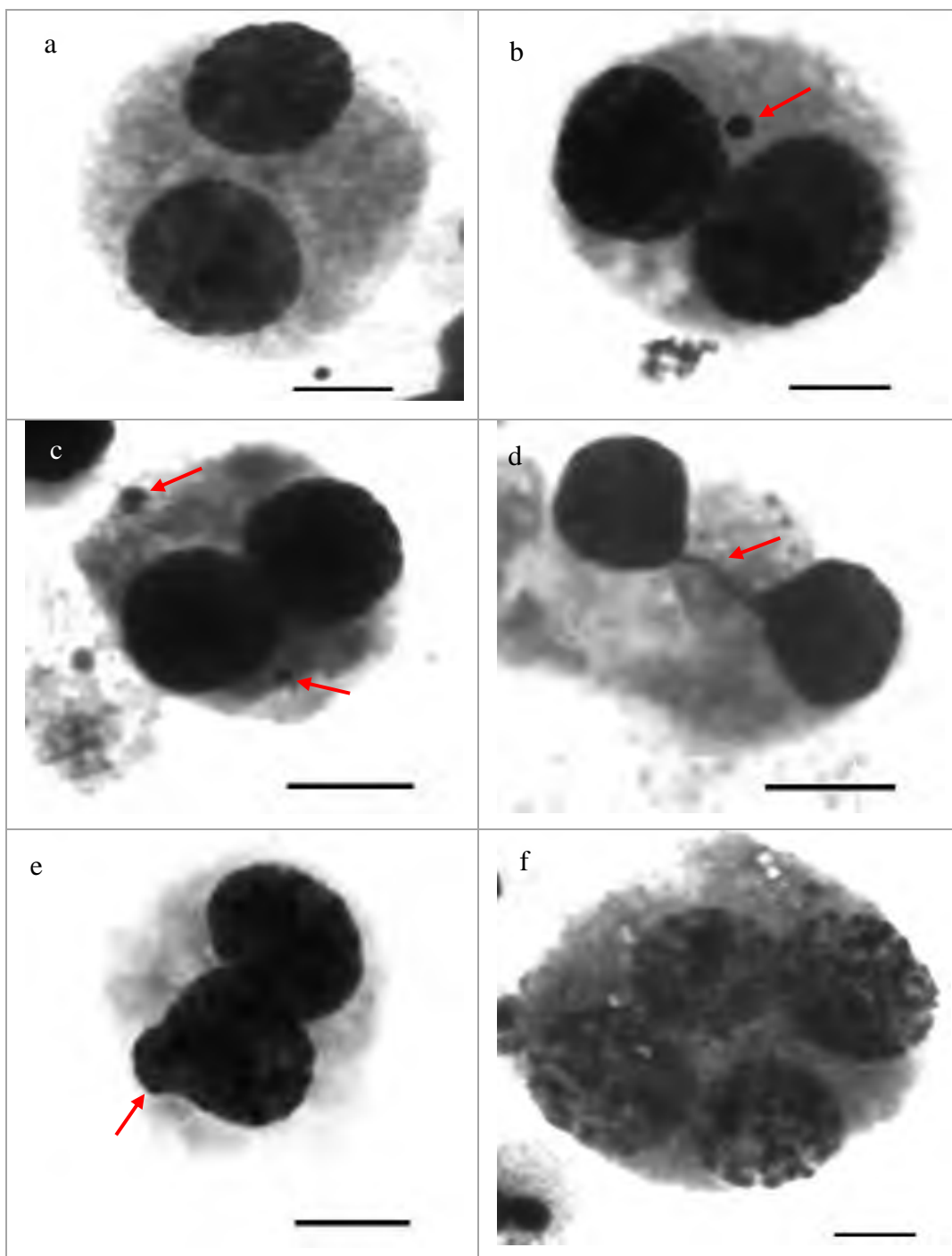
Chromosomy lisa polarnego, podobnie jak psa domowego, charakteryzowały się największym udziałem złamań chromatyd w całkowitej liczbie miejsc łamliwych. Odsetek złamań chromosomów lisa polarnego wynosił powyżej 78% w większości prób, sięgając nawet do 96% uszkodzeń w dwóch grupach: po ekspozycji na AgNP 5

$\mu\text{g/ml}$ przez 24h i AgNP+C 20 $\mu\text{g/ml}$ przez 24h. Jedynie w przypadku komórek poddanych ekspozycji na roztwór AgNO_3 20 $\mu\text{g/ml}$ przez 3h, odsetek zidentyfikowanych złamań stanowił 73%. Drugim rodzajem miejsc łamliwych identyfikowanym w komórkach we wszystkich grupach doświadczalnych były urwane fragmenty chromatyd. Stanowiły one od 3 do 13% uszkodzeń w teście Fragile site. Najwyższy odsetek urwań stwierdzono w komórkach po ekspozycji na roztwór azotanu srebra w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ przez 3h. Trzecim rodzajem miejsc łamliwych są pęknięcia chromatyd, które w przypadku chromosomów lisa polarnego charakteryzowały się dużą zmiennością pomiędzy grupami doświadczalnymi. Połowa grup doświadczalnych charakteryzowała się wyższą obecnością pęknięć chromatyd, na poziomie od 9 do 14%. Należały do nich grupy: kontrola, po ekspozycji na AgNO_3 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ przez 3h, AgNP 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ przez 3h oraz AgNP+C 5, 10, 20 $\mu\text{g/ml}$ przez 3h. W pozostałych grupach doświadczalnych pęknięcia chromatyd stanowiły 1% wszystkich FS. W komórkach poddanych ekspozycji na działanie AgNP 20 $\mu\text{g/ml}$ przez 24h oraz AgNP+C 5 i 20 $\mu\text{g/ml}$ przez 24h nie stwierdzono występowania uszkodzeń w postaci pęknięć chromatyd (Wykres 2).

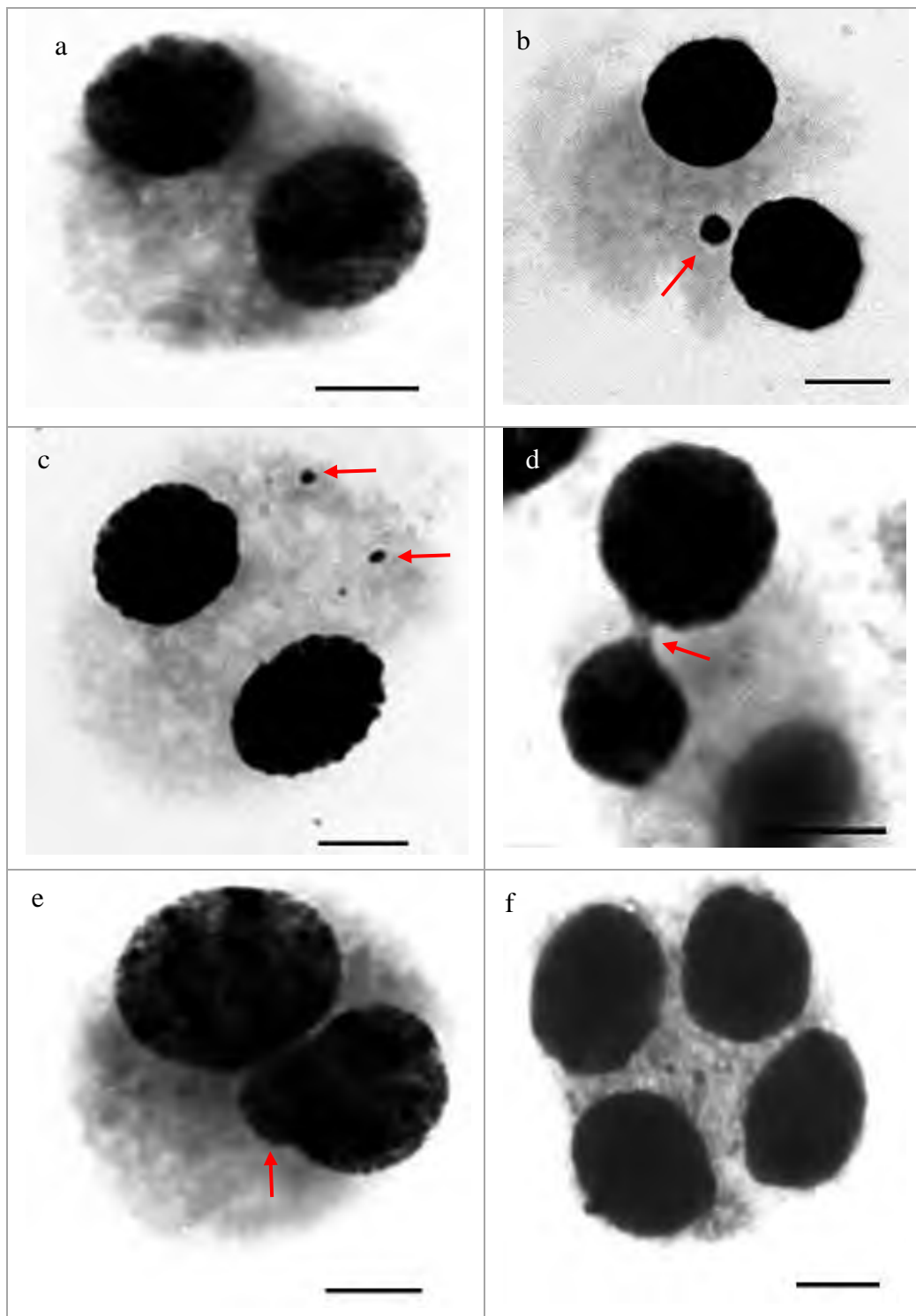
4.3. Test mikrojądrowy - CBMN

W teście mikrojądrowym z zahamowaniem cytokinezy w przypadku próbek doświadczalnych u psa domowego zidentyfikowano następujące typy komórek i ich nieprawidłowości: komórka dwujądrzasta BNC, komórka dwujądrzasta z jednym mikrojądrem BNC+1MN, komórka dwujądrzasta z dwoma mikrojądrami BNC+2MN, komórka dwujądrzasta z mostkiem nukleoplazmatycznym NPB, komórka dwujądrzasta z pękiem jądrowym NBUD, komórka wielojądrzasta MNC, a częstość ich występowania poddano analizie (Fot. 6.).

Analogiczną ocenę preparatów z testu CBMN prowadzono na próbkach pochodzących od lisa polarnego. Na Fotografii 7. przedstawiono typy komórek i nieprawidłowości jakie zidentyfikowano na preparatach i wykorzystano w dalszej analizie.



Fot. 6. Komórki analizowane w ramach testu CBMN w próbkach psa domowego: a) komórka dwujądrowa BNC; b) komórka dwujądrowa z jednym mikrojądrem BNC+1MN; c) komórka dwujądrowa z dwoma mikrojądrami BNC+2MN; d) komórka dwujądrowa z mostkiem nukleoplazmatycznym NPB; e) komórka dwujądrowa z pękiem jądrowym NBUD; f) komórka wielojądrowa MNC. Barwienie Giemsa, powiększenie 1000x, skala 10 μm . Strzałkami zaznaczono formy niestabilności chromosomowych.



Fot. 7. Komórki analizowane w ramach testu CBMN w próbkach lisa polarnego: a) komórka dwujądrzasta BNC; b) komórka dwujądrzasta z jednym mikrojądrem BNC+1MN; c) komórka dwujądrzasta z dwoma mikrojądrami BNC+2MN; d) komórka dwujądrzasta z mostkiem nukleoplazmatycznym NPB; e) komórka dwujądrzasta z pękiem jądrowym NBUD; f) komórka wielojądrzasta MNC. Barwienie Giemsa, powiększenie 1000x, skala 10 μm . Strzałkami zaznaczono formy niestabilności chromosomowych.

W analizie mikroskopowej preparatów z testu CBMN u obu gatunków nie zaobserwowano występowania komórek apoptotycznych i nekrotycznych. W związku z tym ten typ uszkodzeń nie był brany pod uwagę w dalszej analizie.

Przeprowadzono analizę występowania mikrojąder (1 lub 2) w komórkach dwujądźrzastych otrzymanych w wyniku testu CBMN w limfocytach psa domowego (Fot. 6. b i c) i lisa polarnego (Fot. 7. b i c). Częstotliwość występowania BNC z 1 lub 2 mikrojądrami określano w przeliczeniu na średnią liczbę BNC+1MN/komórkę oraz BNC+2MN/komórkę. W pierwszym etapie określano wpływ roztworów srebra w odniesieniu do grupy kontrolnej na zmianę stabilności chromatyny obserwowanej jako zwiększoną liczbę MN w komórkach. Wyniki analizy przedstawiono w Tabeli 10.

Tabela 10. Średnia liczba BNC z 1 lub 2 mikrojądrami w komórkach krwi obwodowej po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych gatunków psowatych

Grupa doświadczalna	Pies domowy		Lis polarny	
	BNC+1MN	BNC+2MN	BNC+1MN	BNC+2MN
Kontrola	11,00±4,42 ^{abc}	0,20±0,42	15,10±8,05	1,00±1,25
AgNP	23,10±6,74 ^a	0,47±0,93	23,05±8,15	0,58±1,20
AgNP+C	23,47±6,84 ^b	0,33±0,71	21,93±6,87	0,75±1,30
AgNO ₃	23,50±6,18 ^c	0,53±1,17	21,48±6,41	0,63±1,30

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w liczbie BNC+1 lub 2 MN/komórkę
 abc – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie kolumn i danego gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Po ekspozycji limfocytów psa domowego na badane roztwory koloidalne srebra średnia liczba komórek BNC z 1 mikrojądrem wynosiła 23 w grupach doświadczalnych w porównaniu do próby kontrolnej (11,04±4,42 BNC+1MN/komórkę). Dane uzyskane z komórek pochodzących od psa domowego wskazywały na znaczący wpływ roztworu srebra na indukowanie BNC+1MN. Obserwowane różnice w średniej liczbie BNC+1MN/komórkę pomiędzy poszczególnymi roztworami: AgNP, AgNP+C, AgNO₃ a grupą kontrolną były wysoce istotne ($p < 0,01$). Komórki z dwoma mikrojądrami w każdej z grup obserwowano bardzo rzadko, w zakresie od 0,20 do 0,47. Nie stwierdzono wpływu roztworu koloidalnego na indukowanie BNC+2MN/komórkę.

Ekspozycja komórek lisa polarnego na roztwory srebra wykazała wzrost poziomu uszkodzeń – 21,48 – 23,05 BNC+1MN/komórkę w odniesieniu do próby

kontrolnej. Z kolei, obecność dwóch mikrojąder w komórkach z grup doświadczalnych również była rzadko obserwowana: od 0,58 do 0,75 BNC+2MN/komórkę. W próbkach pozyskanych od lisa polarnego nie stwierdzono wpływu związku srebra na zwiększenie częstości występowania BNC+1MN oraz BNC+2MN. Obserwowane różnice w średniej wartości badanych parametrów nie były istotne.

Następnie ocenę uszkodzeń w teście CBMN prowadzono pod kątem wpływu dawki badanych roztworów srebra na liczbę mikrojąder obserwowanych w komórkach. Szczegółowe dane zamieszczono w Tabeli 11.

Tabela 11. Średnia liczba BNC z 1 lub 2 mikrojądrami w komórkach w zależności od dawki roztworów srebra u badanych psowatych

Roztwór / dawka	Pies domowy		Lis polarny		
	BNC+1MN	BNC+2MN	BNC+1MN	BNC+2MN	
AgNP	5 µg/ml	22,60±6,48	0,45±0,89	19,40±8,18	0,45±0,60
	10 µg/ml	22,30±7,46	0,80±1,20	24,55±6,18	0,50±0,76
	20 µg/ml	24,40±6,36	0,15±0,49	25,20±8,93	0,80±1,85
AgNP+C	5 µg/ml	23,50±6,89	0,20±0,41	23,45±7,10	0,65±1,04
	10 µg/ml	23,50±6,66	0,10±0,45	19,90±5,97	0,75±1,12
	20 µg/ml	23,40±7,31	0,70±0,98	22,45±7,31	0,85±1,69
AgNO ₃	5 µg/ml	21,85±6,13	0,50±1,22	19,80±5,72	0,80±1,24
	10 µg/ml	23,95±6,34	0,70±1,26	20,85±4,96	0,45±0,69
	20 µg/ml	24,70±6,01	0,25±0,64	23,80±7,82	0,65±1,78

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w liczbie BNC+1 lub 2 MN/komórkę

W komórkach psa domowego stwierdzono występowanie BNC+1MN na średnim poziomie 21,85 – 24,70 BNC+1MN/komórkę. Dla lisa polarnego wartość tego parametru mieściła się w szerszym zakresie 19,80 – 25,20 BNC+1MN/komórkę. Komórki z dwoma mikrojądrami u obu gatunków były rzadko identyfikowane, w limfocytach psa średnio 0,10 – 0,80 BNC+2MN, a w limfocytach lisa polarnego nieznacznie częściej, średnio 0,45 – 0,85 BNC+2MN/komórkę. W przypadku obu gatunków doświadczalnych nie stwierdzono wpływu dawki roztworów AgNP, AgNP+C czy AgNO₃ na liczbę indukowanych BNC+1MN/komórkę oraz BNC+2MN/komórkę. Różnice obserwowane pomiędzy średnimi wartościami badanych parametrów nie były wysoce istotne ($p < 0,01$).

Dalsza analiza w teście CBMN była związana z określeniem działania czasu ekspozycji komórek na średni poziom mikrojąder obserwowanych w limfocytach krwi (Tabela 12).

Tabela 12. Średnia liczba BNC z 1 lub 2 mikrojądrami w komórkach w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych

Roztwór / czas ekspozycji		Pies domowy		Lis polarny	
		BNC+1MN	BNC+2MN	BNC+1MN	BNC+2MN
AgNP	3h	24,63±7,20	0,73±1,17	21,33±8,00	0,57±1,37
	24h	21,57±5,97	0,20±0,48	24,77±8,48	0,60±0,81
AgNP+C	3h	25,17±8,50	0,30±0,70	20,03±6,65	0,47±0,80
	24h	23,33±4,12	0,37±0,72	23,83±6,66	1,03±1,52
AgNO ₃	3h	24,97±6,44	0,77±1,50	20,07±5,53	0,27±0,52
	24h	22,03±5,63	0,30±0,65	22,16±6,98	1,00±1,53

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w liczbie BNC+1 lub 2MN/komórkę

Po ekspozycji na badane roztwory srebra w komórkach psa domowego wyższe wartości średniej BNC+1MN obserwowano po 3h ekspozycji (24,63 – 25,17) niż po 24h (21,57 – 23,33) narażeniu komórek. Odwrotnie kształtowały się wyniki w próbkach uzyskanych od lisa polarnego. W tym przypadku wyższą wartość średniej BNC+1MN/komórkę uzyskano po 24h ekspozycji (22,16 – 24,77) niezależnie od zastosowanego roztworu w stosunku do ich działania przez 3h (20,03 – 21,33). Liczba BNC+2MN/komórkę kształtowała się dla limfocytów psa domowego na poziomie 0,20 – 0,77, a dla limfocytów lisa polarnego 0,27 – 1,03 BNC+2MN. Dla obu gatunków – psa domowego i lisa polarnego, nie stwierdzono wpływu czasu ekspozycji komórek na działanie roztworów srebra na średnią liczbę komórek dwujądrazystych z jednym lub dwoma mikrojądrami. Różnice średniej BNC+1MN/komórkę oraz BNC+2MN/komórkę obserwowane w 3h i 24h po ekspozycji nie były wysoce istotne.

Następnie przeprowadzono analizę szczegółowego wpływu wszystkich badanych czynników, takich jak dawka, czas i roztwór srebra na stopień uszkodzenia chromatyny jądrowej obserwowany jako liczba BNC+1MN/komórkę (Tabela 13) oraz BNC+2MN/komórkę (Tabela 14) w komórkach psowatych.

Tabela 13. Średnia liczba BNC z 1 mikrojądrem w komórkach w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji

dawka		Pies domowy			Lis polarny		
		5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
AgNP	3h	26,10±4,98	24,70±9,18	23,10±7,28	17,70±7,27	22,70±3,86	23,60±9,67
	24h	19,10±6,06	19,90±4,53	25,70±5,35	21,10±9,05	26,40±7,62	29,80±8,31
AgNP+C	3h	26,60±7,73	26,60±7,65	22,30±10,03	22,20±6,32	18,70±7,19	19,20±6,53
	24h	20,40±4,37	20,40±3,72	24,50±3,06	24,70±7,95	21,10±1,32	25,70±6,83
AgNO ₃	3h	23,70±7,04	26,20±5,43	25,00±7,15	18,90±7,06	20,20±5,59	21,10±3,84
	24h	20,00±4,71	21,70±6,65	24,40±4,99	20,70±4,16	21,50±4,43	26,50±9,91

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w liczbie BNC+1MN/komórkę

Analiza wszystkich wariantów doświadczalnych: roztworu srebra/dawki/czasu ekspozycji w komórkach psa domowego wykazała występowanie uszkodzeń na średnim poziomie 19,10 – 26,60 BNC+1MN/komórkę. Natomiast w próbkach pochodzących od lisa polarnego wartość parametru ukształtowała się między 17,70 a 29,80 BNC+1MN/komórkę. Współdziałanie wszystkich analizowanych czynników, to znaczy roztworu srebra, dawki oraz czasu ekspozycji, nie wpływało na średnią liczbę BNC+1MN/komórkę u obu badanych gatunków psowatych. Różnice obserwowane w Tabeli 13 pomiędzy średnimi wartościami BNC+1MN/komórkę w zależności od czasu ekspozycji/dawki/roztworu srebra nie były wysoce istotne.

Tabela 14. Średnia liczba BNC z 2 mikrojądrami w komórkach w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji

dawka		Pies domowy			Lis polarny		
		5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
AgNP	3h	0,60±1,07	1,30±1,49	0,30±0,67	0,40±0,52	0,40±0,70	0,90±2,51
	24h	0,30±0,67	0,30±0,48	0,00±0,00	0,50±0,71	0,60±0,84	0,70±0,95
AgNP+C	3h	0,10±0,32	0,20±0,63	0,60±0,97	0,40±1,26	0,70±0,95	0,30±0,67
	24h	0,30±0,48	0,00±0,00	0,80±1,03	0,90±0,74	0,80±1,32	1,40±2,22
AgNO ₃	3h	1,10±1,97	0,90±1,59	0,30±0,67	0,50±0,53	0,20±0,63	0,10±0,32
	24h	0,20±0,42	0,50±0,85	0,20±0,63	1,10±1,66	0,70±0,67	1,20±2,44

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w liczbie BNC+2MN/komórkę

W przypadku materiału pobranego od psa domowego komórki dwujądrowe z dwoma mikrojądrami były identyfikowane w większości wariantów doświadczalnych: roztworu srebra/dawki/czasu ekspozycji, z wyjątkiem prób traktowanych AgNP 20 µg/ml przez 24h oraz AgNP+C 20 µg/ml przez 24h. Średnia wartość kształtowała się na poziomie 0,20 – 1,30 BNC+2MN/komórkę. W komórkach pochodzących od lisa polarnego zidentyfikowano pojedyncze BNC+2MN w każdym badanym wariantie roztworu srebra/dawki i czasu ekspozycji w zakresie 0,10 – 1,40 BNC+2MN/komórkę. U obu gatunków psowatych nie stwierdzono wpływu interakcji czynników – związku srebra/dawki/czasu ekspozycji na średnią liczbę BNC+2MN/komórkę. Różnice obserwowane w średniej wartości BNC+2MN/komórkę pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczalnymi nie były wysoce istotne.

W ramach testu CBMN prowadzono również analizę dwóch innych typów nieprawidłowości komórkowych wynikających ze zmian integralności chromatyny jądrowej. Oceniano występowanie mostków nukleoplazmatycznych (NPB) i pęków jądrowych (NBUD) (Fot. 6. d i e – w komórkach psa domowego oraz Fot. 7. d i e – w komórkach lisa polarnego) w komórkach dwujądrowych i określano odpowiednio za pomocą parametrów średniej liczby NPB/komórkę oraz średniej liczby NBUD/komórkę. Analizę częstości występowania tych dwóch nieprawidłowości przeprowadzono pod kątem efektu działania badanych roztworów AgNP, AgNP+C oraz AgNO₃ w odniesieniu do grupy kontrolnej. Dane przedstawiono w Tabeli 15.

Tabela 15. Średnia liczba NPB i NBUD w komórkach krwi obwodowej po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych gatunków psowatych

Grupa doświadczalna	Pies domowy		Lis polarny	
	NPB	NBUD	NPB	NBUD
Kontrola	0,80±1,13	2,10±2,47	1,00±1,25	2,10±1,79
AgNP	1,32±1,54	2,13±1,66 ^a	0,62±1,25	1,08±1,46
AgNP+C	0,78±1,07	1,63±1,47	0,53±1,24	1,53±2,26
AgNO ₃	0,82±1,38	0,92±1,36 ^a	1,43±1,97	1,43±1,97

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone odpowiednio w liczbie NPB/komórkę oraz NBUD/komórkę

a– wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie parametru i gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Średnia liczba NPB/komórkę u obu gatunków po ekspozycji na roztwory srebra wahała się w szerokim zakresie, w limfocytach psa 0,78 – 1,32 NPB/komórkę, a w komórkach lisa polarnego 0,53 do 1,43 NPB/komórkę. W materiale pochodzącym od psa najwyższą wartość parametru NPB/komórkę odnotowano dla komórek poddanych działaniu AgNP. Z kolei, w komórkach pobranych od lisa polarnego najczęściej komórek z mostkami nukleoplazmatycznymi zidentyfikowano po działaniu AgNO₃. Analiza wyników uzyskanych dla średniej liczby NPB/komórkę nie wykazała wpływu roztworu koloidalnego srebra na poziom identyfikowanych uszkodzeń u obu badanych gatunków psowatych. Różnice średniej wartości NPB/komórkę obserwowane pomiędzy roztworami srebra a próbą kontrolną nie były wysoce istotne.

Komórki dwujądrowe posiadające paki jądrowe zidentyfikowano w próbach pochodzących od obu badanych gatunków. W próbach kontrolnych stwierdzono występowanie NBUD na zbliżonym poziomie 2,10±2,47 NBUD/komórkę w limfocytach psa domowego oraz 2,10±1,79 NBUD/komórkę w limfocytach lisa polarnego. Ekspozycja na związki srebra ujawniła NBUD na średnim poziomie wynoszącym 0,92 – 2,13 NBUD/komórkę w limfocytach psa domowego oraz 1,08 – 1,53 NBUD/komórkę w limfocytach lisa polarnego. Dla parametru średnia liczba NBUD/komórkę nie stwierdzono wpływu ekspozycji limfocytów na roztwory srebra w odniesieniu do próby kontrolnej dla obu badanych gatunków. W próbkach pochodzących od psa domowego różnice w wartości średniej liczby NBUD/komórkę pomiędzy AgNP, AgNP+C i AgNO₃ a grupą kontrolną nie były wysoce istotne. Jedynie pomiędzy średnią liczbą NBUD/komórkę otrzymaną dla prób po ekspozycji na AgNP i AgNO₃ wykazano wysoce istotne różnice ($p < 0,01$). Dla pozostałych wariantów porównywanych roztworów srebra nie stwierdzono istotnych różnic. W przypadku prób pochodzących od lisa polarnego obserwowane różnice pomiędzy związkami srebra a próbą kontrolną oraz między poszczególnymi roztworami nie były wysoce istotne.

Następnie przeprowadzono analizę wpływu dawki poszczególnych roztworów koloidalnych srebra na zwiększenie występowania nieprawidłowości (NPB, NBUD) w limfocytach krwi badanych psowatych. Dane uzyskane z tej analizy przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Średnia liczba NPB i NBUD w komórkach w zależności od dawki roztworów srebra u badanych gatunków psowatych

Roztwór / dawka		Pies domowy		Lis polarny	
		NPB	NBUD	NPB	NBUD
AgNP	5 µg/ml	1,35±1,53	2,20±1,79	0,45±0,83	1,50±1,76
	10 µg/ml	1,45±1,05	2,35±1,66	0,85±0,99	1,05±1,36
	20 µg/ml	1,15±1,98	1,85±1,56	0,55±1,76	0,70±1,17
AgNP+C	5 µg/ml	0,90±1,12	2,40±1,60 ^a	0,85±1,76	1,35±1,78
	10 µg/ml	1,00±1,21	1,55±1,39	0,50±1,00	2,25±3,13
	20 µg/ml	0,45±0,83	0,95±1,05 ^a	0,25±0,72	1,00±1,45
AgNO ₃	5 µg/ml	1,03±1,35	1,63±1,75 ^b	2,10±2,99	1,85±2,18
	10 µg/ml	0,80±1,58	0,95±1,47	2,10±3,63	1,35±2,08
	20 µg/ml	0,50±1,05	0,40±1,19 ^b	0,70±0,86	1,10±1,62

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone odpowiednio w liczbie NPB/komórkę oraz NBUD/komórkę

ab – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie parametru NBUD i gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Analiza uzyskanych wyników wykazała średni poziom uszkodzeń po ekspozycji na roztwory srebra i ich dawki w komórkach pochodzących od psa domowego na wynoszący 0,45 – 1,45 NPB/komórkę, a w komórkach pochodzących od lisa polarnego równy 0,25 – 2,10 NPB/komórkę. Nie zaobserwowano wpływu dawki (5/10/20 µg/ml) badanych roztworów koloidalnych srebra na częstotliwość występowania mostków nukleoplazmatycznych w limfocytach obu gatunków psowatych.

W materiale pobranym od psa domowego stwierdzono występowanie pąków jądrowych w komórkach dwujądrowych w zakresie 0,40 – 2,40 NBUD/komórkę. Analiza średniej NBUD/komórkę w limfocytach psa domowego wykazała wysoce istotny ($p < 0,01$) wpływ dawki związku na poziom obserwowanych zmian w przypadku dwóch badanych roztworów srebra, pomiędzy dawką 5 µg/ml a 20 µg/ml AgNP+C oraz między 5 µg/ml a 20 µg/ml dla AgNO₃. W pozostałych wariantach roztworu srebra i dawki różnice nie były istotne. W komórkach pochodzących od lisa polarnego stwierdzono występowanie pąków jądrowych na średnim poziomie 0,70 – 2,25 NBUD/komórkę. W przypadku limfocytów lisa polarnego analiza nie wykazała wpływu dawki związków srebra na poziom NBUD/komórkę. Różnice w wartości

NBUD/komórkę pomiędzy średnimi dla poszczególnych wariantów stężeń i roztworu koloidalnego nie były wysoce istotne.

W dalszej analizie sprawdzono wpływ czasu ekspozycji komórek na działanie AgNP, AgNP+C i AgNO₃ na poziom NPB i NBUD w komórkach. Wyniki uzyskane w trakcie analizy zestawiono w Tabeli 17.

Tabela 17. Średnia liczba NPB i NBUD w komórkach w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych

Roztwór / czas ekspozycji		Pies domowy		Lis polarny	
		NPB	NBUD	NPB	NBUD
AgNP	3h	2,00±1,80 ^a	3,00±1,57 ^d	0,40±1,30	0,60±1,44 ^B
	24h	0,63±0,81 ^a	1,27±1,26 ^d	0,83±1,15	1,57±1,59 ^B
AgNP+C	3h	1,20±1,21 ^b	1,97±1,50	0,60±1,52	0,77±1,41 ^C
	24h	0,37±0,61 ^b	1,30±1,39	0,47±0,90	2,30±2,69 ^C
AgNO ₃	3h	1,30±1,66 ^c	1,17±1,46	0,50±1,00 ^A	1,35±1,83
	24h	0,33±0,80 ^c	0,67±1,21	2,77±3,49 ^A	1,73±2,08

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone odpowiednio w liczbie NPB/komórkę oraz NBUD/komórkę

abcd/ABC – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie parametru i gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

W próbkach pochodzących od psa domowego średnia liczba NPB/komórkę po 3h ekspozycji (1,20 – 2,00 NPB/komórkę) niezależnie od działającego roztworu srebra była wyższa niż po 24h (0,33 – 0,63 NPB/komórkę) jego działania. Analiza średniej liczby NPB/komórkę u psa domowego wykazała istotny wpływ czasu ekspozycji na działanie badanych roztworów srebra. Obserwowanie różnice w wartości średniej liczby NPB/komórkę pomiędzy czasem ekspozycji 3h i 24h odpowiednio dla każdego roztworu srebra były wysoce istotne ($p < 0,01$). Po ekspozycji komórek krwi lisa polarnego na roztwory srebra stwierdzono średnią liczbę NPB na poziomie 0,40 – 0,60 NPB/komórkę po 3h oraz 0,47 – 2,77 NPB/komórkę po 24h. Dla limfocytów lisa polarnego wysoką istotność różnic ($p < 0,01$) stwierdzono tylko w jednym przypadku – między 3h a 24h ekspozycji na AgNO₃. W przypadku działania AgNP i AgNP+C nie wykazano wpływu czasu ekspozycji na poziom NPB/komórkę.

NBUD zidentyfikowano w komórkach psa domowego na poziomie 1,17 – 3,00 NBUD/komórkę po 3h w porównaniu do 0,67 – 1,30 NBP/komórkę po 24h ekspozycji. Dla każdego badanego roztworu srebra wyższą częstotliwość NBUD obserwowano po krótszym czasie ekspozycji. Ocena występowania pąków jądrowych w komórkach psa domowego wykazała wysoce istotny wpływ ($p < 0,01$) czasu ekspozycji tylko w przypadku działania AgNP między 3h a 24h. Różnice w średniej liczbie NBUD/komórkę obserwowane między czasami ekspozycji dla AgNP+C i AgNO₃ nie były wysoce istotne. W limfocytach lisa polarnego stwierdzono występowanie NBUD na średnim poziomie 0,60 – 1,35 NBUD/komórkę po 3h ekspozycji oraz 1,57 – 2,30 NBUD/komórkę po 24h. W każdym badanym związku srebra częstsze uszkodzenia w postaci NBUD obserwowano po dłuższym okresie ekspozycji komórek. Natomiast analiza przeprowadzona na komórkach lisa polarnego wykazała wysoce istotny wpływ czasu ekspozycji 3h i 24h na działanie AgNP i AgNP+C ($p < 0,01$).

Następnie w ramach doświadczenia sprawdzono znaczenie poszczególnych wariantów – roztworu srebra, dawki i czasu na indukowanie zmian w obrębie chromatyny, w postaci NPB (Tabela 18) oraz NBUD (Tabela 19).

Tabela 18. Średnia liczba NPB w komórkach w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji

dawka		Pies domowy			Lis polarny		
		5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
Wpływ czasu	3h	1,70±1,95	2,00±1,05	2,30±2,31 ^a	0,10±0,32	0,40±0,70	0,70±2,21
	24h	1,00±0,94	0,90±0,74	0,00±0,00 ^a	0,80±1,03	1,30±1,06	0,40±1,26
AgNP	3h	1,40±1,26	1,60±1,43	0,60±0,97	0,80±2,20	0,60±1,26	0,40±0,97
	24h	0,40±0,70	0,40±0,52	0,30±0,67	0,90±1,29	0,40±0,70	0,10±0,32
AgNP+C	3h	2,00±1,63 ^b	1,40±2,06	0,50±0,85	1,10±1,52	0,10±0,32	0,30±0,48
	24h	0,30±0,48 ^b	0,20±0,42	0,50±1,27	3,10±3,78	4,10±4,33	1,10±0,99
AgNO ₃	3h	2,00±1,63 ^b	1,40±2,06	0,50±0,85	1,10±1,52	0,10±0,32	0,30±0,48
	24h	0,30±0,48 ^b	0,20±0,42	0,50±1,27	3,10±3,78	4,10±4,33	1,10±0,99

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w liczbie NPB/komórkę

ab – wartości oznaczone tymi samymi literami różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Średnia liczba NPB/komórkę w próbkach pochodzących od psa domowego w poszczególnych grupach doświadczalnych zmieniała się od 0,02 do 2,30 NPB/komórkę. Nie stwierdzono obecności mostków nukleoplazmatycznych w komórkach psa domowego traktowanych roztworem AgNP w stężeniu 20 µg/ml

przez 24h ekspozycji. Analiza wykonana na komórkach psa domowego wykazała istotny wpływ roztworu – jego dawki i czasu działania tylko w dwóch przypadkach. Obserwowane różnice w średniej liczbie NBP/komórkę pomiędzy czasem ekspozycji 3h a 24h dla AgNP 20 µg/ml oraz między 3h a 24h dla AgNO₃ 5 µg/ml były wysoce istotne (p<0,01). W pozostałych wariantach dawki i roztworu srebra nie stwierdzono wysokiej istotności pomiędzy czasem ich działania na komórki psa domowego.

W komórkach pochodzących od lisa polarnego stwierdzono średnią liczbę NPB/komórkę w zakresie 0,10 – 4,10 w analizowanych wariantach roztworów srebra/dawki i czasu ekspozycji. Najwyższą częstotliwością występowania mostków nukleoplazmatycznych charakteryzowały się próbki po 24h ekspozycji na AgNO₃ niezależnie od jego dawki. Natomiast dla komórek lisa polarnego analiza nie wykazała wpływu zależności roztworu srebra – dawki – czasu ekspozycji na średnią liczbę NPB/komórkę. Obserwowane różnice w wartości NPB/komórkę pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczalnymi nie różniły się wysoce istotnie.

Tabela 19. Średnia liczba NBUD w komórkach w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji

Wpływ czasu	dawka	Pies domowy			Lis polarny		
		5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
AgNP	3h	2,60±1,95	3,60±1,26 ^a	2,80±1,40 ^b	0,70±1,34	0,60±0,97	0,50±1,27
	24h	1,80±1,62	1,10±0,87 ^a	0,90±1,10 ^b	2,30±1,83	1,50±1,58	0,90±1,10
AgNP+C	3h	2,70±1,64	1,60±1,62	1,60±0,97 ^c	0,20±0,42 ^A	1,20±1,62	0,90±1,73
	24h	2,10±1,60	1,50±1,18	0,30±0,67 ^c	2,50±1,90 ^A	3,30±3,94	1,10±1,20
AgNO ₃	3h	2,10±1,20	1,30±1,77	0,10±0,32	1,90±1,97	1,00±2,21	0,50±0,97
	24h	0,70±0,95	0,60±1,07	0,70±1,64	1,80±2,48	1,70±2,00	1,70±1,95

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w liczbie NBUD/komórkę
abc/A – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku różnią się wysoce istotnie przy p<0,01

Występowanie komórek dwujądźrzastych z pąkami jądrowymi w limfocytach psa domowego określono na poziomie 0,10 – 3,60 NBUD/komórkę. Natomiast analiza średniej liczby NBUD/komórkę w próbach pochodzących od psa domowego wykazała istotną zależność roztworu srebra – dawki oraz czasu działania w trzech przypadkach. Wysoką istotność różnic w średniej liczbie NBUD/komórkę stwierdzono pomiędzy 3h a 24h ekspozycji dla AgNP 10 µg/ml i AgNP 20 µg/ml oraz AgNP+C 20 µg/ml

($p < 0,01$). W pozostałych wariantach doświadczalnych nie wykazano wysoce istotnych różnic.

W limfocytach lisa polarnego zaobserwowano występowanie nieprawidłowych komórek z pąkami jądrowymi na poziomie od 0,20 do 3,30 NBUD/komórkę. Badania przeprowadzone na komórkach lisa polarnego na tym etapie analizy wykazały tylko w jednym przypadku istotną zależność roztworu srebra – dawki – czasu działania. Wysoce istotne różnice w średniej liczbie NBUD/komórkę stwierdzono pomiędzy ekspozycją 3h a 24h dla 5 $\mu\text{g/ml}$ AgNP+C ($p < 0,01$). Pozostałe warianty stężeń i związków koloidalnych srebra nie różniły się wysoce istotnie.

W ramach testu CBMN zwrócono uwagę na występujące w badanych próbach komórki wielojądrzaste – Multi NC (MNC) (Fot. 6. f – w komórkach psa domowego oraz Fot. 7. f – w komórkach lisa polarnego). Ich obecność jest powiązana z zaburzeniami podziałów komórkowych, co wiąże się ze zmianami integralności chromatyny. W poszczególnych etapach analizy wpływu roztworów koloidalnych srebra na stabilność chromatyny jądrowej określano również średnią liczbę komórek wielojądrzastych w komórkach krwi. Dane dotyczące wpływu badanych związków srebra na ten czynnik przedstawiono w Tabeli 20.

Tabela 20. Średnia liczba komórek wielojądrzastych w komórkach krwi po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych gatunków psowatych

Grupa doświadczalna	Pies domowy	Lis polarny
Kontrola	37,90±32,85 ^{ab}	22,00±19,21
AgNP	8,88±13,05	7,30±11,42
AgNP+C	6,37±10,15 ^a	6,80±10,28
AgNO ₃	4,10±8,78 ^b	6,57±8,42

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w liczbie MNC/komórkę

ab – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Po przeprowadzonej analizie stwierdzono bardzo wysoką wartość średniej liczby MNC/komórkę w przypadku grup kontrolnych u obu gatunków doświadczalnych (37,90±32,85 MNC/komórkę w limfocytach psa domowego oraz 22,00±19,21 MNC/komórkę w limfocytach lisa polarnego). W komórkach pobranych od psa domowego istotny wpływ roztworu na liczbę komórek wielojądrzastych wykazano

w przypadku dwóch grup po ekspozycji na roztwory srebra w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wysoce istotne różnice stwierdzono pomiędzy grupą kontrolą a grupą po ekspozycji na AgNP+C oraz między grupą kontrolą a grupą po ekspozycji na AgNO₃ (p<0,01). W przypadku próbek pochodzących od lisa polarnego nie wykazano wpływu roztworu srebra na poziom indukowanych komórek wielojądrzastych. Obserwowane różnice w średniej liczbie MNC/komórkę nie różniły się wysoce istotnie. Po ekspozycji na badane związki srebra w komórkach zaobserwowano występowanie Multi NC na poziomie 4,10 – 8,88 MNC/komórkę w limfocytach psa domowego oraz 6,57 – 7,30 MNC/komórkę w limfocytach lisa polarnego, czyli kilkukrotnie niższym niż w próbie kontrolnej.

W dalszej analizie występowania Multi NC zbadano wpływ dawki działającego roztworu koloidalnego srebra na poziom uszkodzeń w komórkach. Dane zgromadzono w Tabeli 21.

Tabela 21. Średnia liczba komórek wielojądrzastych w komórkach krwi w zależności od dawki roztworów srebra u badanych *Canidae*

Roztwór / dawka		Pies domowy	Lis polarny
AgNP	5 µg/ml	13,00±21,31	8,45±15,53
	10 µg/ml	9,35±11,99	9,05±9,07
	20 µg/ml	4,30±7,56	4,40±8,22
AgNP+C	5 µg/ml	10,45±14,01	5,95±12,85
	10 µg/ml	5,55±8,67	10,05±10,53
	20 µg/ml	3,10±4,38	4,40±5,88
AgNO ₃	5 µg/ml	18,33±25,48	7,40±9,60
	10 µg/ml	1,50±3,63	8,70±9,00
	20 µg/ml	2,25±4,09	3,60±5,69

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w liczbie MNC/komórkę

W przypadku komórek psa domowego zidentyfikowano występowanie uszkodzeń na poziomie od 1,50 do 18,33 MNC/komórkę. Najwyższe wartości średniej liczby MNC/komórkę obserwowano przy stężeniu 5 µg/ml dla każdego roztworu srebra, to jest AgNP, AgNP+C oraz AgNO₃ w odniesieniu do pozostałych dawek. Dla limfocytów lisa polarnego komórki wielojądrzaste określono na poziomie od 3,60 do 10,05 MNC/komórkę. Dla obu badanych gatunków psowatych analiza nie wykazała

wpływu dawki poszczególnych roztworów srebra na poziom indukowanych Multi NC w komórkach krwi obwodowej. Średnie MNC/komórkę nie różniły się wysoce istotnie między dawkami związków srebra.

W dalszej części prowadzonego doświadczenia określano wpływ czasu ekspozycji komórek na roztwory srebra na poziom indukowanych Multi NC. Szczegółowe dane dotyczące tej części analiz przedstawiono w Tabeli 22.

Tabela 22. Średnia liczba komórek wielojądrzastych w komórkach krwi w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych

Roztwór / czas ekspozycji		Pies domowy	Lis polarny
AgNP	3h	12,73±16,36	5,00±8,19
	24h	5,03±6,94	9,60±14,21
AgNP+C	3h	9,27±13,05	4,67±5,90
	24h	3,47±4,70	8,93±13,08
AgNO ₃	3h	6,33±11,45	5,50±7,76
	24h	1,87±3,93	7,63±9,05

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w liczbie MNC/komórkę

Występowanie komórek wielojądrzastych w limfocytach psa domowego stwierdzono na poziomie od 1,87 do 12,73 MNC/komórkę. Dla każdego roztworu srebra wyższe wartości parametru obserwowano po ekspozycji 3 godzinnej. W przypadku komórek lisa polarnego określono występowanie MNC na poziomie od 4,67 do 9,60 MNC/komórkę. Z kolei, dla tego gatunku wyższe wartości parametru odnotowano dla każdego badanego roztworu srebra po dłuższym czasie ekspozycji (24h). Analiza czasu ekspozycji nie wykazała jego wpływu na poziom indukowanych Multi NC u obu gatunków psowatych. Różnice obserwowane dla poszczególnych roztworów srebra między ekspozycją 3h a 24h nie były wysoce istotne.

W ostatnim etapie doświadczenia analizie poddano wpływ poszczególnych wariantów roztworu srebra – dawki – czasu ekspozycji na poziom indukowanych komórek wielojądrzastych w limfocytach. Szczegółowe dane zebrano w Tabeli 23.

Tabela 23. Średnia liczba komórek wielojądrzastych w komórkach krwi w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji

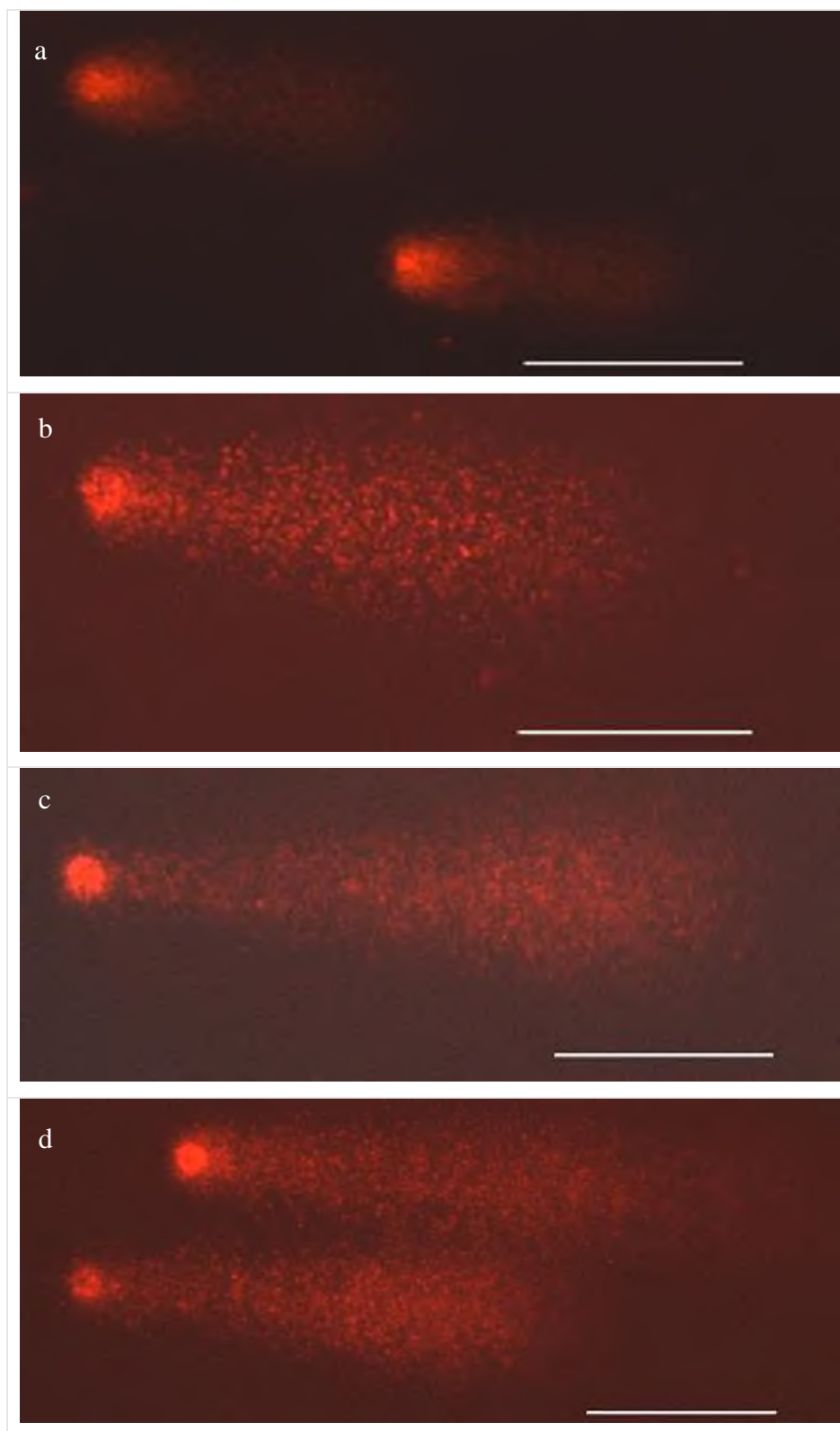
dawka		Pies domowy			Lis polarny		
		5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
AgNP	3h	19,90±21,31	11,10±14,77	7,20±9,79	4,70±10,28	7,70±5,77	2,60±3,81
	24h	6,10±6,89	7,60±8,87	1,40±2,46	12,20±19,30	10,40±11,68	6,20±11,00
AgNP+C	3h	14,40±18,57	8,30±11,29	5,10±5,15	1,80±2,70	7,70±5,81	4,50±7,18
	24h	6,50±5,90	2,80±3,79	1,10±2,23	10,10±17,41	12,40±13,71	4,30±4,62
AgNO ₃	3h	14,20±16,88	2,90±4,84	1,90±3,21	7,80±11,46	6,30±5,56	2,40±3,81
	24h	2,90±4,43	0,10±0,32	2,60±4,97	7,00±7,93	11,10±11,29	4,80±7,11

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w liczbie MNC/komórkę

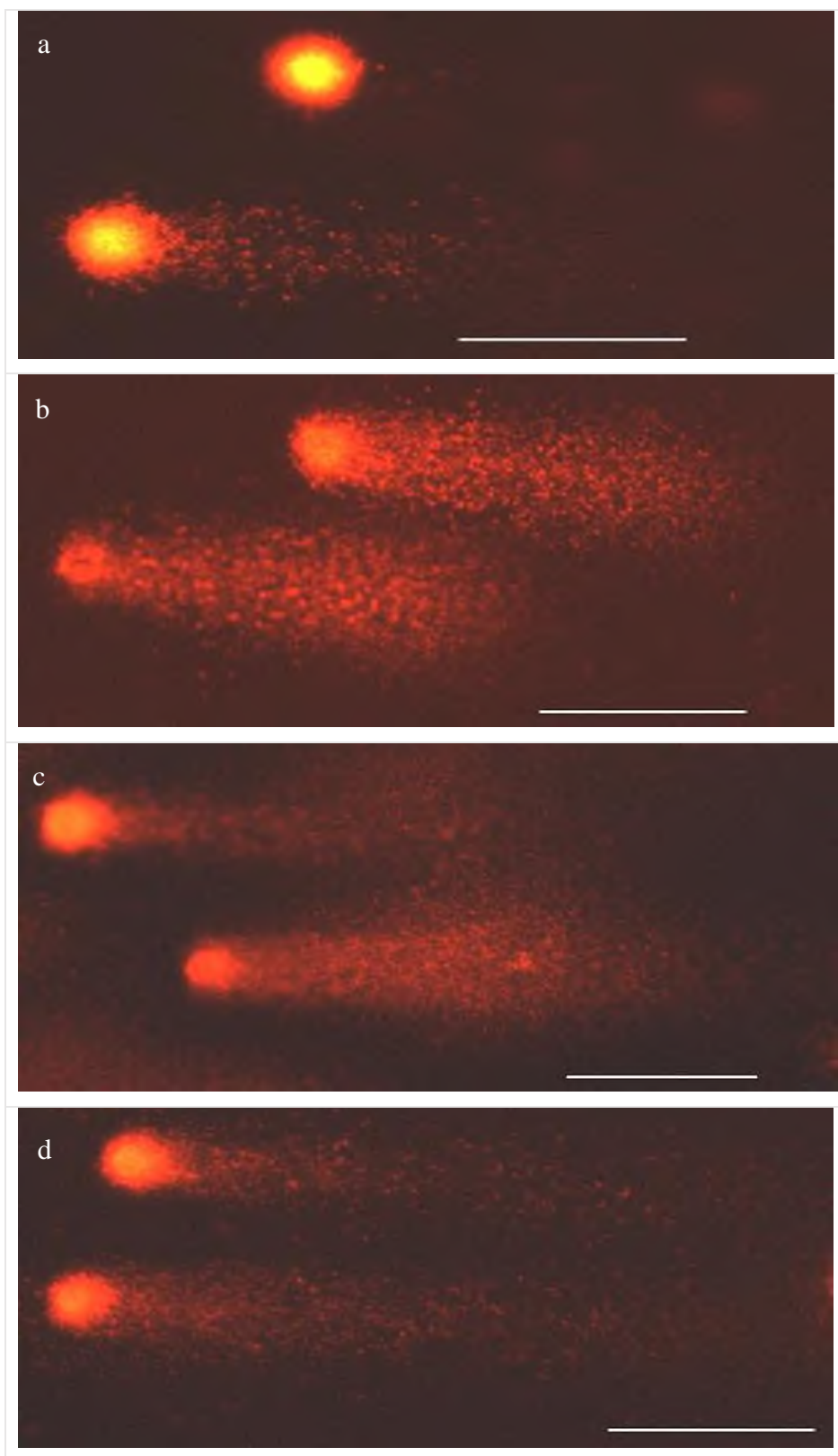
Średnią liczbę komórek wielojądrzastych w próbkach pochodzących od psa domowego określono na poziomie 0,10 – 19,90 MNC/komórkę. Natomiast dla prób pochodzących od lisa polarnego wartości tego parametru odnotowano w zakresie od 1,80 do 12,40 MNC/komórkę. Analiza poziomu uszkodzeń nie wykazała wpływu zależności roztworu srebra od dawki i od czasu ekspozycji. Średnia liczba MNC/komórkę pomiędzy poszczególnymi wariantami doświadczalnymi, to jest między roztworem koloidalnym srebra/dawką/czasem ekspozycji nie różniły się wysoce istotnie.

4.4. Test kometowy

Analizę ilościową rzeczywistej zmiany integralności chromatyny jądrowej oceniono przy pomocy procentowej zawartości DNA w ogonie komety w badanych komórkach. Zaburzenia integralności chromatyny oceniano przy użyciu testu kometowego na kilku etapach doświadczenia. W pierwszej kolejności sprawdzono wpływ roztworów AgNP, AgNP+C oraz AgNO₃ na zawartość DNA w ogonie komety w odniesieniu do próby kontrolnej (Tabela 24, Fot. 8 i 9.)



Fot. 8. Limfocyty psa domowego po teście kometowym, barwione bromkiem etydyny, z poszczególnych grup doświadczalnych: a) grupa kontrolna; b) po ekspozycji na AgNP; c) po ekspozycji na AgNP+C; d) po ekspozycji na AgNO₃. Powiększenie 400x, skala 10 μm.



Fot. 9. Limfocyty lisa polarnego po teście kometowym, barwione bromkiem etydyny, z poszczególnych grup doświadczalnych: a) grupa kontrolna; b) po ekspozycji na AgNP; c) po ekspozycji na AgNP+C; d) po ekspozycji na AgNO₃. Powiększenie 400-krotne, skala 10 μm.

Tabela 24. Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w komórkach krwi obwodowej po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych gatunków psowatych

Grupa doświadczalna	Pies domowy	Lis polarny
Kontrola	18,67±17,75 ^{abc}	17,65±11,72 ^{ABC}
AgNP	39,43±29,21 ^{ade}	33,75±23,23 ^A
AgNP+C	35,33±28,59 ^{be}	31,97±22,83 ^{BD}
AgNO ₃	33,37±23,39 ^{cd}	32,98±19,35 ^{CD}

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w %
 abcde/ABC – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w próbkach pochodzących od psa domowego po ekspozycji na działanie roztworów koloidalnych srebra kształtowała się na poziomie 33,37 – 39,43%, a w przypadku komórek pobranych od lisa polarnego w zakresie 31,97 – 33,75%. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono istotny wpływ związku srebra na procentową zawartość DNA w ogonie komety w limfocytach obu badanych gatunków. W próbkach pochodzących od psa domowego i lisa polarnego stwierdzono wysoce istotne różnice w średniej procentowej zawartości DNA w ogonie komety pomiędzy badanymi roztworami srebra a próbą kontrolną ($p < 0,01$). Dodatkowo, w próbkach pochodzących od psa domowego, wysoce istotne różnice obserwowano pomiędzy roztworami koloidalnymi srebra: AgNP a AgNP+C, AgNP a AgNO₃, natomiast różnice między AgNP+C a AgNO₃ w procentowej zawartości DNA w ogonie komety nie były istotne. W limfocytach lisa polarnego stwierdzono wysoce istotne różnice procentowej zawartości DNA w ogonie komety pomiędzy próbkami poddanymi ekspozycji na AgNP+C a AgNO₃ ($p < 0,01$).

Dalsza analiza w teście kometowym polegała na określeniu wpływu dawki zastosowanych roztworów koloidalnych srebra na wzrost procentowej zawartości DNA w ogonie komety. Wyniki uzyskane dla tego etapu przedstawiono w Tabeli 25.

Tabela 25. Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w komórkach krwi w zależności od dawki roztworów srebra u badanych gatunków psowatych

Roztwór / dawka		Pies domowy	Lis polarny
AgNP	5 µg/ml	38,81±27,43	30,27±21,62 ^A
	10 µg/ml	38,71±29,31	37,93±24,47 ^{AB}
	20 µg/ml	38,45±30,04	33,05±22,89 ^B
AgNP+C	5 µg/ml	36,99±28,86 ^a	34,28±23,73 ^C
	10 µg/ml	36,74±27,87 ^b	31,58±22,42
	20 µg/ml	32,26±28,71 ^{ab}	30,05±22,12 ^C
AgNO ₃	5 µg/ml	34,87±23,67 ^c	33,97±19,98
	10 µg/ml	31,96±23,94 ^c	33,98±20,58
	20 µg/ml	33,29±22,47	30,99±17,18

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w %

abc/ABC – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Po ekspozycji komórek na różne warianty stężeń badanych roztworów srebra średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w limfocytach psa domowego mieściła się w zakresie 31,96 – 38,81%. Dla każdego roztworu srebra najwyższe wartości procentowej zawartości DNA w ogonie komety określano po ekspozycji na dawkę 5 µg/ml. Stwierdzono istotny wpływ dawki roztworu koloidalnego w próbkach pochodzących od psów domowych w trzech przypadkach. Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety różniła się wysoce istotnie w przypadku roztworu AgNP+C między stężeniami 5 a 20 µg/ml oraz między 10 a 20 µg/ml, a także w przypadku stężeń 5 i 10 µg/ml dla roztworu AgNO₃ ($p < 0,01$). W pozostałych przypadkach nie stwierdzono wysoce istotnych różnic.

Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w próbkach pochodzących od lisa polarnego w analizowanych stężeniach związków srebra kształtowała się na poziomie 30,05 – 37,93%. Dla lisa polarnego również w trzech wariantach stężeń badanych roztworów srebra stwierdzono istotny wpływ dawki roztworu koloidalnego na zmianę integralności chromatyny jądrowej. Wysoce istotne różnice w średniej procentowej zawartości DNA ogonie komety występowały w przypadku roztworu AgNP pomiędzy dawką 5 a 10 µg/ml oraz 10 a 20 µg/ml, a także dla roztworu AgNP+C między 5 a 20 µg/ml ($p < 0,01$). W pozostałych wariantach dawek roztworów srebra różnice nie były wysoce istotne.

Trzecim etapem analizy próbek w teście kometowym było określenie wpływu czasu ekspozycji limfocytów krwi na działanie AgNP, AgNP+C i AgNO₃. Uśrednione dane pochodzące z tego etapu przedstawiono w Tabeli 26.

Tabela 26. Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w komórkach krwi w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych

Roztwór / czas ekspozycji		Pies domowy	Lis polarny
AgNP	3h	39,50±27,47	33,83±21,26
	24h	39,35±30,86	33,67±25,06
AgNP+C	3h	37,88±28,74 ^a	33,81±22,77 ^A
	24h	32,78±28,16 ^a	30,13±22,75 ^A
AgNO ₃	3h	33,37±21,12	34,61±17,74 ^B
	24h	33,38±25,47	31,35±20,71 ^B

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w %

a/AB – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku różnią się wysoce istotnie przy p<0,01

Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w komórkach pochodzących od psa domowego po ekspozycji 3h wahała się od 33,37 do 39,50% DNA w ogonie komety, a po 24h 32,78 do 39,35% DNA w ogonie komety. Analiza czasu ekspozycji limfocytów krwi na działanie AgNP i AgNO₃ u psa domowego nie wykazała istotnego wpływu na zmianę poziomu integralności chromatyny, jako średniej wartości procentowej zawartości DNA w ogonie komety. Jedynie dla roztworu AgNP+C różnice w średniej procentowej zawartości DNA w ogonie komety między 3h ekspozycji a 24h były wysoce istotne (p<0,01).

Wartość średniej procentowej zawartości DNA w ogonie komety w przypadku próbek pochodzących od lisa polarnego określono na średnim poziomie 33,81 – 34,61% DNA w ogonie komety po 3h ekspozycji oraz 30,13 – 33,67% DNA w ogonie komety po 24h. Dla lisa polarnego stwierdzono wpływ czasu ekspozycji limfocytów krwi obwodowej na poziom uszkodzeń chromatyny po działaniu AgNP+C i AgNO₃. Odpowiednio dla każdego z tych dwóch roztworów srebra różnice obserwowane pomiędzy 3h a 24h ekspozycji były wysoce istotne (p<0,01). Tylko w przypadku AgNP czas jego działania na komórki nie był wysoce istotny.

Ostatnia część analizy na podstawie parametru procentowej zawartości DNA w ogonie komety była związana z określeniem zależności trzech badanych czynników: dawki (5, 10, 20 µg/ml), czasu ekspozycji (3 i 24h) oraz roztworu koloidalnego srebra (AgNP, AgNP+C, AgNO₃) na poziom zmian integralności chromatyny jądrowej. Wyniki uzyskane z tego etapu przedstawiono w Tabeli 27.

Tabela 27. Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w komórkach w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji

Wpływ czasu	Pies domowy			Lis polarny			
	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	
AgNP	3h	45,05±27,84 ^a	39,72±27,39	33,75±26,02 ^b	28,85±19,76	40,85±22,58 ^A	31,80±19,47
	24h	37,22±28,04 ^a	37,70±31,10	43,15±32,94 ^b	31,69±23,27	35,02±25,92 ^A	34,31±25,82
AgNP+C	3h	41,13±28,98 ^c	37,81±28,37	34,70±28,55 ^d	36,95±21,30 ^c	33,99±23,55 ^B	30,49±22,31
	24h	32,86±28,17 ^c	35,67±27,35	29,82±28,68 ^d	31,61±25,09 ^c	29,17±20,99 ^B	29,61±21,94
AgNO ₃	3h	36,72±22,84 ^e	30,19±20,00	33,19±19,91 ^f	33,61±19,26	36,49±17,37 ^D	33,74±16,33 ^E
	24h	33,02±24,35 ^e	33,73±27,22	33,39±24,79 ^f	34,32±20,68	31,47±23,09 ^D	28,25±17,58 ^E

średnia ± odchylenie standardowe wyrażone w %

abcdef/ABCDE – wartości oznaczone tymi samymi literami pomiędzy wierszami w obrębie wybranego stężenia i danego gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w analizowanych wariantach doświadczalnych to jest: roztworu srebra, dawki i czasu ekspozycji, w komórkach pobranych od psa domowego mieściła się w przedziale od 29,82 do 45,05%. Stwierdzono istotny wpływ dawki 5 µg/ml i 20 µg/ml na poziom integralności chromatyny jądrowej w przypadku wszystkich trzech roztworów koloidalnych w próbkach pobranych od psów domowych. Różnice w średniej procentowej zawartości DNA obserwowane odpowiednio dla 5 i 20 µg/ml przy dwóch czasach ekspozycji 3h i 24h po działaniu AgNP, AgNP+C i AgNO₃ były wysoce istotne ($p < 0,01$). Przy stężeniu 10 µg/ml nie stwierdzono wpływu czasu ekspozycji i roztworu srebra na poziom zaburzeń struktury chromatyny.

W komórkach pochodzących od lisa polarnego średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w analizowanych wariantach doświadczalnych: roztworu srebra, dawki i czasu ekspozycji, wynosiła od 28,25 do 40,85%. W przypadku stężenia 10 µg/ml stwierdzono znaczący wpływ czasu ekspozycji komórek oraz działającego na nie roztworu srebra. Przy zastosowaniu AgNP, AgNP+C i AgNO₃ różnice

w procentowej zawartości DNA w ogonie komety pomiędzy czasem ekspozycji 3h a 24h obserwowane przy 10 µg/ml były wysoce istotne ($p < 0,01$). W przypadku stężenia 5 µg/ml istotny wpływ czasu i roztworu stwierdzono tylko dla prób poddanych ekspozycji na AgNP+C. Natomiast przy stężeniu 20 µg/ml wysoce istotne różnice w zależności od czasu wykazano jedynie dla AgNO₃. W pozostałych wariantach dawki, czasu i roztworu nie wykazano wysokiej istotności różnic.

W ramach testu kometowego przeprowadzono ocenę stabilności chromatyny jądrowej na podstawie wykonanych pomiarów parametru uzupełniającego jakim jest moment ogonowy TM. W tym przypadku analiza zależności również przebiegała na czterech poziomach. Początkowo określono wpływ roztworów srebra na wartość TM w odniesieniu do grupy kontrolnej. Wyniki analizy zamieszczono w Tabeli 28.

Tabela 28. Średnia wartość momentu ogonowego w komórkach krwi obwodowej po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych gatunków psowatych

Grupa doświadczalna	Pies domowy	Lis polarny
Kontrola	30,71±51,00 ^{abc}	19,06±19,18 ^{ABC}
AgNP	47,21±58,17 ^{ade}	30,97±33,21 ^{AD}
AgNP+C	43,44±58,61 ^{bdf}	27,07±32,96 ^{BDE}
AgNO ₃	50,83±54,57 ^{cef}	27,89±27,70 ^{CE}

średnia ± odchylenie standardowe momentu ogonowego
 abcdef/ABCDE – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

W komórkach psa domowego po ekspozycji na roztwory srebra średnia wartość TM wahała się w zakresie od 43,44 do 50,83. Stwierdzono wysoce istotne różnice między roztworami koloidalnymi srebra działającymi na komórki. Obserwowane różnice w grupach po ekspozycji na poszczególne związki srebra a grupą kontrolną były wysoce istotne ($p < 0,01$). Dodatkowo, w limfocytach psa domowego stwierdzono także, że różnice średniej wartości TM pomiędzy badanymi roztworami: AgNP a AgNP+C, AgNP a AgNO₃ oraz AgNP+C a AgNO₃ były wysoce istotne ($p < 0,01$).

Dla prób pochodzących od lisa polarnego średnia wartość momentu ogonowego w komórkach po ekspozycji wahała się od 27,07 do 30,97. Średnie wartości TM po ekspozycji na poszczególne roztwory koloidalne srebra w odniesieniu do grupy

kontrolnej różniły się wysoce istotnie. Stwierdzono wysoce istotne różnice średnich TM między AgNP a AgNP+C oraz AgNP+C a AgNO₃ (p<0,01).

Analogicznie jak w przypadku średniej procentowej zawartości DNA w ogonie komety, w kolejnym etapie podjęto próbę określenia wpływu dawki roztworów koloidalnych srebra na stabilność chromatyny (Tabela 29).

Tabela 29. Średnia wartość momentu ogonowego w komórkach w zależności od dawki roztworów srebra u badanych gatunków psowatych

Roztwór / dawka		Pies domowy	Lis polarny
AgNP	5 µg/ml	54,39±59,53 ^{ab}	29,85±36,01 ^A
	10 µg/ml	45,65±55,84 ^{ac}	32,18±29,86 ^A
	20 µg/ml	41,61±58,39 ^{bc}	30,88±33,46
AgNP+C	5 µg/ml	45,61±58,36 ^e	27,44±29,37
	10 µg/ml	46,49±59,44 ^d	26,97±35,96
	20 µg/ml	38,22±57,72 ^{de}	26,79±33,25
AgNO ₃	5 µg/ml	53,35±51,80 ^f	29,05±29,07
	10 µg/ml	48,82±57,36 ^f	28,32±27,84
	20 µg/ml	50,32±54,36	26,30±26,05

średnia ± odchylenie standardowe

abcde/A – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku różnią się wysoce istotnie przy p<0,01

Średnią wartość momentu ogonowego w komórkach pobranych od psa domowego w analizowanych wariantach roztworu srebra i jego stężeń określono na poziomie 38,22 – 54,39. W próbach pochodzących od psa domowego wykazano wpływ dawki roztworu srebra na średnią wartość TM. Wysoce istotne różnice obserwowano w przypadku wszystkich wariantów stężeń dla AgNP. Dla AgNP+C stwierdzono wysoce istotne różnice średnich TM między 10 a 20 µg/ml oraz między 5 a 20 µg/ml. Natomiast w przypadku ostatniego związku, AgNO₃, wysoką istotność różnic wykazano pomiędzy stężeniami 5 i 10 µg/ml (p<0,01).

Dla prób pochodzących od lisa polarnego w analizowanych wariantach roztworu koloidalnego srebra i dawki średnią wartość TM określono jako wynoszącą 26,30 – 32,18. W przypadku limfocytów lisa polarnego w większości porównywanych wariantów roztworu srebra i stężenia, nie stwierdzono wpływu dawki roztworu srebra

na zmianę integralności chromatyny. Tylko w przypadku roztworu AgNP różnice obserwowane między 5 a 10 µg/ml były wysoce istotne ($p < 0,01$). Pozostałe warianty stężeń i roztworów srebra nie wykazywały wysokiej istotności różnic.

Dalsza analiza była związana ze zbadaniem wpływu czasu ekspozycji (3 i 24h) na zwiększenie zmian integralności chromatyny jądrowej. Szczegółowe dane z tej części badań przedstawiono w Tabeli 30.

Tabela 30. Średnia wartość momentu ogonowego w komórkach w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych

Roztwór / czas ekspozycji		Pies domowy	Lis polarny
AgNP	3h	48,79±59,64 ^a	31,78±31,57 ^A
	24h	45,64±56,64 ^a	30,15±34,76 ^A
AgNP+C	3h	48,13±60,19 ^b	29,77±35,25 ^B
	24h	38,75±56,62 ^b	24,36±30,26 ^B
AgNO ₃	3h	52,37±53,80 ^c	30,42±25,26 ^C
	24h	49,30±55,30 ^c	25,36±29,73 ^C

średnia ± odchylenie standardowe

abc/ABC – wartości oznaczone tymi samymi literami w obrębie gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

Średnią wartość momentu ogonowego w próbach traktowanych badanymi roztworami koloidalnymi srebra po ekspozycji 3h określono na poziomie 48,13 – 52,37 w komórkach psa domowego, a w komórkach lisa polarnego jako wynoszącą 29,77 – 31,78. Dla 24-godzinnej ekspozycji odnotowano średnie wartości TM w zakresie 38,75 – 49,30 w limfocytach psa domowego oraz 24,36 – 30,15 w limfocytach lisa polarnego. Dla obu badanych gatunków psowatych stwierdzono istotny wpływ czasu ekspozycji komórek krwi na działanie AgNP, AgNP+C oraz AgNO₃. Zarówno dla komórek pochodzących od psa domowego jak i lisa polarnego, w każdym badanym roztworze srebra obserwowane różnice w średniej wartości TM między 3h ekspozycji a 24h były wysoce istotne ($p < 0,01$).

Ostatnia część analizy średniej wartości momentu ogonowego była związana z określeniem wpływu dawki-czasu ekspozycji-roztworu koloidalnego srebra na

integralność chromatyny jądrowej w limfocytach psa domowego i lisa polarnego. Dane pochodzące z tej analizy przedstawiono w Tabeli 31.

Tabela 31. Średnia wartość momentu ogonowego w komórkach krwi w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji

dawka		Pies domowy			Lis polarny		
		5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml
AgNP	3h	58,71±58,15 ^a	51,91±59,93 ^b	35,78±58,61 ^c	29,11±33,50	36,14±30,11 ^A	30,10±30,60
	24h	50,08±60,64 ^a	39,40±50,72 ^b	47,43±57,65 ^c	30,58±38,38	28,22±29,10 ^A	31,65±36,11
AgNP+C	3h	52,80±58,10 ^d	49,10±62,82	42,47±59,31 ^e	29,44±25,12 ^B	30,78±41,30	29,10±37,35
	24h	38,41±57,78 ^d	43,87±55,91	39,97±55,82 ^e	25,44±32,98 ^B	23,16±29,21	24,48±28,41
AgNO ₃	3h	58,62±54,63 ^f	47,01±53,11	51,46±53,12	29,04±22,84	31,39±23,38 ^C	30,84±29,08 ^D
	24h	48,08±48,30 ^f	50,63±61,31	49,18±55,59	29,05±29,07	28,32±27,84 ^C	26,30±26,05 ^D

średnia ± odchylenie standardowe

abcdef/ABCD – wartości oznaczone tymi samymi literami pomiędzy wierszami w obrębie wybranego stężenia, roztworu srebra i danego gatunku różnią się wysoce istotnie przy $p < 0,01$

W analizowanych wariantach doświadczalnych roztworu koloidalnego srebra, dawki oraz czasu ekspozycji, średnią wartość TM w komórkach psa domowego określono na poziomie 35,78 – 58,71. W próbkach pochodzących od psa domowego stwierdzono występowanie zależności dawki od czasu ekspozycji i działającego roztworu srebra na średnią wartość TM. Zależność potwierdzono we wszystkich wariantach roztworu i czasu ekspozycji przy stężeniu 5 µg/ml. Różnice obserwowane w tych przypadkach między ekspozycją 3h a 24h były wysoce istotne ($p < 0,01$). Dla stężenia 10 µg/ml istotność różnic w średniej wartości TM pomiędzy czasami ekspozycji 3 i 24h wykazano po działaniu AgNP. Stężenie 20 µg/ml charakteryzowało się wysoką istotnością różnic w działaniu AgNP i AgNP+C pomiędzy ekspozycją trwającą 3h a 24h ($p < 0,01$).

Dla próbek pozyskanych od lisa polarnego średnią wartość TM określono w zakresie 23,16 – 36,14. Stwierdzono występowanie wysoce istotnych różnic w pojedynczych wariantach roztworu srebra, stężenia i czasu ekspozycji. W przypadku stężenia 5 µg/ml wysoce istotne różnice wykazano po działaniu AgNP+C pomiędzy dwoma okresami ekspozycji komórek. Stężenie 10 µg/ml charakteryzowało się wysoką istotnością różnic po ekspozycji 3h i 24h dla AgNP oraz AgNO₃. Natomiast dla najwyższego badanego stężenia, 20 µg/ml, wysoce istotne różnice między czasem

ekspozycji określono dla związku AgNO_3 ($p < 0,01$). W pozostałych badanych wariantach roztworu koloidalnego srebra, dawki i czasu ekspozycji nie wykazano wysoce istotnych różnic w średniej wartości momentu ogonowego.

5. Dyskusja

Zmiany integralności w strukturalnej budowie chromatyny jądrowej obserwowane są na każdym poziomie jej organizacji, od zwiększonej częstotliwości mutacji punktowych, przez pęknięcia nici DNA do niestabilności chromosomów (Yao i Dai 2014). Niestabilności chromosomowe oraz zaburzenia w strukturze DNA mogą być uznane za biomarker narażenia organizmu na działanie czynnika genotoksycznego i stanowią istotne narzędzie w biomonitoringu środowiskowym. Czynniki toksyczne powodują uszkodzenia chromosomów w komórkach ssaków głównie w sposób pośredni, poprzez zaburzenia podziału komórkowego, w porównaniu do bezpośredniego wpływu na DNA. Badania przeprowadzone przez Gurową (2019) wykazały, że małe cząstki, które bezpośrednio wiążą się z DNA są toksyczne dla komórek, nie dlatego, że powodują uszkodzenia DNA, ale dlatego że destabilizują chromatynę. Należy jednak zauważyć, że niski poziom niestabilności genomu jest istotnym czynnikiem zwiększającym genetyczną różnorodność, przez co stanowi podstawę dla ewolucji (Sarkies i wsp. 2010).

Uszkodzenia DNA powstałe na skutek działania szkodliwego czynnika, mogą powodować efekt genotoksyczny i cytotoksyczny w komórkach żywych organizmów. Pod pojęciem działania genotoksycznego rozumiana jest zdolność do indukowania zmian na poziomie pojedynczego genu, chromosomu lub całego genomu bezpośrednio przez działający czynnik lub inną jego formę. Natomiast efekt cytotoksyczny, powoduje zaburzenie lub zahamowanie replikacji oraz translacji DNA, prowadząc do apoptozy komórek (Mol i Stolarek 2011). Efekty ekspozycji komórek na działanie stosunkowo niskich stężeń substancji genotoksycznych mogą nie być od razu widoczne, tym samym brak jest sygnałów ostrzegawczych przed szkodliwą ekspozycją (Clare 2012). Liczne badania sugerują, że polimorfizm genetyczny dodatkowo może mieć wpływ na poziom uszkodzenia chromosomów, związany z ekspozycjami na czynniki genotoksyczne, ale również może wpływać na poziom podstawowych zmian cytogenetycznych (Norppa 2004).

Komal i wsp. (2019) sugerują, że interakcja dupleksu DNA z innymi małymi cząstkami może wpływać na dezintegrację w dowolnej części DNA, a tym samym ingerować w proces rozpoznawania białek DNA. Zmiany w przebiegu tego procesu mogą w konsekwencji wpływać na replikację, transkrypcję, czy procesy naprawcze

DNA. Wykazano, że jednym z czynników mogących wchodzić w interakcję z DNA i zmieniających jego integralność są nanocząstki srebra. Przedmiotem niniejszej pracy było określenie wpływu AgNPs na stabilność genomu psowatych.

5.1. Charakterystyka nanocząstek srebra

Toksyczne właściwości nanocząstek srebra zależne są od wielu czynników, takich jak wielkość cząstek, metoda ich otrzymywania, czynnik stabilizujący cząstki. Istotnymi aspektami w ocenie właściwości AgNPs są czas ich działania na badany materiał biologiczny oraz ich stężenie.

Zmiana rozmiaru cząstek do skali nano spowodowała zmianę charakteru i właściwości srebra, a dokładna skala tych zmian nie została jeszcze w pełni poznana. W związku z tym w badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie nad toksycznymi właściwościami AgNPs wykorzystywano cząstki o różnej średnicy. Ocena właściwości cząstek małych, posiadających średnicę w zakresie 2-7 nm, 5-10 nm, 6-20 nm, 25 nm przeprowadzili Ahamed i wsp. (2008), AshaRani i wsp. (2009), Yen i wsp. (2009) oraz Piao i wsp. (2011). W przypadku cząstek średniej wielkości o średnicy 30–50 nm badania toksyczności prowadzili między innymi Foldbjerg i wsp. (2009), Hackenberg i wsp. (2011), Kaur i wsp. (2013) oraz Gliga i wsp. (2014). Natomiast charakterystykę dużych cząstek o średnicy <100 nm wykonali Ghosh i wsp. (2012), Wang i wsp. (2017). Badania, w których jednocześnie sprawdzano cząstki o różnej wielkości wykazały różnice w cytotoksycznym i genotoksycznym zachowaniu AgNPs w zależności od ich średnicy (Park i wsp. 2011, Butler i wsp. 2015). Liu i wsp. (2010) przeprowadzili porównanie cytotoksyczności nanocząstek srebra o trzech różnych rozmiarach – 5, 20 i 50 nm. Stwierdzili, że najmniejsze cząstki miały najbardziej znaczący wpływ na żywotność komórek, integralność błon komórkowych oraz stres oksydacyjny w przypadku czterech badanych ludzkich linii komórkowych (A549, SGC-7901, HepG2, MCF-7). Podobne obserwacje poczynili Perde-Schrepler i wsp. (2019), którzy w swoich badaniach stwierdzili, że najbardziej cytotoksyczny charakter wykazywały najmniejsze AgNPs o średnicy 5 nm, a następnie w kolejności 25 nm, 50 nm i 110 nm. W swoim artykule przeglądowym Rodriguez-Garraus i wsp. (2020) odnotowali, że większość autorów stwierdziła, iż AgNPs o średnicy 5, 10 czy 20 nm są bardziej cytotoksyczne i genotoksyczne niż cząstki duże o średnicy 40, 50, 75, 100 nm AgNP. W badaniach przedstawionych w niniejszej dysertacji wykorzystano AgNPs,

których średnia wielkość wynosiła 22 nm w przypadku cząstek zawieszonych w wodzie destylowanej oraz 38 nm dla cząstek w cytrynianie sodu. W związku z tym AgNP mogą zostać sklasyfikowane do małych cząstek, wykazujących tym samym teoretycznie silniejsze właściwości genotoksyczne, a AgNP+C do cząstek średniej wielkości.

Drugim czynnikiem wpływającym na charakter AgNPs jest metoda ich otrzymywania. Obecnie dostępnych jest wiele metod syntezy AgNPs: chemiczne, fizyczne, czy procesy mechaniczne oraz coraz popularniejsze metody biologiczne. W dostępnej literaturze naukowej przeważają doniesienia o wykorzystaniu w badaniach nanocząstek srebra otrzymanych metodami chemicznymi, jako gotowych komercyjnych produktów. Takie gotowe, chemicznie syntezowane AgNPs zastosowali w swoich projektach między innymi: Yen i wsp. (2009), Foldbjerg i wsp. (2009) i (2011), Hackenberg i wsp. (2011), Park i wsp. (2011), Ghosh i wsp. (2012), Awasthi i wsp. (2015), Butler i wsp. (2015) oraz Wang i wsp. (2017). Cząstki te znalazły zastosowanie w badaniach toksyczności w warunkach *in vivo* i *in vitro*, zarówno na ludzkich i zwierzęcych liniach komórkowych, świeżo pobranym materiale biologicznym czy bezpośrednio na zwierzętach. Wykazały one zdolność do indukowania uszkodzeń DNA, generowania ROS, zaburzenia funkcjonowania mitochondrium czy też apoptozy komórek.

Obecnie dostępnych jest niewiele doniesień o zastosowaniu cząstek otrzymanych metodami fizycznymi. Jednym z doniesień jest praca Plotnikov i wsp. (2017) opisująca właściwości AgNPs otrzymanych metodą rozpraszania iskry elektrycznej. Cząstki uzyskane tą metodą charakteryzowały się średnią wielkością o średnicy 75 nm. Autorzy wykazali, że uszkodzenie DNA powstające na skutek działania tych AgNPs, było zależne od dawki. Zaobserwowali istotny wzrost uszkodzeń DNA – na podstawie parametru momentu ogonowego Oliva w teście kometowym przy koncentracji 100 µg/ml AgNPs w stosunku do kontroli i niższych dawek. Dodatkowo, Plotnikov i wsp. (2017) zbadali roztwór roboczy (w którym produkowane były nanocząstki), pod kątem właściwości genotoksycznych znajdujących się w nim śladowych ilości metali pozostałych w wyniku rozpraszania iskry elektrycznej oraz innych oddziaływań w trakcie procesu. Nie wykazali oni szkodliwego wpływu roztworu roboczego (tym samym działania metali śladowych w medium), gdyż jego działanie nie różniło się od próby kontrolnej. W prezentowanych badaniach zastosowano nanocząstki srebra produkowane podobną metodą fizyczną HVAD, wysokonapięciowych

wyładowań w łuku elektrycznym. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń i analizowanych parametrów (żywołność, liczba FS, % DNA w ogonie komety, liczba BNC+1MN) stwierdzono wysoki poziom uszkodzeń DNA i chromatyny po ekspozycji na nanocząstki srebra u obu badanych gatunków psowatych. Tym samym potwierdzono hipotezę pierwszą, że AgNP produkowane metodą HVAD działają genotoksycznie na komórki somatyczne ssaków.

Trzecim czynnikiem wpływającym na stabilność nanocząstek srebra, a tym samym warunkującym jego właściwości toksyczne jest obecność czynnika opłaszczającego. Obecnie najczęściej stosowane są dwa materiały – cytrynian sodu oraz poliwinylpirolidon (PVP), jako czynnik pokrywający i tym samym stabilizujący AgNPs podczas procesu otrzymywania. Pomimo różnych mechanizmów działania, oba związki prowadzą do powstania ujemnego ładunku powierzchniowego, zwiększając tym samym stabilność nanostruktury. W przypadku cytrynianu, większa stabilność osiągnana jest poprzez stabilizację elektrostatyczną, zapobiegając agregacji cząstek i odpychaniu elektrostatycznemu. PVP działa przez odpychanie steryczne poprawiające stabilność NPs. Obecność powłok na powierzchni cząstki warunkuje i wpływa bezpośrednio na właściwości danych nanocząstek. Nanocząstki srebra pokryte cytrynianem sodu wykazują silniejsze powinowactwo do białek niż AgNPs pokryte PVP, a wytworzona w trakcie kontaktu z białkami struktura korony jest większa (Rodriguez-Garraus i wsp. 2020). Na podstawie dostępnej literatury zaobserwowano, że większość zastosowanych w badaniach AgNPs posiadała powłokę stabilizującą. Najczęściej stosowane były nanocząstki srebra pokryte cytrynianem sodu, głównie w przypadku chemicznej syntezy, które znalazły zastosowanie w badaniach Gliga i wsp. (2014), Butler i wsp. (2015), Bastos i wsp. (2017), Kim i wsp. (2019). Cząstki pokryte PVP w swoich badaniach wykorzystali Foldbjerg i wsp. (2009 i 2011), Gliga i wsp. (2014). W literaturze obecne są również badania, gdzie AgNPs nie zostały pokryte żadnym czynnikiem (Mei i wsp. 2012) lub wykorzystano mniej popularny środek – przykładowo skrobię (AshaRani i wsp. 2009), czy surowicę bydlęcą Kaur i wsp. (2013).

W przedstawionych badaniach zastosowano dwa rodzaje nanocząstek srebra – cząstki nie pokryte (czyste - AgNP) oraz powleczone trójcytrynianem sodu (AgNP+C). Taki układ doświadczalny pozwolił na sprawdzenie czy stabilniejsza struktura AgNP przez obecność cytrynianu sodu zwiększa poziom indukowanych uszkodzeń DNA. W przeprowadzonych testach, na podstawie głównych parametrów – żywołności,

średniej liczby FS/komórkę, procentowej zawartości DNA w ogonie komety, stwierdzono że AgNP+C indukowały mniej uszkodzeń niż AgNP, dla których średnie wartości były nieznacznie wyższe. Tym samym odrzucona została hipoteza czwarta, twierdząca, że stabilizacja struktury nanocząstki zwiększa poziom uszkodzeń DNA. W przypadku testu kometowego wykazano, że obecność czynnika opłaszczającego miała istotne znaczenie w poziomie toksyczności. Odwrotne wyniki otrzymano w teście CBMN, gdzie nieznacznie więcej BNC+1MN indukowały AgNP+C. Powleczone cytrynianem sodu AgNPs, dalej stanowią duże ryzyko i mogą być wysoce toksyczne w stosunku do komórek ssaków (Bastos i wsp. 2017), co potwierdzono również w prezentowanych badaniach wykazując duży poziom zmian w obrębie struktury chromatyny.

Wszystkie opisane powyżej czynniki bezpośrednio wpływają na charakter i właściwości nanocząstek. Jednak efekt ich działania powiązany jest również z czasem, przez jaki oddziałują na materiał biologiczny. W prowadzonych w ostatnich kilkunastu latach badaniach sprawdzano efekty krótkotrwałej oraz długotrwałej ekspozycji na AgNPs. Najkrótszy – pięciominutowy, wpływ AgNPs na komórki ludzkiej krwi obwodowej testowali Flower i wsp. (2012). Najczęściej spotykany w literaturze krótkotrwały czas działania AgNPs wynosił 3h i został zastosowany między innymi u: Hackenberg i wsp. (2011), Piao i wsp. (2011), Flower i wsp. (2012), Ghosh i wsp. (2012); oraz 4h, jak w przypadku: Ahamed i wsp. (2008), Kim i wsp. (2009), Mei i wsp. (2012), Gliga i wsp. (2014). W badaniach *in vitro* długotrwała ekspozycja wynosiła najczęściej 24h, co sprawdzili między innymi: Kawata i wsp. (2009), Foldbjerg i wsp. (2011), Gliga i wsp. (2014), Butler i wsp. (2015), Bastos i wsp. (2017), Wang i wsp. (2017). Wpływ dłuższego działania – przez 48h sprawdzili między innymi AshaRani i wsp. (2009) oraz Bastos i wsp. (2017), natomiast efekt 72h narażenia na AgNPs ocenili Ahamed i wsp. (2008). Biorąc pod uwagę dane literaturowe, w badaniach przedstawionych w niniejszej rozprawie krew obwodową poddano ekspozycji na działanie nanocząstek srebra w dwóch przedziałach czasowych – przez 3h i 24h. Na podstawie przeprowadzonych testów wykazano silny efekt genotoksyczny w obu punktach czasowych – na różnych poziomach organizacji chromatyny i u obu gatunków psowatych. Jednak różnice obserwowane w średnich wartościach poszczególnych parametrów testów cytogenetycznych nie wykazywały istotności. Wartości wszystkich głównych parametrów w testach cytogenetycznych przeprowadzonych na komórkach

psa domowego wykazały wyższy poziom uszkodzeń przy krótszym okresie ekspozycji niż po 24h. Podobną zależność stwierdzono dla limfocytów lisa polarnego w obu parametrach testu kometowego. Dla tego gatunku, wskaźniki uszkodzeń DNA w testach FS i CBMN wykazywały odwrotną zależność. W związku z tym, że w większości analizowanych parametrów 24h narażenie komórek skutkowało niższymi wartościami, obserwacja ta potwierdza hipotezę trzecią, że dłuższy czas ekspozycji komórek na AgNP aktywuje mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA. Odwrotne obserwacje poczynił Hackenberg i wsp. (2011), stwierdzając, że nanosrebro indukuje w sposób istotnie zależny od czasu uszkodzenia DNA przy dłuższej ekspozycji (24h) w porównaniu do tej krótkotrwałej trwającej 1 i 3h.

Kolejnym istotnym czynnikiem powiązanim z efektem działania jest dawka/stężenie nanocząstek na badany materiał biologiczny. W dostępnej literaturze naukowej zakres stosowanych, czy testowanych stężeń był bardzo szeroki. Część naukowców skupiła się na ocenie właściwości cząstek przy ich bardzo małym stężeniu: 0,2/0,4/0,8/1,6 $\mu\text{g/ml}$ (Park i wsp. 2010); 1-30 $\mu\text{g/ml}$ (Shin i wsp. 2007); 0,03/0,06/0,125/0,250/0,5/1,0 $\mu\text{g/ml}$ (Castro-Gamboa i wsp. 2019); 0,1/1/10 $\mu\text{g/ml}$ (Hackenberg i wsp. 2011). Dodatkowo dawkę 10 $\mu\text{g/ml}$ przetestowali Braydich-Stolle i wsp. (2005), Gliga i wsp. (2014), Bastos i wsp. (2017). Określenia toksyczności AgNPs w średnim zakresie dawki 10/15/20/25/30 $\mu\text{g/ml}$ podjął się Li i wsp. (2012), a 40 $\mu\text{g/ml}$ - Bastos i wsp. (2017) czy 50 $\mu\text{g/ml}$ – Ahamed i wsp. (2008), Flower i wsp. (2012). Szeroki zakres stężeń AgNPs i ich właściwości sprawdzili AshaRani i wsp. (2009) – 25/50/100/200/400 $\mu\text{g/ml}$ czy Ghosh i wsp. (2012) – 25/50/100/150/200 $\mu\text{g/ml}$. Wszyscy autorzy stwierdzili toksyczne działanie AgNPs na komórki w warunkach *in vitro* w badanych przez siebie stężeniach, zarówno przy niskich, jak i wysokich dawkach nanocząstek srebra. Dodatkowo, według Akter i wsp. (2018) w badaniach *in vitro* AgNPs są wysoce toksyczne w stężeniach od 5 do 10 $\mu\text{g/ml}$. Na podstawie danych literaturowych o stosunkowo dużej toksyczności AgNPs przy niskich stężeniach, w przeprowadzonych badaniach zastosowano niskie dawki AgNP wynoszące odpowiednio 5/10/20 $\mu\text{g/ml}$. Zwiększająca się każdego roku produkcja AgNPs i ich wykorzystywanie w różnych gałęziach przemysłu, jednocześnie powodują, że wzrasta poziom AgNPs przedostających się do środowiska. Ludzie, zwierzęta i rośliny mogą ulegać niecelowemu działaniu AgNPs przez ich obecność w wodzie, glebie, powietrzu. W przypadku ludzi i zwierząt dodatkowy kontakt/ekspozycja na

nanocząstki srebra może być związana z wykorzystaniem produktów konsumenckich. Dlatego testowane dawki (5/10/20 $\mu\text{g/ml}$) w założeniu, wydały się być odpowiednie do oceny potencjalnego narażenia ludzi i zwierząt na AgNPs w codziennym życiu.

Na podstawie badań przedstawionych w niniejszej dysertacji wykazano, że każda z trzech badanych dawek AgNP indukuje w sposób niezależny znaczny poziom uszkodzeń DNA i zaburzeń w strukturze chromatyny w komórkach krwi obwodowej psów i lisów polarnych. Uzyskane wyniki z cytogenetycznych testów niestabilności potwierdzają założenia hipotezy drugiej, że niskie stężenia nanocząstek srebra, w zakresie od 5 do 20 $\mu\text{g/ml}$ powodują zmiany integralności DNA w komórkach ssaków.

W przypadku toksycznego działania nanocząstek srebra na komórki ssaków i roślin, wśród różnych możliwych mechanizmów wyszczególnia się zdolność do uwalniania jonów srebra, które indukują uszkodzenia DNA. Dlatego w badaniach nad szkodliwym działaniem AgNPs, korzystne jest zastosowanie czynnika stanowiącego punkt odniesienia dla toksyczności nanocząstek. Jednym z takich związków jest azotan (V) srebra. AgNO_3 uważany jest za dobry wskaźnik toksyczności, ze względu na zdolność uwalniania Ag^+ (Li i Cummins 2020). Dodatkowo, AgNO_3 jest jednym z reduktorów, wykorzystywanych w metodach chemicznej syntezy AgNPs. Azotan srebra znalazł zastosowanie w badaniach prowadzonych przez AshaRani i wsp. (2008), Foldbjerg i wsp. (2009), Piao i wsp. (2011), Butler i wsp. (2015).

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano roztwór AgNO_3 jako chemicznego wskaźnika dla toksyczności AgNP otrzymanych metodą fizyczną. Na podstawie testów cytogenetycznych stwierdzono wysoki poziom toksyczności AgNO_3 w porównaniu do kontroli, a zakresem zbliżony do badanych AgNP. Jednocześnie, uzyskane wyniki nie pozwalają na jednoznaczne określenie bardziej genotoksycznego związku bez uwzględniania poszczególnych testów i parametrów zmian integralności chromatyny. Natomiast Butler i wsp. (2015) w swoich badaniach stwierdzili, że AgNO_3 wywoływało więcej uszkodzeń DNA niż jakikolwiek z testowanych AgNPs, w tych samych stężeniach. Tym samym w/w autorzy podkreślili, że jony srebra są główną przyczyną obserwowanej toksyczności AgNPs. Według Li i Cummins (2020) rozpuszczone jony srebra pochodzące z AgNPs, nie mają wpływu na toksyczność AgNO_3 i AgNPs. Dodatkowo Ag^+ pochodzące z AgNPs nie wyjaśniają wywołanych

efektów toksyczności w porównaniu z toksycznością indukowaną przez AgNO_3 o tym samym stężeniu Ag.

Szczegółowa analiza wpływu czasu ekspozycji i dawki AgNPs oraz porównanie badanych roztworów koloidalnych srebra w literaturze i w przeprowadzonych badaniach własnych został omówiony przy poszczególnych etapach doświadczenia: ocenie żywotności, teście Fragile site, teście CBMN oraz teście kometowym.

Badania toksyczności nanocząstek srebra dotychczas przeprowadzono na różnych typach komórek. Były to zarówno linie komórkowe, jak i pełna krew obwodowa pobrana od ludzi czy zwierząt laboratoryjnych. W przypadku zwierząt izolowany był również szpik kostny. Ocenę toksyczności AgNPs na liniach komórkowych przeprowadzili między innymi: AshaRani i wsp. (2009) na ludzkiej linii komórkowej IMR-90, Kim i wsp. (2009) na ludzkiej linii komórkowej HepG2 oraz Arora i wsp. (2008) na ludzkich liniach komórkowych A431 i HT-1080. Część dostępnych w literaturze wyników badań była prowadzona na mysich liniach komórkowych: makrofagów RAW264.7, fibroblastów L929 (Park i wsp. 2010 i 2011) i embrionalnych komórkach macierzystych (Braydich-Stolle i wsp. 2005). Natomiast toksyczność AgNPs na limfocytach ludzkiej krwi obwodowej przebadali Shin i wsp. (2007), Flower i wsp. (2012). Z kolei, Ghosh i wsp. (2012) w swoich badaniach wykorzystali dwa typy komórek, limfocyty ludzkie oraz mysi szpik kostny. Ferdous i Nemmar (2020) w swoim przeglądzie literatury zaznaczyli, że toksyczny wpływ AgNPs został wykazany w przypadku różnych linii komórkowych, takich jak: makrofagi RAW264,7; komórki nabłonka pęcherzyków płucnych A549; komórki nabłonka oskrzeli BEAS-2B; hepatocyty HepG2 i C3A; keratynocyty skóry HaCaT, erytrocyty, komórki monocytarne THP-1 czy komórki macierzyste. Badania nad toksycznością AgNPs w warunkach *in vitro* i *in vivo* były również prowadzone na zwierzętach laboratoryjnych - myszach i szczurach (Rodriguez-Garraus i wsp. 2020). Pozostałe dostępne w literaturze doniesienia o genotoksyczności i cytotoxyczności nanocząstek srebra dotyczą badań przeprowadzonych na kręgowcach, bezkręgowcach, algach, roślinach czy innych mikroorganizmach. Dotychczas, brak jest dostępnych badań określających w jednakowych warunkach toksyczność AgNPs w stosunku do dwóch różnych genomów. Z kolei poznanie zmian w obrębie genomu, w tym w stabilności chromatyny, spowodowanego ekspozycją na AgNPs w komórkach zwierząt, będzie wskaźnikiem wpływu tych związków na zdrowie, a nawet życie ludzi.

Analiza wrażliwości genomów różnych gatunków na szkodliwe działanie AgNPs umożliwia jego porównanie w aspekcie wpływu różnic osobniczych, gatunkowych, a w przypadku zwierząt, także stopnia udomowienia.

Dlatego też, w badaniach przedstawionych w niniejszej pracy, jako model doświadczalny wykorzystano dwa gatunki psowatych: psa domowego i lisa polarnego. Pies domowy, jako zwierzę towarzyszące człowiekowi, często narażone jest na działanie tych samych lub podobnych czynników, co jego właściciel. Natomiast lis polarny niebieski, żywny ubocznymi produktami pochodzenia zwierzęcego, stanowi ostatnie ogniwo łańcucha pokarmowego. Obydwa gatunki *Canidae* w hodowli narażone są na kontakt i działanie nanocząstek srebra pochodzących z różnych źródeł i wnikaających do organizmu różnymi drogami. Według Gajski i wsp. (2019), zwierzęta trzymane jako zwierzęta domowe mogą być uważane za przekaźniki czynników środowiskowych, na których działanie mogliby być narażeni ludzie. Dlatego też zwierzęta mogą być wykorzystywane jako odpowiednik dla narażenia ludzi, czy do monitorowania wpływu czynników, na które są one narażone żyjąc w tych samych warunkach lub zbliżonych do ludzkich. Większość badań narażenia człowieka na czynniki szkodliwe przeprowadzono do tej pory na modelu psim i kocim. Wybrane rasy kotów, jak i psów wykorzystano do oceny wpływu różnych czynników chemicznych i/lub fizycznych na zakres uszkodzeń DNA (Gajski i wsp. 2019).

Z uwagi na charakter nanocząstek srebra, takich jak mały rozmiar, wysoką reaktywność, duży stosunek powierzchni do objętości oraz wpływ wielu omówionych wcześniej czynników na ich ostateczne właściwości, nie jest możliwe w sposób bezpośredni i jednoznaczny porównanie otrzymanych w niniejszej pracy wyników z danymi dostępnymi w pozycjach literaturowych. Toksyczność AgNPs może zależeć od metody produkcji, wielkości i stężenia cząstek, obecności czynnika stabilizującego lub czasu ekspozycji, które współdefiniują ich właściwości. Zmiana, któregoś z wyżej wymienionych czynników, sprawia, że nie jest możliwe czytelne i konkretne porównanie aktywności poszczególnych AgNPs między sobą. Możliwe jest jedynie określenie podobnych zależności i tendencji w działaniu AgNPs w poszczególnych testach cytogenetycznych, pozwalających na określenie ich wpływu na komórki somatyczne zwierząt, ze szczególnym uwzględnieniem psowatych.

5.2. Żywotność komórek

Pierwszym etapem określenia profilu toksyczności związku, w tym nanocząstek srebra, była ocena żywotności badanych komórek. Zdolność do proliferacji, integralność błon komórkowych, aktywność mitochondriów i enzymów metabolicznych są parametrami ocenianymi w celu określenia aktywności cytologicznej związków. Na tym etapie wykorzystywane są metody określające żywotność komórek poprzez analizę zmian zachodzących w integralności błony badanych komórek. Wymagają one zastosowania barwnika o dodatnim ładunku, w którym inkubuje się komórki. Barwnik przenika do komórek umierających, w których dochodzi do uszkodzenia błony komórkowej. Jednym z najczęściej stosowanych barwników jest błękit trypanu, wybarwiający martwe komórki na niebiesko (Longo-Sorbello i wsp. 2006). Analiza żywotności komórek z zastosowaniem tego barwnika może być prowadzona w sposób manualny w komorze Bürkera lub automatyczny z wykorzystaniem elektronicznych sumatorów komórek. Możliwe jest zastosowanie również innych barwników pozwalających na ocenę zmian integralności błony komórkowej, jak jodek propidyny (PI) czy dwuocian fluoresceiny (FDA), które należą do barwników fluorescencyjnych. Dwuocian fluoresceiny, należy do grupy związków, które w formie zestryfikowanej wykazują zdolność do swobodnego przenikania przez nienaruszoną błonę komórkową. Wzrost koncentracji FDA w komórce jest możliwy, tylko w przypadku gdy aktywne są enzymy z grupy esteraz i nie jest naruszona integralność błony komórkowej. Komórki żywe, zawierające barwnik, są widoczne w mikroskopie fluorescencyjnym, emitując zieloną fluorescencję. W komórkach z uszkodzonym aparatem enzymatycznym i naruszoną błoną komórkową, barwnik ulega dyfuzji, a komórka staje się niewidoczna. Z kolei, jodek propidyny jest barwnikiem stosowanym do wizualizacji komórek martwych lub uszkodzonych, ze względu na swoją zdolność do wiązania się z DNA. Barwnik ten posiada minimalną zdolność do penetracji nienaruszonych błon komórkowych. Stosowanie tych dwóch barwników jest często łączone w technice FDA/PI, umożliwiającej dokładniejszą analizę żywych i uszkodzonych komórek (Boyd i wsp. 2008).

Inne metody są powiązane z analizą aktywności metabolicznej komórki, a dokładnie z aktywnością konkretnych enzymów. Jedną z takich metod, mającą częste zastosowanie do oceny cytotoksyczności, jest kolorymetryczny test MTT. Oparty jest na aktywności enzymu mitochondrialnego – dehydrogenazy bursztynianowej, obecnej

w żywych komórkach i jego zdolności do przekształcania rozpuszczalnej soli tetrazolowej, w formę zredukowaną, czyli nierozpuszczalny formazan, który wytrąca się w postaci kryształów. W komórkach uszkodzonych metabolicznie lub martwych nie powstają kryształki formazanu, co ma odzwierciedlenie w pomiarach absorpcji roztworu (Krzysztoń-Russjan i wsp. 2009).

Obie z przedstawionych metod oceny aktywności cytologicznej związków znalazły zastosowanie w pracach dotyczących analizy toksyczności nanocząstek srebra. Barwienie błękitem trypanu wykorzystali między innymi: Hackenberg i wsp. (2011) oraz Ghosh i wsp. (2012). Natomiast test MTT w swoich badaniach zastosował Ahamed i wsp. (2008) oraz Wang i wsp. (2019).

W prezentowanych badaniach do oceny żywotności komórek somatycznych psowatych zastosowano barwienie błękitem trypanu. Wszystkie analizowane roztwory koloidalne srebra powodowały znaczny spadek żywotności limfocytów krwi obwodowej u badanych psowatych. Ekspozycja komórek na roztwory AgNP i AgNP+C skutkowała ponad dwukrotnie niższą wartością odsetka żywych komórek (u psa domowego odpowiednio 35,67% i 37,38%, a u lisa polarnego 31,22% i 32,49%) w porównaniu do próby kontrolnej (u psa domowego 82,06%, a u lisa polarnego 78,97%). Silniejsze właściwości toksyczne w przypadku tego parametru wykazał AgNO₃, którego działanie spowodowało prawie 4-krotny spadek żywotności – u psa domowego 22,91%, a dla lisa polarnego 25,99%. W przeprowadzonych w ramach dysertacji badaniach nie stwierdzono istotnych zależności odsetka żywych komórek od dawki badanych roztworów srebra. Jednak w przypadku obu gatunków najniższe wartości żywotności komórek zaobserwowano po ekspozycji na stężenie 5 µg/ml dla AgNP i AgNP+C. Natomiast najwyższą żywotność limfocytów obserwowano przy stężeniach 20 µg/ml AgNP i AgNP+C u psa domowego, a w przypadku lisa polarnego dla obu roztworów przy dawce 10 µg/ml. W odniesieniu do AgNO₃, najbardziej szkodliwym stężeniem dla komórek psa domowego było 20 µg/ml, a dla lisa polarnego 10 µg/ml.

Castro-Gamboa i wsp. (2019) w swoich badaniach również zaobserwowali duży spadek w żywotności komórek, a istotne różnice odnotowali w przypadku najwyższego badanego stężenia 1,0 µg/ml AgNPs, na poziomie 54,4% w odniesieniu do 85,0% żywych komórek w próbie kontrolnej. Ghosh i wsp. (2012) po zastosowaniu barwienia

błękitem trypanu stwierdzili zależny od dawki AgNPs spadek żywotności limfocytów ludzkich, z istotną zmianą od stężenia 150 $\mu\text{g/ml}$ na poziomie 72,45% żywych komórek.

W przedstawionych badaniach zaobserwowano, że wyższą cytotoksycznością w przypadku analizy żywotności komórek charakteryzował się roztwór AgNO_3 w porównaniu do AgNP. Odwrotną zależność na ludzkich komórkach wątroby zaobserwował Piao i wsp. (2011), stwierdzając, że wyższą cytotoksyczność wykazało AgNPs w porównaniu do AgNO_3 . Dodatkowo, oba związki charakteryzowały się toksycznością zależną od dawki, gdyż IC_{50} dla AgNPs wyniosło 4 $\mu\text{g/ml}$, a dla AgNO_3 8 $\mu\text{g/ml}$ (Piao i wsp. 2011). W badaniach Perde-Schrepler i wsp. (2019) AgNPs proporcjonalnie do ich stężenia obniżały żywotność obu linii komórkowych (HaCaT i HEI-OC1). Szczegółowy opis i charakterystyka nanocząstek srebra wykorzystanych w cytowanych pozycjach literaturowych zostały obszernie przedstawione przy opisie poszczególnych czynników wpływających na AgNPs, w podrozdziale 5.1.

W przedstawionych w niniejszej dysertacji badaniach nie stwierdzono wpływu czasu ekspozycji komórek na ich żywotność. W przypadku limfocytów psa domowego zaobserwowano większą śmiertelność komórek po 24h ekspozycji na AgNP i AgNO_3 w odniesieniu do 3h. Odwrotną sytuację odnotowano po ekspozycji komórek na AgNP+C, gdzie po 3h działania procent żywych komórek był niższy. W przypadku lisa polarnego, oba roztwory nanocząstek srebra po 24h działania były bardziej cytotoksyczne niż po 3h. Natomiast azotan srebra po 3h wykazał nieznacznie silniejsze toksyczne działanie niż po 24h. Żywotność limfocytów krwi obwodowej psowatych była znacząco niższa w obu punktach czasowych i w każdym z analizowanych stężeń w odniesieniu do próby kontrolnej.

W przypadku komórek linii HaCaT, Bastos i wsp. (2017) zaobserwowali, że żywotność eksponowanych komórek znacząco obniżyła się po ekspozycji na AgNPs zarówno po 24h i 48h, jak i w obu badanych stężeniach 10 i 40 $\mu\text{g/ml}$. Hackenberg i wsp. (2011) przeprowadzili ocenę żywotności ludzkich adipocytów przez barwienie błękitem trypanu i FDA, we wszystkich trzech badanych czasach ekspozycji 1, 3 i 24h. W obu metodach i w każdym punkcie czasowym w/w autorzy stwierdzili znaczący efekt cytotoksyczny przy stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ AgNPs, gdzie procent komórek zdolnych do życia był wyraźnie zmniejszony w porównaniu do grupy kontrolnej.

5.3. Test Fragile site

Test Fragile site, czyli analizy miejsc łamliwych na chromosomach jest jedną z metod pozwalających na ocenę aberracji chromosomowych występujących w badanych komórkach. W obrazie mikroskopowym na chromosomach metafazowych, kiedy są one w pełni skondensowane, niektóre *loci* chromosomalne mają tendencję do tworzenia szczelin, przerw, złamań lub przewężeń w obrębie chromatyd, które nie zostają wybarwione barwnikiem wiążącym się z DNA (Bjerregaard i wsp. 2018). Uszkodzenia tego typu mogą występować w miejscach, w których gromadzą się powtórzenia kilkunukleotydowe, zmieniające dynamikę replikacji tych obszarów. Tym samym powodując powstawanie miejsc z pęknięciem nici DNA, przejawiających się jako luki, rozszczepienia, pęknięcia lub delecje na chromosomach (Kuchta-Gładysz i wsp. 2021).

W analizie mikroskopowej miejsc kruchych i łamliwych, do barwienia chromosomów stosowane są standardowe barwniki, które wykazują powinowactwo do struktury DNA, jak DAPI (Bjerregaard i wsp. 2018) lub Giemsa (Stone i Stephens 1993, Kuchta-Gładysz i wsp. 2021). W celu przeprowadzenia bardziej szczegółowej analizy struktury chromosomów, z uwzględnieniem obszarów zawierających przerwy lub zwężenia, stosuje się barwienia różnicowe prążków G (obejmujące trawienie trypsyną, a następnie barwienie Giemszą, które daje wzór jasno i ciemno zabarwionych pasm) lub technikę prążków Q. W ostatnich latach rozszerzono metody wykorzystywane do uwidaczniania FS w związku z próbą i potrzebą określenia, które białka wiążą się z powszechnie występującymi miejscami łamliwymi biorąc udział w ich przetwarzaniu. W tym celu do analizy chromosomów metafazowych zastosowano metody immunofluorescencyjne, FISH lub kombinacje tych metod (Bjerregaard i wsp. 2018).

W przedstawionych badaniach w celu uwidocznienia miejsc łamliwych na chromosomach psowatych zastosowano klasyczne barwienie Giemszą oraz technikę prążków G (GTG).

Miejsca kruche stanowią integralną część struktury chromosomów, co wiąże się z ich spontanicznym występowaniem w genomie ludzi i zwierząt. U osobników zdrowych ich liczba pozostaje niska, natomiast wszelkie nieprawidłowości powodują znaczny wzrost ich poziomu. Liczba miejsc łamliwych powstałych spontanicznie

u młodych i zdrowych zwierząt waha się od 1 do 10 uszkodzeń na komórkę, w przypadku gdy nie są one narażone na działanie mutagennych czynników środowiskowych (Kuchta-Gładysz i wsp. 2021). Według danych literaturowych występowanie spontanicznych CFS zostało wcześniej potwierdzone w genomie psa domowego (Stone i wsp. 1991, Stone i Stephens 1993) oraz lisa polarnego (Kuchta-Gładysz i wsp. 2021). Pierwsze doniesienia dotyczące występowania autosomalnych miejsc łamliwych na chromosomach psa, rasy bokser, wskazywały na obecność $0,02 \pm 0,07$ FS/komórkę u zdrowych osobników (Stone i wsp. 1991). W dalszych badaniach przeprowadzonych na trzech psach (jeden rasy bokser i dwa mieszańce), średnią liczbę FS/ komórkę określono na poziomie 0,799, natomiast średnia procentowa obecność komórek z miejscami łamliwymi wynosiła 41,7% (Stone i Stephens 1993). Natomiast w przypadku lisa polarnego Kuchta-Gładysz i wsp. (2021) spontaniczne FS określili na poziomie $4,61 \pm 0,37$ FS/komórkę, uwzględniając również podział na przerwy ($0,51 \pm 0,17$ FS/komórkę), złamania ($3,91 \pm 1,09$ FS/komórkę) oraz delecję fragmentów chromatyd ($0,19 \pm 0,13$ FS/komórkę). W badaniach przedstawionych w ramach niniejszej dysertacji poziom uszkodzeń w próbkach kontrolnych, nie poddanych działaniu żadnego czynnika, określono jako wynoszący średnio $3,73 \pm 1,87$ FS/komórkę w limfocytach psa domowego oraz $2,69 \pm 1,49$ FS/komórkę w limfocytach lisa polarnego.

Dotychczas nie zastosowano testu Fragile site do oceny toksyczności nanocząstek srebra. Jednak w dostępnych w literaturze badaniach analizowane były niestabilności chromosomowe w postaci przerw i złamań chromatyd na chromosomach w ramach testu CA – aberracji chromosomowych. Test ten do oceny genotoksyczności AgNPs zastosowali między innymi: Hackenberg i wsp. (2011), Ghosh i wsp. (2012), Wen i wsp. (2017), Chang i wsp. (2021) oraz Mecwan i wsp. (2021). W badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie u obu gatunków psowatych wykazano w odniesieniu do próby kontrolnej istotną genotoksyczność – w postaci liczby FS ponad 2,5-krotnie wyższą, we wszystkich trzech badanych roztworach koloidalnych srebra. W przypadku psa domowego więcej uszkodzeń w obrębie chromatyd indukowały AgNP, w stosunku do AgNP+C i AgNO₃, których szkodliwe działanie kształtowało się na zbliżonym poziomie. Odwrotny efekt działania roztworów srebra odnotowano w przypadku komórek lisa polarnego. Najwyższą indukcję FS zaobserwowano po ekspozycji na AgNO₃, a następnie nieznaczny spadek po działaniu AgNP i AgNP+C,

które powodowały wystąpienie zbliżonej liczby FS w komórkach. Wen i wsp. (2017) w swoich badaniach wykazali, że zarówno AgNPs i Ag⁺ powodowały wzrost uszkodzeń chromosomów w komórkach szpiku kostnego, a występowały one głównie w postaci pęknięć chromosomów i chromatyd. Z kolei Chang i wsp. (2021) po ekspozycji komórek HaCaT na badane AgNP/SMA stwierdzili występowanie różnych aberracji chromosomowych, obserwowanych głównie w postaci luk i pęknięć chromatyd, wykazując znacząco wyższą częstotliwość CA w porównaniu z kontrolą negatywną.

W prezentowanych badaniach największą grupę obserwowanych uszkodzeń na chromosomach stanowiły u obu gatunków złamania chromatyd 74-97% FS. Drugą grupę identyfikowanych aberracji stanowiły pęknięcia chromatyd (1 – 16% FS), które u badanych psowatych występowały sporadycznie. Innym rzadko występującym typem zmian były delecje/urwane fragmenty chromatyd na poziomie 2 – 14% FS. W przypadku analizy miejsc łamliwych nie wykazano wpływu dawki roztworów srebra na poziom obserwowanych FS. Poziom genotoksyczności obserwowany jako liczba FS/komórkę w limfocytach psa domowego malał kolejno po ekspozycji na AgNP>AgNP+C>AgNO₃, natomiast w limfocytach lisa polarnego stopień indukowanych FS/komórkę malał w kolejności AgNP>AgNO₃>AgNP+C. W przypadku komórek psa domowego stężenia 5 i 10 µg/ml trzech badanych roztworów koloidalnych srebra, powodowały powstawanie miejsc łamliwych na zbliżonym poziomie. Niższą częstotliwość FS obserwowano po działaniu 20 µg/ml odpowiednich roztworów. Dla komórek lisa polarnego tendencja ta była obserwowana tylko w przypadku próbek poddanych ekspozycji na AgNP. Ekspozycja komórek na AgNO₃ w stężeniach 20 i 5 µg/ml skutkowała powstaniem nieprawidłowości chromosomowych na zbliżonym poziomie, a nieznacznie niższym po działaniu 10 µg/ml tego związku.

Ghosh i wsp. (2012) obserwowali głównie złamania chromatyd w komórkach mysiego szpiku kostnego po ekspozycji na AgNPs. Liczba zidentyfikowanych aberracji delikatnie zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia AgNPs do najwyższego poziomu 0,27±0,03 CA/komórkę przy dawce 40 mg/kg AgNPs, a gwałtownie spadła przy 80 mg/kg AgNPs. Hackenberg i wsp. (2011) po 1h ekspozycji identyfikowali głównie przerwy i złamania w teście CA, a znaczący ich wzrost odnotowali głównie przy stężeniach 0,1 µg/ml AgNPs i wyższych, wynoszący odpowiednio 2,5 CA/50 metafaz po działaniu 0,1 µg/ml AgNPs, 3 CA/50 metafaz po 1,0 µg/ml AgNPs oraz 2-4 CA/50 metafaz po 10 µg/ml AgNPs. Wyniki doświadczenia uzyskane przez Mecwan i wsp.

(2021) wykazały, że liczba aberracji chromosomowych w limfocytach krwi ludzkiej wzrastała w sposób zależny od dawki w wyniku ekspozycji na AgNPs w porównaniu z kontrolą negatywną, z istotnością statystyczną, za wyjątkiem najniższego badanego przez ten zespół stężenia wynoszącego 350 μ L.

W badaniach prezentowanych w niniejszej dysertacji stwierdzono natomiast zależną od czasu genotoksyczność nanocząstek srebra w teście Fragile site. W komórkach psa domowego poziom indukowanych miejsc łamliwych był wyższy po 3h ekspozycji, w przypadku każdego badanego roztworu koloidalnego srebra, niż po 24h. Odwrotną zależność zaobserwowano w przypadku komórek krwi lisa polarnego, w których ekspozycja 24h trzech roztworów koloidalnych srebra indukowała więcej FS. Po 3h działania najwyższą genotoksycznością charakteryzowały się AgNP u obu gatunków. Natomiast 24h szkodliwe działanie wszystkich związków w komórkach psa domowego kształtowało się na podobnym poziomie występowania FS, a w komórkach lisa polarnego wyraźną genotoksyczność wykazywał AgNO_3 . W dostępnej literaturze brak jest informacji o zależnej od czasu ekspozycji AgNPs indukcji uszkodzeń chromosomów w postaci złamań i przerw w testach FS lub CA.

5.4. Test mikrojądrowy - CBMN

Jedną z najczęściej analizowanych form uszkodzenia DNA i niestabilności genomu jako wskaźnika toksyczności czynników egzogennych, są mikrojądra. Struktury te powstają podczas anafazy z całych chromosomów lub ich fragmentów w wyniku nieprawidłowej replikacji i segregacji chromosomów do komórek potomnych. Przemieszczone fragmenty chromosomów lub całe chromosomy zostają ostatecznie pokryte błoną jądrową i pozostają w obrębie jąder w cytoplazmie komórki. Po barwieniu standardowym mikrojądra są strukturalnie podobne do jądra, zwykle mniejszych rozmiarów. Obecność MN w danej komórce wskazuje na uszkodzenie genomu prowadzące do znacznej nierównowagi genomowej i modyfikacji w komórkach potomnych. Identyfikacja uszkodzeń DNA na poziomie chromosomalnym w formie MN może być prowadzona na różnych typach komórek jądrzastych, co ma istotne znaczenie w ocenie ryzyka powstawania uszkodzeń genotoksycznych (Turkez i wsp. 2017, Kirsch-Volders i wsp. 2018).

W zależności od typu analizowanych komórek, wyróżnia się kilka wariantów testu MN. Mikrojądra mogą być identyfikowane w limfocytach lub komórkach

pochodzących z linii komórkowych ludzkich i zwierzęcych podczas standardowej hodowli komórkowej. W celu zwiększenia liczby analizowanych komórek dwujądrowych wykorzystuje się test mikrojądrowy z blokadą cytokinezy (CBMN). Innym wariantem jest erytrocytarny test mikrojądrowy (EMn), w którym analizę przeprowadza się w niedojrzałych erytrocytach zarówno ludzkich, jak i zwierzęcych. Pozostałe dwa warianty testu MN to mikrojądrowy test policzkowy oraz wariant wykorzystujący inne typy komórek, jak pochodzące z błony śluzowej nosa (Sommer i wsp. 2020). Najczęściej stosowanymi testami w ocenie toksyczności są erytrocytarny test mikrojądrowy w badaniach *in vivo* oraz test CBMN *in vitro*, metody te są obecnie dobrze zwalidowane i zalecane przez OECD (Kirsch-Volders i wsp. 2018, Sommer i wsp. 2020). W teście EMn identyfikacja mikrojąder prowadzona jest w niedojrzałych erytrocytach (erytrocytach polichromatycznych PCE lub retikulocytach) szpiku kostnego lub krwi obwodowej, głównie myszy i szczurów. Takie prekursorowe erytrocyty zawierają RNA w swojej cytoplazmie, a w procesie dojrzewania tracą jądra. Jednak MN powstałe w stadium jądrzastym, jako odrębny twór otoczony błoną, nie ulega degradacji i zostaje zachowane w komórce. Dlatego komórki PCE mogą być łatwo odróżnione od krwinek dojrzałych. Test EMn w badaniach nad toksycznością nanocząstek srebra wykorzystali między innymi: Dobrzyńska i wsp. (2014), Kovvuru i wsp. (2014), Chang i wsp. (2021). Dobrzyńska i wsp. (2014) analizując PCE na rozmazach szpiku kostnego szczurów po podaniu AgNPs, zaobserwowali wysoce istotny wzrost liczby mikrojąder w 1000 PCE po 24h ekspozycji. Indukcja liczby MN po działaniu AgNPs przebiegała w sposób niezależny od dawki i wielkości cząstek. Istotny wzrost liczby mikrojąder w erytrocytach po jednorazowym doustnym podaniu AgNPs u myszy stwierdzili Kovvuru i wsp. (2014), obserwując 4-krotnie wyższy poziom uszkodzeń w porównaniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo, wykazali, że 5-dniowa doustna ekspozycja na AgNPs zwiększała 5-krotnie liczbę MN zarówno w komórkach krwi obwodowej i szpiku kostnego u myszy szczepu dzikiego. Chang i wsp. (2021) w swoich badaniach nie stwierdzili wpływu AgNPs na poziom analizowanych mikrojąder w erytrocytach polichromatycznych.

Największym zainteresowaniem i zastosowaniem w biomonitoringu, dozymetrii biologicznej oraz w badaniach nad genotoksycznością nanomateriałów charakteryzuje się test mikrojądrowy z blokadą cytokinezy. Ogromną zaletą tego testu jest analiza licznych nieprawidłowości takich jak pąki jąderne, mostki nukleoplazmatyczne,

komórki wielojądrzaste, które są identyfikowane w komórkach. Analiza cytomu testem CBMN pozwala wyróżnić biomarkery uszkodzenia DNA oraz markery cytotoxycności. Do wskaźników poziomu uszkodzeń DNA w limfocytach zaliczane są komórki dwujądrzaste z mikrojądrem, komórki dwujądrzaste z mostkiem nukleoplazmatycznym (NPB) oraz komórki BN z pękiem jądrowym (NBUD). Tymi markerami są również komórki jednojądrzaste z mikrojądrem lub pękiem. Z kolei za biomarkery cytotoxycności uznawane są komórki apoptotyczne i nekrotyczne oraz stosunek komórek jednojądrzastych : dwujądrzastych : wielojądrzastych (Fenech 2020). Analizę genotoksykności i cytotoxycności nanocząstek srebra testem CBMN przeprowadzili między innymi: AshaRani i wsp. (2009), Kawata i wsp. (2009), Li i wsp. (2012), Tavares i wsp. (2012), Bastos i wsp. (2017), Wang i wsp. (2017), Heshmati i wsp. (2019), Wang i wsp. (2019).

W badaniach prezentowanych w niniejszej rozprawie do analizy uszkodzeń chromatyny w limfocytach krwi obwodowej psowatych zastosowano test mikrojądrowy w wariacie CBMN z uwagi na możliwość identyfikowania również innych uszkodzeń kariokinetycznych i cytoplazmatycznych. W przeprowadzonych badaniach wyszczególniono komórki dwujądrzaste posiadające jedno lub dwa mikrojądra. Większa liczba mikrojąder w obrębie komórek dwujądrzastych była sporadycznie obserwowana. W limfocytach psowatych stwierdzono znacznie wyższy poziom mikrojąder w komórkach BN po ekspozycji na wszystkie trzy roztwory koloidalne srebra, zastosowane w prezentowanych badaniach. W przypadku komórek psa domowego genotoksykność roztworów srebra była na podobnym poziomie, charakteryzując się obecnością MN w zakresie od 23,10 do 23,50 BNC+1MN/komórkę. W komórkach lisa polarnego nieznacznie silniejsze działanie genotoksykcyjne zaobserwowano po ekspozycji komórek na AgNP, w porównaniu do zbliżonej toksycności AgNP+C i AgNO₃. Również istotny wzrost częstotliwości występowania MN w komórkach po działaniu AgNPs zaobserwowali w swoich badaniach Li i wsp. (2012). Ze uwagi na brak innych danych literaturowych o działaniu AgNPs w podobnym układzie doświadczalnym obejmującym: czas 3 i 24h, stężenie 5, 10 i 20 µg/ml oraz rodzaje roztworów: AgNP, AgNP+C, AgNO₃, a także materiału badawczego w postaci limfocytów krwi obwodowej psa domowego i lisa polarnego, uzyskane wyniki nie mogą być dyskutowane w sposób porównawczy z innymi danymi literaturowymi. Dlatego też otrzymane w prezentowanych badaniach wyniki porównano

w odniesieniu badań prowadzonych w innych układach, dotyczących: rodzaju cząstek, czasu ekspozycji, dawki oraz materiału badawczego. W swoich badaniach, Kawata i wsp. (2009) stwierdzili znaczącą cytotoksyczność po ekspozycji AgNPs na komórki HepG2, na poziomie 47,9% MN/1000 BNC w odniesieniu do grupy kontrolnej (2,1% MN/1000 BNC) i AgNO₃ (2,6% MN/1000 BNC).

W prezentowanych badaniach nie zaobserwowano również istotnego wpływu dawki nanocząstek srebra na poziom indukowanych mikrojąder. Dla AgNP wyższy poziom uszkodzeń u obu gatunków zaobserwowano po działaniu dawki 20 µg/ml, a stabilizowane cytrynianem sodu nanocząstki nieznacznie wyższą genotoksyczność w komórkach lisa polarnego wykazały przy 5 µg/ml. Genotoksyczność azotanu srebra u obu gatunków wzrastała w sposób zależny od dawki. AshaRani i wsp (2009) najwyższy poziom indukowanych mikrojąder stwierdzili po ekspozycji na dawkę 100 µg/ml AgNPs, wynoszącą około 50% MN/BNC, a następnie spadek do 8% MN/BNC przy 200 µg/ml. Zależny od stężenia wzrost indukcji mikrojąder w komórkach HepG2 wykazali Wang i wsp. (2017) po przekroczeniu stężenia 50 µg/ml AgNPs. W przypadku drugiej analizowanej przez ten zespół linii komórkowej, A549 – wzrost częstotliwości MN zaobserwowano po ich traktowaniu 50 i 100 µg/ml AgNPs, a wskaźniki indukcji mikrojąder były odpowiednio 1,9 i 1,7 razy wyższe niż w kontroli (Wang i wsp. 2017). Statystycznie istotny wzrost liczby mikrojąder w zależności od dawki AgNPs wykazali Wang i wsp. (2019) w przypadku obu badanych rodzajów nanocząstek srebra, AgNPs 20 nm i PVP-AgNP 20 nm, odpowiednio w zakresie stężeń 80 – 160 µg/ml oraz 20 – 160 µg/ml.

W przedstawionych badaniach nie stwierdzono zależnego od czasu ekspozycji na AgNP wzrostu liczby mikrojąder w komórkach krwi obwodowej *Canidae*. W limfocytach psa domowego, wyższą genotoksyczność wykazywały badane roztwory po krótszym czasie ekspozycji – 3h. Odwrotną zależność zaobserwowano w komórkach pochodzących od lisa polarnego, dla którego ekspozycja 24h na AgNP indukowała większą liczbę MN. W dostępnych danych literaturowych niewiele jest informacji o wpływie czasu ekspozycji komórek na nanocząstki srebra, a wzrostem częstotliwości występowania indukowanych mikrojąder w teście CBMN. Jedynie Tavares i wsp. (2012) na ludzkich komórkach krwi obwodowej wykazał, że każda z badanych dawek AgNPs (10, 25, 50 µg/ml) indukowała znaczny wzrost liczby MN, ale wraz z wydłużającym się czasem działania nanosrebra poziom uszkodzeń DNA ulegał

stopniowemu zmniejszeniu. Tym samym podkreślając, że na poziomie niskich dawek, genetyczna toksyczność AgNPs dla komórek może być zależna od systemu naprawy komórek.

Innym wskaźnikiem uszkodzeń DNA w ramach testu CBMN jest obecność w komórkach dwujądrowych mostków nukleoplazmatycznych. W prezentowanych badaniach stwierdzono nieznaczny wzrost liczby NPB w komórkach psa domowego po ekspozycji na AgNP oraz w komórkach lisa polarnego po działaniu AgNO₃. W przypadku tego typu nieprawidłowości nie stwierdzono wpływu dawki badanych roztworów koloidalnych srebra. W limfocytach psa domowego potwierdzono natomiast genotoksyczność zależną od czasu ekspozycji, obserwując dla każdego z roztworów znaczny spadek liczby NPB po 24h w porównaniu do 3h ekspozycji. Dla limfocytów lisa polarnego ta zależność nie została potwierdzona. O analizie mostków nukleoplazmatycznych w swoich badaniach donosili Wang i wsp. (2017), stwierdzając że AgNPs powodowały istotny statystycznie i zależny od dawki wzrost NPB z zakresie stężeń 50 – 200 µg/ml. Dodatkowo, w porównaniu z linią komórkową A549, zaobserwowali, że ekspozycja na AgNPs w stężeniu 200 µg/ml wywołała silniejszą odpowiedź w komórkach HepG2, w których indukcja NPB wzrosła 8-krotnie w stosunku do grupy kontrolnej. Tym samym stwierdzili oni, że zależny od dawki wzrost częstości NPB może być prawdopodobnie spowodowany przerwami nici DNA indukowanymi przez AgNPs. Z kolei, w badaniach prowadzonych przez Wang i wsp. (2019), autorzy nie zaobserwowali różnicy w liczbie mostków nukleoplazmatycznych po podaniu dwóch rodzajów nanosrebra (AgNPs 20 nm, PVP-AgNP 20 nm) na wszystkich poziomach testowanych dawek.

Trzecim z analizowanych w niniejszej pracy wskaźników CBMN dotyczących uszkodzeń DNA, był pęk jądrowy obecny w komórce dwujądrowej. Stosunkowo wysoki poziom NBUD został zaobserwowany w próbach kontrolnych u obu gatunków (2,10 NBUD/komórkę). Ekspozycja krwi obwodowej na roztwory koloidalne srebra nie spowodowała indukcji tego typu uszkodzeń, a średnia liczba NBUD w większości prób uległa nawet zmniejszeniu w porównaniu do próby kontrolnej. Jedynie ekspozycja komórek psa domowego na AgNP skutkowała podobnym poziomem NBUD (2,13±1,66 NBUD/komórkę). Dodatkowo, dla limfocytów psa domowego poddanych działaniu roztworów AgNP+C i AgNO₃ stwierdzono zależny od dawki spadek liczby NBUD, z istotnymi różnicami między 5 a 20 µg/ml. Dla komórek lisa polarnego taka zależność

nie została określona, jednak najwyższy poziom indukowanych NBUD/komórkę równy $2,25 \pm 3,13$ stwierdzono po działaniu $10 \mu\text{g/ml}$ AgNP+C. Dla badanych roztworów koloidalnych nanocząstek srebra poziom obserwowanych NBUD był zależny od czasu, w komórkach psa domowego AgNP wykazało silniejszą indukcję po 3h niż 24h. W limfocytach lisa polarnego 24h ekspozycja zarówno AgNP i AgNP+C powodowała wzrost uszkodzeń w porównaniu do 3h. Odpowiednio podobne tendencje zaobserwowano w przypadku pozostałych grup doświadczalnych. Liczne NBUD w komórkach A549 i HepG2 po traktowaniu AgNPs obserwowali Wang i wsp. (2017). Stwierdzili oni, zależny od dawki, wzrost liczby NBUD w stosunku do grupy kontrolnej. W swoim badaniu zaobserwowali również, że 24h ekspozycja AgNPs spowodowała wyższą indukcję NBUD w komórkach HepG2 w zakresie stężeń od $12,5$ do $100 \mu\text{g/ml}$, ale niższą wartość wskaźnika przy najwyższym stężeniu $200 \mu\text{g/ml}$ w porównaniu z komórkami A549. Najwyższa indukcja NBUD, odpowiednio w komórkach HepG2 i A549, była 11- i 16-krotnie wyższa w stosunku do grupy kontrolnej (Wang i wsp. 2017). Bastos i wsp. (2017) wykazali, że liczba NBUD miała tendencję do wzrostu po ekspozycji na AgNPs w obu zastosowanych czasach (24h i 48h) oraz stężeniach (10 i $40 \mu\text{g/ml}$). Natomiast Wang i wsp. (2019) zaobserwowali zwiększoną liczbę pęków jądrowych w komórkach HepG2 w grupach poddanych działaniu AgNPs 20 nm w dawce $160 \mu\text{g/ml}$ oraz PVP-AgNP 20 nm w dawkach $20 - 160 \mu\text{g/ml}$.

W badaniach prezentowanych w ramach niniejszej dysertacji zwrócono również uwagę na występowanie w analizowanych komórkach biomarkerów cytotoksyczności. Analiza limfocytów krwi obwodowej psowatych nie wykazała obecności komórek apoptotycznych czy nekrotycznych, a tym samym nie potwierdzono cytotoksycznego charakteru AgNP, AgNP+C czy AgNO₃. Natomiast w analizowanych grupach doświadczalnych u obu gatunków, stwierdzono znacznie niższy poziom komórek wielojądrzastych niż w próbach kontrolnych. Spadek liczby komórek wielojądrzastych po ekspozycji na AgNPs zaobserwował również Bastos i wsp. (2017). Z kolei, AshaRani i wsp. (2009) podczas analizy CBMN zaobserwowali stosunkowo niewiele komórek apoptotycznych i nekrotycznych. Również autorzy w swojej analizie nie stwierdzili fragmentacji jądra komórkowego.

Obserwowane typy uszkodzeń w limfocytach krwi obwodowej w ramach testu CBMN potwierdzają genotoksyczny charakter badanych roztworów koloidalnych

srebra, głównie nanocząstek srebra. Jednocześnie niska wartość wskaźnika – komórek wielojądrzastych i brak obserwowanych komórek apoptotycznych i nekrotycznych nie wskazują na cytotoksyczny charakter AgNP, AgNP+C czy AgNO₃ w stosunku do limfocytów psowatych.

5.5. Test kometowy

Kolejnym narzędziem umożliwiającym analizę bezpośredniego uszkodzenia DNA po ekspozycji komórek na działanie czynników szkodliwych jest test kometowy. Ocena zaburzeń integralności DNA prowadzana jest na komórkach uprzednio poddanych rozdzielni elektroforetycznemu. Wizualizację komórek w teście kometowym przeprowadza się przez zastosowanie barwnika fluorescencyjnego wiążącego się z DNA. Jednym z pierwszych stosowanych barwników w teście kometowym był bromek etydyny. Barwnik ten silniej wiąże się z dwuniciowym DNA, niż z jednoniciowym. Dlatego w przypadku jednoniciowego DNA fluorescencja powinna być mniej intensywna w porównaniu do tej obserwowanej przy DSB. Im wyższy jest udział SSB w uszkodzeniach komórki tym mniejsza powinna być całkowita fluorescencja komety (Collins 2004). Analiza fragmentacji DNA w teście kometowym jest możliwa na dwa sposoby: przez ocenę wizualną komórek bazując na klasyfikacji uszkodzeń lub z wykorzystaniem specjalnego programu umożliwiającego pomiar różnych parametrów testu SCGE. Ocena wizualna polega na klasyfikowaniu komórek w zależności od stopnia uszkodzenia do 5 odpowiednich grup: zaczynając od klasy 0 – komety nie posiadają ogona, aż do klasy 4, prawie całe DNA komórki znajduje się w ogonie komety (Collins 2004). Cyfrowy pomiar uszkodzenia komórek jest obecnie główną metodą weryfikacji testu kometowego. Dedykowane do tego programy umożliwiają detekcję i analizę kilku najważniejszych, jak i dodatkowych parametrów komet mierzonych na podstawie intensywności fluorescencji. Za podstawowe parametry w teście SCGE uważane są procentowa zawartość DNA w głowie i ogonie komety, długość ogona oraz moment ogonowy (Collins i wsp. 2008). Kumaravel i wsp. (2009) w swoim przeglądzie przedstawili pełną listę aż 34 stosowanych w literaturze parametrów testu kometowego. Jednak najczęściej wykorzystywanymi parametrami są procentowa zawartość DNA w ogonie komety i moment ogonowy (Valverde i Rojas 2009). Zastosowanie tego pierwszego parametru pozwala dokładniej zweryfikować

poziom uszkodzeń DNA i jest łatwiejszy do interpretacji. Wskazuje on na liniową zależność od częstotliwości pęknięć i pozwala na rozróżnienie uszkodzeń w możliwie najszerszym zakresie (teoretycznie od 0 do 100% DNA w ogonie komety). Parametr wyrażany, jako procentowa zawartość DNA w głowie lub ogonie komety to pomiar względnej intensywności fluorescencji odpowiednio w głowie lub ogonie komety. Natomiast moment ogonowy jest kombinacją dwóch parametrów, jest iloczynem długości ogona oraz intensywności ogona i jest parametrem bez jednostkowym. Dodatkowo moment ogonowy nie jest liniowy w odniesieniu do dawki oraz nie daje żadnego odniesienia do wyglądu komety (Collins 2004, Azqueta i wsp. 2009). Według Fairbairn i wsp. (1995) moment ogonowy zawiera w sobie miarę zarówno najmniejszego wykrywalnego rozmiaru migrującego DNA (odzwierciedlonego w długości ogona komety) oraz liczbę rozluźnionych/ uszkodzonych fragmentów (reprezentowaną przez intensywność DNA w ogonie). Analizę uszkodzeń komórek w oparciu o te dwa parametry przeprowadzono w ramach badań w niniejszej dysertacji.

Test kometowy obecnie jest jedną z najczęściej stosowanych metod do oceny genotoksyczności różnych czynników środowiskowych na modelach zwierzęcych. W związku z tym znalazł szerokie zastosowanie w badaniach nad właściwościami nanocząstek srebra. Ocenę toksyczności AgNPs przy użyciu testu kometowego prowadzili między innymi: AshaRani i wsp. (2009), Hackenberg i wsp. (2011), Flower i wsp. (2012), Ghosh i wsp. (2012), Tavares i wsp. (2012), Gliga i wsp. (2014), Awasthi i wsp. (2015), Wang i wsp. (2017), Heshmati i wsp. (2019), Perde-Schrepler i wsp. (2019). Szczegółowy opis i charakterystyka nanocząstek srebra stosowanych wykorzystanych w cytowanych tu pozycjach literaturowych zostały dokładnie przedstawione przy opisie poszczególnych czynników wpływających na AgNPs, w podrozdziale 5.1.

W prezentowanych badaniach w przypadku obu gatunków stwierdzono znaczny wzrost zawartości DNA w ogonie komety po ekspozycji komórek na działanie roztorów koloidalnych srebra. Wartość procentowej zawartości DNA w ogonie komety, w każdej grupie doświadczalnej była prawie dwukrotnie wyższa w porównaniu do próby kontrolnej. Największym wzrostem fragmentacji DNA charakteryzowały się próby poddane działaniu AgNP. W przypadku wartości procentowej zawartości DNA w ogonie komety, nie zaobserwowano jej zależności od dawki roztworów koloidalnych srebra. Jedynie w limfocytach lisa polarnego dawka 10 µg/ml AgNP wykazywała

wyraźnie wyższą genotoksyczność w porównaniu do pozostałych wariantów doświadczalnych. Ghosh i wsp. (2012) w swoich badaniach przeprowadzonych na ludzkich limfocytach, zaobserwowali przy najniższym stężeniu 25 $\mu\text{g/ml}$ 4-krotny wzrost procentowej zawartości DNA w ogonie komety, a następnie stopniowy spadek intensywności ogona wraz ze wzrostem stężenia AgNPs. Flower i wsp. (2012) stwierdzili, że każda z dwóch testowanych dawek AgNPs (50 i 100 $\mu\text{g/ml}$) po 3h ekspozycji powodowała znaczny wzrost migracji DNA w porównaniu do komórek z grupy kontrolnej. Wzrost uszkodzenia DNA w sposób zależny od dawki zaobserwował też Eom i Choi (2010) stwierdzając 2-krotnie wyższą wartość procentową DNA w ogonie komety przy 50 μM AgNPs w porównaniu do 10 μM . Z kolei, Heshmati i wsp. (2019) wykazali, że AgNPs powodował wzrost uszkodzeń DNA przy niskich stężeniach 0,005 – 0,025 $\mu\text{g/ml}$, a przy wyższych stężeniach 0,05 – 0,1 $\mu\text{g/ml}$ ich poziom ulegał zmniejszeniu.

W przeprowadzonych badaniach nie wykazano zależności procentowej zawartości DNA w ogonie komety od czasu ekspozycji. Jedynie ekspozycja na AgNP+C limfocytów obu gatunków wykazała taką zależność, generując wyższy poziom uszkodzeń przy krótszym okresie ekspozycji komórek (3h). Również istotny poziom uszkodzeń DNA po krótkiej inkubacji 4h z AgNPs zaobserwowali Perde-Schrepler i wsp. (2019). Podobnych obserwacji jak w przedstawionych badaniach dokonali, Tavares i wsp. (2012) oraz Awasthi i wsp. (2015). Oba zespoły wykazały silniejsze uszkodzenie przy krótszym czasie ekspozycji (3h), których częstość zmniejszała się wraz z dłuższym czasem działania. Według Tavares i wsp. (2012) taka zależność może świadczyć o działaniu mechanizmów naprawczych, stąd niższy poziom zmian DNA. Jednak odwrotne wnioski poczynili Hackenberg i wsp. (2011) i Gliga i wsp. (2014). Istotny wzrost fragmentacji DNA stwierdzili po 24h działania AgNPs na komórki, w porównaniu do krótszej ekspozycji wynoszącej 1h i 3h (Hackenberg i wsp. 2011) czy 4h (Gliga i wsp. 2014).

Analiza drugiego parametru testu kometowego, jakim jest moment ogonowy (TM) w prezentowanych badaniach wykazała zależną od dawki i czasu ekspozycji toksyczność ocenianych roztworów koloidalnych srebra na limfocyty obu gatunków psowatych. Najwyższą indukcję uszkodzeń komórek psa domowego wykazały dawki 5 $\mu\text{g/ml}$ AgNP i AgNO₃ oraz 10 $\mu\text{g/ml}$ AgNP+C, a przy wyższych dawkach obserwowano spadek wartości TM. Dla komórek lisa polarnego najbardziej

genotoksyczną dawką było 10 µg/ml AgNP, przy czym spadek uszkodzeń po działaniu tego roztworu koloidalnego nie przebiegał w sposób liniowy wraz ze wzrostem dawki jak po ekspozycji na AgNP+C czy AgNO₃. Heshmati i wsp. (2019) również najwyższe wartości TM odnotowali przy najniższym badanym stężeniu AgNPs 0,025 µg/ml. Natomiast przy stężeniach 0,05 i 0,1 µg/ml wartości momentu ogonowego w ich badaniach malały, wykazując dwufazową odpowiedź na dawkę AgNPs. AshaRani i wsp. (2009) zaobserwowali, że komety w komórkach poddanych działaniu AgNPs wykazały niezależny od stężenia wzrost momentu ogonowego w porównaniu do kontroli. Wyższą genotoksycznością w przeprowadzonych badaniach dla limfocytów psów charakteryzował się AgNO₃ w porównaniu do AgNP. Również silniejszą odpowiedź po ekspozycji na AgNO₃ w teście kometowym zaobserwowali Butler i wsp. (2015), sugerując główny wpływ jonów Ag na indukcję uszkodzeń DNA.

Analizowane parametry testu kometowego, czyli procentowa zawartość DNA w ogonie komety i TM, potwierdziły genotoksyczny charakter obu badanych roztworów nanocząstek srebra oraz AgNO₃ w stosunku do limfocytów krwi obwodowej u badanych psowatych. Wysokie wartości tych obserwowanych parametrów potwierdzają, że zarówno krótkotrwała ekspozycja, jak i niskie dawki mogą być bardzo szkodliwe dla organizmów zwierząt i ludzi.

5.6. Porównanie genomu wybranych psowatych

Pies domowy i lis polarny należą do rodziny psowatych (*Canidae*), która prawdopodobnie około 50-60 milionów lat temu wyodrębniła się z innej rodziny mięsożernych. Dla żyjących obecnie na Ziemi *Canidae* dywergencja od wspólnego przodka rozpoczęła się 7 do 10 milionów lat temu. Wcześniejsze badania przeprowadzone przez Bininda-Emonds i wsp. (1999) wykazały, że rodzina *Canidae* dzieli się na dwie główne grupy – psowatych i lisowatych. Dane genetyczne uzyskane w ramach projektu sekwencjonowania genomu psa, sugerują, że rodzina może być podzielona na cztery główne grupy filogenetyczne. Wyszczególnione zostały lisopodobne psowate – *Vulpini* (do których należy jenot), grupa obejmująca gatunki lisa szarego i wyspowego – *Urocyon*, kolejna do której zaliczono południowoamerykańskie psowate – *Cerdocyonina* oraz ostatnią, czyli wilkopodobne psowate – *Canina* (w tym pies domowy) (Lindblad-Toh i wsp. 2005, Ostrander 2007). W obrębie rodziny *Canidae*

występuje szerokie zróżnicowanie kariotypu, od $2n=34$ u lisa rudego (*Vulpes vulpes*) do $2n=78$ u psa domowego (*Canis familiaris*) i wilka szarego (*Canis lupus*), wskazując na wysoki stopień ewolucji kariotypu. Gatunki, których kariotyp posiada niższą liczbę chromosomów, składa się głównie z chromosomów dwuramiennych. Natomiast u wilkopodobnych psowatych wszystkie chromosomy autosomalne są akrocentryczne (Breen 2008).

Z dwóch analizowanych w prezentowanych badaniach gatunków, pies domowy posiada najwyższą w rodzinie liczbę diploidalną chromosomów. Kariotyp psa uważany jest za najbardziej rearanżowany, z chromosomami podlegającymi w toku ewolucji licznym inwersjom i rozszczepieniom centrycznym (fizjom), w obrębie *Carnivora* (Nash i wsp. 2001, Graphodatsky i wsp. 2008). Pomimo tego, kariotyp psa domowego jest bardzo stabilny, gdyż nie obserwowano w nim polimorfizmu zarówno w zakresie liczby i budowy chromosomów (Świtoński i wsp. 2003). Drugi z uwzględnionych w badaniach gatunków – lis polarny, charakteryzuje się trzema formami kariotypu $2n=48$, $2n=49$ i $2n=50$, wynikającą z obecności translokacji Robertsonowskiej. W wyniku ewolucji kariotypu, gatunki te wykazują spore różnice w występowaniu heterochromatyny konstytutywnej i liczby NOR (Świtoński i wsp. 2003). Klukowska i wsp. (2003) wykazała, że genetyczny dystans polimorfizmu mikrosatelitarnego między populacjami psa domowego a lisa polarnego był dwukrotnie większy niż odległość między psem a lisem pospolitym (*Vulpes vulpes*).

W przeprowadzonych w ramach niniejszej dysertacji badaniach, analiza prawidłowości kariotypu wykazała u wszystkich osobników psa domowego kariotyp właściwy, to jest $2n=78$ chromosomów. W grupie osobników lisa polarnego, stwierdzono, że u większości zwierząt (70%) występował homozygotyczny kariotyp z translokacją robertsonowską, $2n=48$ chromosomów, a u pozostałych 30% zwierząt heterozygotyczny $2n=49$ chromosomów. Na podstawie trzech przeprowadzonych testów cytogenetycznych i wartości głównych analizowanych parametrów (liczby FS, liczby BNC+1MN, procentowej zawartości DNA w ogonie komety i TM) stwierdzono wyższy poziom uszkodzeń chromatyny w limfocytach psa domowego w porównaniu do lisa polarnego. Wyższe wartości badanych parametrów odnotowano dla psa domowego zarówno w próbach kontrolnych, jak i po ekspozycji na działanie badanych roztworów koloidalnych srebra. Wskazuje to na większą wrażliwość komórek psa domowego na powstawanie zmian w strukturze chromatyny. Założenie to potwierdza wyższy poziom

uszkodzeń obserwowany po 3h ekspozycji niż po 24h. Podatność chromosomów psa domowego na indukowane uszkodzenia może być związana z ich jednoramienną budową oraz z licznymi rearanżacjami chromosomowymi w trakcie ewolucji kariotypu. Równocześnie lis polarny został uznany, w prezentowanych badaniach, za gatunek o bardziej stabilnym genomie, ze względu na niższe wartości wskaźników zaburzeń chromatyny. Dodatkowo zaobserwowano, że komórki lisa polarnego były mniej podatne na powstawanie uszkodzeń chromosomowych, w formie miejsc łamliwych czy obecności mikrojąder, gdyż indukcja większej liczby uszkodzeń wymagała dłuższego czasu ekspozycji komórek na roztwory koloidalne srebra. Większa stabilność genomowa lisa polarnego może być powiązana z występowaniem w kariotypie głównie chromosomów dwuramiennych.

Istotnym czynnikiem, który może wskazywać na większą wrażliwość genomu psa domowego na indukowanie zaburzeń integralności chromatyny jest występowanie dużej liczby odziedziczalnych zaburzeń w obrębie ich gatunku. U psów domowych zostało opisane ponad 1000 schorzeń dziedzicznych, powodowanych przez zmiany chromosomalne lub mutacje genów. Dodatkowo, na stabilność genomu psa domowego duży wpływ miała intensywna selekcja i hodowla dla większości ras. Spowodowało to zmniejszenie różnorodności genetycznej populacji oraz zwiększenie częstości występowania chorób dziedzicznych (Mellersh 2008).

6. Wnioski

1. Przeprowadzone w niniejszej dysertacji badania potwierdziły genotoksyczny charakter trzech badanych roztworów koloidalnych srebra: AgNP, AgNP+C i AgNO₃ w stosunku do chromatyny i DNA komórek somatycznych ssaków.

2. Nanocząstki srebra produkowane metodą fizyczną wysokonapięciowych wyładowań w łuku elektrycznym działają genotoksycznie na komórki somatyczne ssaków.

3. Niskie stężenia nanocząstek srebra, w zakresie od 5 do 20 µg/ml, powodują zmiany integralności chromatyny jądrowej w komórkach krwi obwodowej psowatych.

4. Dłuższy czas ekspozycji komórek na AgNP aktywuje mechanizmy naprawy uszkodzeń DNA.

5. Stabilizacja struktury nanocząstek srebra otrzymanych metodą HVAD nie wpływa na zwiększenie liczby indukowanych uszkodzeń DNA.

6. Genotoksyczność AgNP produkowanych metodą HVAD, na podstawie momentu ogonowego testu kometowego, była wysoce istotnie zależna od dawki roztworu nanocząstek srebra oraz wysoce istotnie zależna od czasu ekspozycji w testach Fragile site i kometowym.

7. Analiza żywotności komórek przy użyciu błękitu trypanu potwierdziła toksyczne właściwości badanych związków koloidalnych srebra.

8. Najwięcej uszkodzeń chromosomów w postaci miejsc łamliwych indukowało 10 µg/ml AgNP po 3h ekspozycji w komórkach psa domowego oraz 20 µg/ml AgNO₃ po 24h ekspozycji w komórkach lisa polarnego.

9. Najwyższą niestabilnością genomu w postaci zwiększonej liczby mikrojąder w teście CBMN charakteryzowały się komórki psa domowego po 3h ekspozycji na 5 i 10 µg/ml AgNP+C oraz komórki lisa polarnego po 24h ekspozycji 20 µg/ml AgNO₃.

10. W teście kometowym najwięcej uszkodzeń DNA powstawało po ekspozycji komórek psa domowego na 5 µg/ml AgNP przez 3h, a komórek lisa polarnego po działaniu 10 µg/ml AgNP przez 3h.

11. Komórki krwi obwodowej psa domowego wykazywały większą wrażliwość na powstawanie uszkodzeń po krótkotrwałym działaniu badanych roztworów koloidalnych srebra, co wskazuje na mniejszą stabilność genomu tego gatunku.

12. Komórki krwi obwodowej lisa polarnego wykazywały mniejszą wrażliwość na krótkotrwałą ekspozycję na badane roztwory koloidalne srebra, poziom uszkodzeń wzrastał po 24h działaniu, co wskazuje na większą stabilność genomu tego gatunku.

13. Genotoksyczność badanych nanocząstek srebra może wynikać ze zdolności do uwalniania jonów Ag^+ , na co wskazuje zbliżony poziom uszkodzeń obserwowanych w testach FS, CBMN, SCGE pomiędzy AgNP a $AgNO_3$.

14. Dodatkowym prawdopodobnym mechanizmem działania w toksyczności badanych AgNP i AgNP+C mogą być ich właściwości fizykochemiczne i mały rozmiar, dzięki czemu mogą wnikać do wnętrza komórek i tam indukować zmiany w funkcjonowaniu komórek. Wyniki genotoksyczności uzyskane z prób poddanych działaniu AgNP+C i AgNP były na zbliżonym poziomie.

7. Literatura

1. Abedini A., Daud A.R., Hamid M.A.A., Othman N.K., Saion E. 2013. A review on radiation-induced nucleation and growth of colloidal metallic nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* 8, 474. Doi: 10.1186/1556-276X-8-474.
2. Abid J.P., Wark A.W., Breevet P.F., Girault H.H. 2002. Preparation of silver nanoparticles in solution from a silver salt by laser irradiation. *Chemical Communications* 7, 792-793. Doi: 10.1039/b200272h.
3. Agerbjorn A., Hersteinsson P., Tannerfeld M. 2004. Europe and North and Central Asia (Palearctic). [w:] Sillero-Zubini C., Hoffmann H., Macdonald D.W. (eds.) *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs*. IUCN – The World Conservation Union, Gland and Cambridge, 117-124.
4. Aguilera A., Gómez-González B. 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics* 9, 204–217. Doi: 10.1038/nrg2268.
5. Aguilera A., García-Muse T. 2013. Causes of Genome Instability. *Annual Review of Genetics* 47, 19-50. Doi: 10.1146/annurev-genet-111212-133232.
6. Ahmadi S. 2020. The Importance of Silver Nanoparticles in Human Life. *Advances in Applied NanoBio-Technologies* 1, 5-9. Doi: 10.47277/AANBT/1(1)9.
7. Ahamed M., Karns M., Goodson M., Rowe J., Hussain S.M., Schlager J.J., Hong Y. 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 233, 404-410. Doi: 10.1016/j.taap.2008.09.015.
8. Akter M., Sikder M.T., Rahman M.M., Ullah A.K.M.A., Hossain K.F.B., Banik S., Hosokawa T., Saito T., Kurasaki M. 2018. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research* 9, 1-16. Doi: 10.1016/j.are.2017.10.008.
9. Allison L.A. 2009. Podstawy biologii molekularnej. Szweykowska-Kulińska Z., Jarmołowski A. (red) Polish edition, Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa, s. 38-44.
10. Andersen M.S., Fuglei E., König M., Lipasti I., Pedersen A.Ø., Polder A., Yoccoz N.G., Routti H. 2015. Levels and temporal trends of persistent organic

- pollutants (POPs) in arctic fox (*Vulpes lagopus*) from Svalbard in relation to dietary habits and food availability. *Science and the Total Environment* 511, 112-122. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.12.039
11. Arlt M.F., Durkin S.G., Ragland R.L., Glover T.W. 2006. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. *DNA repair* 5, 1126-1135. Doi: 10.1016/j.dnarep.2006.05.010.
 12. Arora A., Jain J., Rajwade J.M., Paknikar K.M. 2008. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies. *Toxicology Letters* 179, 93-100. Doi: 10.1016/j.toxlet.2008.04.009.
 13. AshaRani P.V., Wu Y.L., Gong Z., Valiyaveetil S. 2008. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotoxicology* 19, 255-102. Doi: 10.1088/0957-4484/19/25/255102.
 14. AshaRani P.V., Mun G.L.K., Hande M.P., Valiyaveetil S. 2009. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* 3, 279-290. Doi: 10.1021/nn800596w.
 15. Awasthi K.K., Verma R., Awasthi A., Awasthi K.,Soni I., John P.J. 2015. *In vivo* genotoxic assessment of silver nanoparticles in liver cells of Swiss albino mice using comet assay. *Advanced Materials Letters* 6, 187-193. Doi: 10.5185/amlett.2015.5640.
 16. Arakaki D.T., Sparkes R. 1963. Microtechnique for Culturing Leukocytes from Whole Blood. *Cytogenetic and Genome Research* 2, 57-60. Doi: 10.1159/000129767.
 17. Azqueta A., Shaposhnikov S., Collins A.R. 2009. DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research* 674, 101-108. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2008.10.013.
 18. Bakhom S.F., Silkworth W.T., Nardi I.K., Nicholson J.M., Compton D.A., Cimini D. 2014. The mitotic origin of chromosomal instability. *Current Biology* 24, R148-R149. Doi: 10.1016/j.cub.2014.01.019.
 19. Barkat M.A., Harshita, Beg S., Naim M.J., Pottoo F.H., Singh S.P., Ahmad F.J. 2017. Current Process in Synthesis, Characterization and Applications of Silver Nanoparticles: Precepts and Prospects. *Recent Patients on Anti-Influence Drug Discovery* 12. Doi: 10.2174/1574891XI2666171006102833.
 20. Bastos V., Duarte I.F., Santos C., Oliveira H. 2017. Genotoxicity of citrate-coated silver nanoparticles to human keratocytes assessed by the comet assay

- and cytokinesis blocked micronucleus assay. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 5039-5048. Doi: 10.1007/s11356-016-8240-6.
21. Berteaux D., Casajus N., Angerbjörn A., Fuglei E. 2017. Foreword to Supplement 1: research on a polar species – the Arctic fox. *Polar Research* 36. Doi: 10.1080/17518369.2017.1347411.
 22. Bhowmik A.D., Bandyopadhyay A., Chattopadhyay A. 2019. Cytotoxic and mutagenic effect of green silver nanoparticles in cancer and normal cells: a brief review. *Nucleus*, 62, 277-285. Doi: 10.1007/s13237-019-00293-0.
 23. Bininda-Emonds O.R.P., Gittleman J.L., Purvis A. 1999. Building large trees by combining phylogenetic information: a complete phylogeny of the extant Carnivora (Mammalia). *Biology Review* 74,143-175. Doi: 10.1017/s0006323199005307.
 24. Biswas A., Bayer I.S., Biris A.S., Wnag T., Dervishi E., Faupel F. 2012. Advances in top-down and bottom-up surface nanofabrication: Techniques, applications & future prospects. *Advances in Colloid and Interface Science* 170, 2-27. Doi:10.1016/j.cis.2011.11.001
 25. Bjerregaard V.A., Özer Ö., Hickson I.D., Liu Y. 2018. The Detection and Anaysis of Chromosome Fragile Sites. Chapter 31. [w:] Muzi-Falconi M., Brown G.W. (red.) *Genome Instability: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1672. Springer Science, 471-482. Doi: 10.1007/978-1-4939-7306-4_31.
 26. Błaszcyk E., Mielżyńska-Švach D. 2012. Wykorzystanie komórek nabłonkowych z jamy ustnej w monitoringu biologicznym ludzi. *Medycyna Środowiskowa – Environmental Medicine* 15, 129-138.
 27. Bochorova N., Treu G., Czirják G.Á., Krone O., Stefanski V., Wibbelt G., Unnsteinsdóttir E.R., Hersteinsson P., Schares G., Doronina L., Goltsman M., Greenwood A.D. 2013. Correlates between Feeding Ecology and Mercury Levels in Historical and Modern Arctic Foxes (*Vulpes lagopus*). *PLoS ONE* 8, e60879. Doi: 10.1371/journal.pone.0060879.
 28. Bolzer A., Kreth G., Solovei I., Koehler D., Saracoglu K., Fauth C., Müller S., Eils R., Cremer C., Speicher M.R., Cremer T. 2005. Three-Dimensional Maps of All Chromosomes in Human Male Fibroblast Nuclei and Prometaphase Rosettes. *PLoS Biology* 3, e157. Doi: 10.1371/journal.pbio.0030157.

29. Boyd V., Cholewa O.M., Papas K.K. 2008. Limitations in the Use of Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide (FDA/PI) and Cell Permeable Nucleic Acid Stains for Viability Measurements of Isolated Islets of Langerhans. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 2, 66-84. PMID: PMC2931281.
30. Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J., Hofmann M.-C. 2005. *In Vitro* Cytotoxicity of Nanoparticles in Mammalian germline Stem Cells. *Toxicological Science* 88, 412-419. Doi: 10.1093/toxsci/kfi256.
31. Breen M, Bullerdiek J, Langford CF. 1999a. The DAPI banded karyotype of the domestic dog (*Canis familiaris*) generated using chromosome-specific paint probes. *Chromosome Research* 7: 401–406. Doi: 10.1023/A:1009224232134.
32. Breen M., Thomas R., Binns M.M., Carter N.P., Langford C.F. 1999b. Reciprocal Chromosome Painting Reveals Detailed Regions of Conserved Synteny between the Karyotypes of the Domestic Dog (*Canis familiaris*) and Human. *Genomics* 61, 145-155. Doi: 10.1006/geno.1999.5947.
33. Breen M. 2008. Canine Cytogenetics – From band to basepair. *Cytogenetics and Genome Research* 120, 50-60. Doi: 10.1159/000118740.
34. Brendler-Schwaab S., Hartmann A., Pfuhler S., Speit G. 2005. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20, 245-254. Doi: 10.1093/mutage/gei033.
35. Brown T.A. 2009. Genomes. 3rd edition. Węgleński P. (red.) Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009, s. 272-276.
36. Butler K.S., Peeler D.J., Casey B.J., Dair B.J., Elespuru R.K. 2015. Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis* 30, 577-591. Doi: 10.1093/mutage/gev020.
37. Cahill D.P., Lengauer C., Yu J., Riggins G.J., Willson J.K.V., Markowitz S.D., Kinzler K.W., Vogelstein B. 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, 300-303.
38. Castro-Gamboa S., Garcia-Garcia M.R., Piñon-Zarate G., Rojas-Lemus M., Jarquin-Yañez K., Herrera-Enriquez M.A., Fortoul T.I., Toledano-Magaña Y., Garcia-Iglesias T., Pestryakov A., Castel-Rodriguez A.E., Bogdanchikova N. 2019. Toxicity of silver nanoparticles in mouse bone marrow-derived dendritic cells: Implications for phenotype. *Journal of Immunotoxicology* 16, 54-62. Doi: 10.1080/154769X.2019.1584652.

39. Chang C.-H., Lee Y.-H., Liao Z.-H., Chen M.H.-C., Peng F.-C., Lin J.-J. 2021. Composition of nanoclay supported silver nanoparticles in furtherance of mitigating cytotoxicity and genotoxicity. PLoS ONE 16, e0247531. Doi: 10.1371/journal.pone.0247531.
40. Cholewa R. 1988. Chów i hodowla lisów. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Warszawa, 244.
41. Christensen K., Pedersen H. 1982. Variation in chromosome number in the blue fox (*Alopex lagopus*) and its effect on fertility. Hereditas 97, 211-215. Doi: 10.1111/j.1601-5223.1982.tb00873.x.
42. Clare G. 2012. The In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test. [w:] Parry J.M., Parry E.M. (eds.), Genetic Toxicology: Principles and Methods, Methods in Molecular Biology, vol. 817, Humana Press, New York, pp. 69-92. Doi: 10.1007/978-1-61779-421-6_7.
43. Corbet G.B., Hill J.E. 1991. A World List of Mammalian Species, Third Edition, <http://taxonomicon.taxonomy.nl/TaxonTree.aspx?id=167300>; dostęp 10.03.2014.
44. Collins A.R. 2004. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. Molecular Biotechnology 26, 246-261. Doi: 10.1385/MB:26:3:249.
45. Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G., Gaivão I., Giovannelli L., Kruszewski M., Smith C.C., Štětina R. 2008. The comet assay: topical issues. Mutagenesis 23, 143-151. Doi: 10.1093/mutage/gem051.
46. Crisan C.M., Mocan T., Manolea M. Lasca L.I., Tăbăran F.-A., Mocan L. 2021. Review on Silver Nanoparticles as a Novel Class of Antibacterial Solutions. Applied Sciences 11, 1120. Doi: 10.3390/app11031120.
47. Cremer T., Cremer M. 2010. Chromosome territories. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2, 1-22. Doi: 10.1101/cshperspect.a003889.
48. Czubaszek M., Szostek M., Wójcik E., Andrasz K. 2014. Test kometowy jako metoda identyfikacji niestabilności chromosomów. Postępy Higieny Medycyny Doswiadczałnej 68, 695-700.
49. Danford N. 2012. The Interpretation and Analysis of Cytogenetic Data. [w:] Parry J.M., Parry E.M. (eds.) Genetic Toxicology: Principles and Methods, Methods in Molecular Biology, vol. 817, Humana Press, New York, pp. 93-120. Doi: 10.1007/978-1-61779-421-6_7.

50. Darroudi M., Ahmad M.B., Zak A.K., Zamiri R., Hakimi M. 2011. Fabrication and Characterization of Gelatin Stabilized Silver Nanoparticles under UV-Light. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 6346–6356. Doi: 10.3390/ijms12096346.
51. Desai R., Mankad V., Gupta S.K., Jha P.K. 2012. Size distribution of silver nanoparticles: UV visible spectroscopic assessment. *Nanoscience and Nanotechnology Letters* 4, 30–34. Doi: 10.1166/nnl.2012.1278.
52. Dhillon G.S., Brar S.K., Kaur S., Verma M. 2012. Green approach for nanoparticle biosynthesis by fungi: current trends and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 32, 49–73. Doi: 10.3109/07388551.2010.550568.
53. Dobrzyńska M.M., Gajowik A., Radzikowska J., Lankoff A., Dušínská M., Kruszewski M. 2014. Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats in vivo. *Toxicology* 315, 86-91. Doi: 10.1016/j.tox.2013.11.012.
54. Duran N., Marcato P.D., De Souza G.I., Alves O.L., Esposito E. 2007. Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 3, 203–208. Doi: 10.1166/jbn.2007.022.
55. Durkin S.G., Glover T.W. 2007. Chromosome Fragile Sites. *Annual Review of Genetics* 41, 169-192. Doi: 10.1146/annurev.genet.41.042007.165900.
56. Dusinska M., Collins A.R. 2008. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. *Mutagenesis* 23, 191-205. Doi: 10.1093/mutage/gen007.
57. Ehrich D., Carmichael L., Fuglei E. 2012. Age-dependent genetic structure of Arctic Foxem in Svalbard. *Polar Biology* 35, 53-62. Doi: 10.1007/s00300-011-1030-1.
58. Ema M., Okuda H., Gamo M., Honda K. 2017. A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals. *Reproductive Toxicology* 67, 149-164. Doi: 10.1016/j.reprotox.2017.01.005.
59. Eom H., Choi J. 2010. p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environmental Science & Technology* 44, 8337-8342. Doi: 10.1021/es1020668.

60. Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L. 1995. The comet assay: a comprehensive reviews. *Mutation Research* 339, 37-59. Doi: 10.1016/0165-1110(94)00013-3.
61. Fenech M. 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research* 392, 11-18. Doi: 10.1016/s0165-1218(97)00041-4.
62. Fenech M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research* 455, 81-95. Doi: 10.1016/s0027-5107(00)00065-8.
63. Fenech M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2, 1084-1104. Doi: 10.1038/nprot.2007.77.
64. Fenech M. 2020. Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay Evolution into a More Comprehensive Method to Measure Chromosomal Instability. *Genes* 11, 1203. Doi: 10.3390/genes11101203.
65. Fenech M., Knasmueller S., Bolognesi C., Bonassi S., Holland N., Migliore L., Palitti F., Natarajan A.T., Kirsch-Volders M. 2016. Molecular mechanisms by which *in vivo* exposure to exogenous chemical genotoxic agents can lead to micronucleus formation in lymphocytes *in vivo* and *ex vivo* in humans. *Mutation Research* 770, 12-25. Doi:10.1016/j.mrrev.2016.04.008.
66. Ferdous Z., Nemmar A. 2020. Health Impact of Silver Nanoparticles: A Review of the Biodistribution and Toxicity Following Various Routes of Exposure. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 2375. Doi: 10.3390/ijms21072375.
67. Flower N.A.L., Brabu B., Revathy M., Gopalakrishnan C., Raja S.V.K., Murugan S.S., Kumaravel T.S. 2012. Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay. *Mutation Research* 742, 61-65. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.12.003.
68. Foldbjerg R., Olesen P. Hougaard M., Dang D.A., Hoffmann H.J., Autrup H. 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicology Letters* 190, 156-162. Doi: 10.1016/j.toxlet.2009.07.009.
69. Foldbjerg R., Dang D.A., Autrup H. 2011. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. *Archives of Toxicology* 85, 743-750. Doi: 10.1007/s00204-010-0545-5.

70. Fuglei E., Bustnes J.O., Hop H., Mørk T., Bjørnfoth H., van Bavel B. 2007. Environmental contaminants in arctic foxes (*Alopex lagopus*) in Svalbard: Relationship with feeding ecology and body condition. *Environmental Pollution* 146, 128-138. Doi: 10.1016/j.envpol.2006.06.036.
71. Fujinaga T., Yamashita M., Yoshida M.C., Mizuno S., Tajima M., Okamoto Y., Otomo K. 1989. The Banding Patterns of Normal Canine Chromosomes. *The Japanese Journal of Veterinary Science* 51, 294-299. Doi: 10.1292/jvms1939.51.294.
72. Functammasan A., Walsh E., Chiaromonte F., Eckert K.A., Makova K.D. 2012. A genome-wide analysis of common fragile sites: What features determine chromosomal instability in the human genome? *Genome Research* 22, 993-1005. Doi: 10.1101/gr.134395.111.
73. Gajski G., Žegura B., Ladeira C., Novak M., Sramkova M., Pourrut B., Del Bo C., Milić M., Gutzkow K.B., Costa S., Dusinska M., Brunborg G., Collins A. 2019. The comet assay in animal models: From bugs to whales – (Part 2 Vertebrates). *Mutation Research – Reviews in Mutation Research* 781, 130-164. Doi: 10.1016/j.mrrev.2019.04.002.
74. Geigl J.B., Obenauf A.C., Schwarzbraun T., Speicher M.R. 2008. Defining ‘chromosomal instability’. *Trends in Genetics* 24, 64-69. Doi:10.1016/j.tig.2007.11.06.
75. George R., Merten S., Wang T.T., Kennedy P., Maitz P. 2014. In vivo analysis of dermal and systemic absorption of silver nanoparticles through healthy human skin. *Australian Journal of Dermatology* 55, 185-190. Doi: 10.1111/ajd.12101.
76. Ghosh M., J M., Sinha S., Chakraborty A., Mallick S.K., Bandyopadhyay M., Mukherjee A. 2012. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutation Research* 749, 60-69. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2012.08.007.
77. Gilbert N., Gilchrist S., Bickmore W.A. 2005. Chromatin Organization in the Mammalian Nucleus. *International Review of Cytology* 242, 283-318. Doi: 10.1016/s0074-7696(04)42007-5.
78. Gliga A.R., Skoglund S., Wallinder I.G., Fadeel B., Karlsson H.L. 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Particle and Fibre Toxicology* 11, 11. Doi: 10.1186/1743-8977-11-11.

79. Graphodatsky A.S., Perelman P.L., Sokolovskaya N.V., Beklemisheva V.R., Serdukova N.A., Dobigny G., O'Brien S.J., Ferguson-Smith M.A., Yang F. 2008. Phylogenomics of the dog and fox family (Canidae, Carnivora) revealed by chromosome paunting. *Chromosome Research* 16, 129-143. Doi: 10.1007/s10577-007-1203-5.
80. Gromadzka-Ostrowska J., Dziendzikowska K., Lankoff A., Dobrzyńska M., Instanes C., Brunborg G., Gajowik A., Radzikowska J., Wojewódzka M., Kruszewski M. 2012. Silver nanoparticles effect on epididymal sperm in rats. *Toxicology Letters* 214, 251-258. Doi:10.1016/j.toxlet.2012.08.028.
81. Gugolek A., Zablocki W., Kowalska D., Janiszewski P., Konstantynowicz M., Strychalski J. 2010. Nutrient digestibility in Arctic fox (*Vulpes lagopus*) fed diets containing animal meals. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 62, 948-953. Doi: 10.1590/S0102-09352010000400026.
82. Gustavsson I., Sundt C.O. 1965. Chromosome complex of the family *Canidae*. *Hereditas* 54, 249-254. Doi: 10.1111/j.1601-5223.1965.tb02019.x.
83. Gurova K.V. 2019. Chromatin stability as a target for cancer treatment. *Bioessay* 4, e1800141. Doi:10.1002/bies.201800141.
84. Hackenberg S., Scherzed A., Kessler M., Hummel S., Technau A., Froelich K., Ginzkey C., Koehler C., Hagen R., Kleinsasser N. 2011. Silver nanoparticles: Evaluation of DNA damage, toxicity and functional impairment in human mesenchymal stem cells. *Toxicology Letters* 201, 27-33. Doi: 10.1016/j.toxlet.2010.12.001.
85. Hah H.-J., Koo S.-M., Lee S.-H. 2003. Preparation of Silver Nanoparticles through Alcohol Reduction with Organolakoxyasilanes. *Journal of Sol-Gel Science and Technology* 26, 467-471. Doi: 10.1023/A:1020710307359.
86. Han J.W., Jeong J.K., Gurunathan S., Choi Y.J., Das J., Kwon D.N., Cho S.-G., Park C., Seo H.G., Park J.-K., Kim J.-H. 2016. Male- and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology* 10, 361-373. Doi: 10.3109/17435390.2015.1073396.
87. Harley J.R., Bammler T.K., Farin F.M., Beyer R.P., Kavanagh T.J., Dunlap K.L., Knott K.K., Ylitalo G.M., O'Hara T.M. 2016. Using Domestic and Free-Ranging Arctic Canid Models for Environmental Molecular Toxicology Research. *Environmental Science & Technology* 50, 1990-1999. Doi: 10.1021/acs.est.5b04396.

88. Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R.R. 2003. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18, 45-51. Doi: 10.1093/mutage/18.1.45.
89. Hayashi M. 2016. The micronucleus test – most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes and Environment* 38, 18. Doi:10.1186/s41021-016-0044-x.
90. Heddle J.A., Fenech M., Hayashi M., MacGregor J.T. 2011. Reflection on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis* 26, 3-11. Doi: 10.1093/mutage/geq085.
91. Heshmati M., Bidgoli S.A., Khoei S., Mahmoudzadeh A., Sorkhabadi S.M.R. 2019. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in Chinese Hamster ovary cell line (CHO-K1) cells. *The Nucleus* 62, 221-225. Doi: 10.1007/s13237-019-00295-y.
92. Hoffman J.M., Creevy K.E., Franks A., O’Neil D.G., Promislow D.E.L. 2018. The companion dog as a model for human aging and mortality. *Aging Cell* 17, e12737. Doi: 10.1111/accel.12737.
93. Howard-Peebles P.N., Howell W.M. 1983. Nucleolus organizer regions of the canine karyotype. *Cytogenetics and Cell Genetetics* 35, 293-294. Doi: 10.1159/000131881.
94. Hytönen M.K., Lohi H. 2016. Canine models of human rare disorders. *Rare Diseases* 4, e1241362. Doi: 10.1080/21675511.2016.1241362.
95. Iravani S., Korbekandi H., Mirmohammadi S.V., Zolfaghari B. 2014. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences* 9, 385-406. PMID: 26339255.
96. Jara N., Milán N.S., Rahman A., Mouheb L., Boffito D.C., Jeffryes C., Dahoumane S.A. 2021. Photochemical Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles – A Review. *Molecules* 26, 4585. Doi: 10.3390/molecules26154585.
97. Javaid A., Oloketuyi S.F., Khan M.M., Khan F. 2018. Diversity of Bacterial Synthesis of Silver Nanoparticles. *BioNanoScience* 8, 43–59. Doi: 10.1007/s12668-017-0496-x.
98. Jha A.N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207-221. Doi: 10.1093/mutage/gen014.

99. Jha A.K., Prasad K., Prasad K., Kulkarni A.R. 2009. Plant System: Nature's Nanofactory. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 73, 219-223. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.018
100. Jin J.Y., Ouyang X.Y., Li J., Jiang J., Wang H., Wang Y.X., Yang R. 2011. DNA template-synthesized silver nanoparticles: A new platform for high-performance fluorescent biosensing of biothiols. *Science China Chemistry* 54, 1266-1272. Doi: 10.1007/s11426-011-4320-0.
101. Johans C., Clohessy J., Fantini S., Kontturi K., Cunnane V.J. 2002. Electrosynthesis of polyphenylpyrrole coated silver particles at a liquid-liquid interface. *Electrochemistry Communications* 4, 227–230. Doi: 10.1016/S1388-2481(02)00256-4.
102. Jorge de Souza T.A., Rosa Souza L.R., Franchi L.P. 2019. Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformations in the environment, and toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 171, 691-700. Doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.12.095.
103. Jung J., Oh H., Noh H., Ji J., Kim S. 2006. Metal nanoparticle generation using a small ceramic heater with a local heating area. *Journal of Aerosol Science* 37, 1662-1670. Doi: 10.1016/j.jaerosci.2006.09.002.
104. Kalimuthu K., Babu R.S., Venkataraman D., Bilal M., Gurunathan S. 2008. Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 65, 150–153. Doi: 10.1016/j.colsurfb.2008.02.018.
105. Kang W.-J., Cheng C.-Q., Li Z., Feng Y., Shen G.-R., Du X.-W. 2019. Ultrafine Ag nanoparticles as active catalyst for electrocatalytic hydrogen production. *ChemCatChem* 11, 5976–81. Doi: 10.1002/cctc.201901364.
106. Kasprowicz M.J., Koziół M., Gorczyca A. 2010. The effect of silver nanoparticles on phytopathogenic spores of *Fusarium culmorum*. *Canadian Journal of Microbiology* 56, 247-253. Doi: 10.1139/W10-012.
107. Kasprowicz M.J., Gorczyca A., Janas P. 2016. Production of silver nanoparticles using High Voltage Arc Discharge method. *Current Nanoscience* 12, 747-753. Doi: 10.2174/1573413712666160519155956.
108. Kaur J., Tikoo K. 2013. Evaluating cell specific cytotoxicity of differentially charged silver nanoparticles. *Food and Chemical Toxicology* 51, 1-14. Doi: 10.1016/j.fct.2012.08.044.

109. Kawata K., Osawa M., Okabe S. 2009. In Vitro toxicity of Silver Nanoparticles at Noncytotoxic Doses to HepG2 Human Hepatoma Cells. *Environmental Science & Technology* 43, 6046-6051. Doi: 10.1021/es900754q.
110. Kępińska-Paceli J., Biel W. 2021. Microbiological Hazards in Dry Dog Chews and Feeds, *Animals* 11, 631. Doi:10.3390/ani11030631.
111. Khan Y., Qasimnasar M., Numan M., Ullah I., Shinwari Z.K. 2018. Biomimetic Synthesis of Silver Nanoparticles for Breast Cancer Therapeutics and Its Mechanism. *International Journal of Nanotechnology and Nanomedicine* 3, 1-9.
112. Kim S., Yoo B.K., Chun K., Kang W., Choo J., Gong M.-S., Joo S.-W. 2005. Catalytic effect of laser ablated Ni nanoparticles in the oxidative addition reaction for a coupling reagent of benzylchloride and bromoacetonitrile. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* 226, 231-234. Doi: 10.1016/j.molcata.2004.10.038.
113. Kim S., Choi J.E., Choi J., Chung K.-H., Park K., Yi J., Ryu D.-Y. 2009. Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro* 23, 1076-1084. Doi: 10.1016/j.tiv.2009.06.001.
114. Kim Y.I., Rahman M.M., Lee S.M., Kim J.M., Park K., Kang J.-H., Seo Y.R. 2019. Assessment of in vivo genotoxicity of citrated-coated silver nanoparticles via transcriptomic analysis of rabbit liver tissue. *International Journal of Nanomedicine* 14, 393-405. Doi: 10.2147/IJN.S174515.
115. Kirsch-Volders M., Fenech M., Bolognesi C. 2018. Validity of the Lymphocyte Cytokinesis-Block Micronucleus Assay (L-CBMN) as biomarker for human exposure to chemicals with different modes of action: A synthesis of systematic reviews. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 836, 47-52. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2018.05.010.
116. Klukowska J., Strabel T., Mackowski M., Switonski M. 2003. Microsatellite polymorphism and genetic distances between the dog, red fox and arctic fox. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 120, 88-94. Doi: 10.1046/j.1439-0388.2003.00375.x.
117. Komal S., Kukreti S., Kaushik M. 2019. Exploring the potential of environment friendly silver nanoparticles for DNA interaction: Physicochemical approach. *Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology* 194, 158-165. Doi: 10.1016/j.photobiol.2019.03.022.

118. Kovvuru P., Mancilla P.E., Shirode A.B., Murray T.M., Begley T.J., Reliene R. 2014. Oral ingestion of silver nanoparticles induces genomic instability and DNA damage in multiple tissues. *Nanotoxicology* 9, 1-10. Doi: 10.3190/17435390.2014.902520.
119. Kruszewski M., Brzoska K., Brunborg G., Asare N., Dobrzyńska M., Dušinská M., Fjellsbø L.M., Georgantzopoulou A., Gromadzka-Ostrowska J., Gutleb A.C., Lankoff A., Magdolenová Z., Pran E.R., Rinna A., Instanes C., Snadberg W.J., Schwarze P., Stępkowski T., Wojewódzka M., Refsnes M. 2011. Toxicity of Silver Nanomaterials in Higher Eucaryotes. [w:] Fishbein J.C. (eds.) *Advances in Molecular Toxicology*, Vol. 5, Amsterdam, Elsevier, The Netherlands 2011, s. 179-218.
120. Krzysztoń-Russjan J., Książek I., Anuszevska E. 2009. Porównanie użyteczności testów MTT i EZ4U stosowanych do oceny cytotoksyczności ksenobiotyków. *Farmacja Polska* 65, 395-402.
121. Kuchta-Gładysz M., Wójcik E., Grzesiakowska A., Rymuza K., Szeleszczuk O. 2021. Chromosomal Instability at Fragile Sites in Blue FOXes, Silver FOXes, and Their Interspecific Hybrids. *Animals* 11, 1743. Doi: 10.3390/ani11061743.
122. Kumaravel T.S., Vilhar B., Faux S.P., Jha A.N. 2009. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 25, 53-64. Doi: 10.1007/s10565-007-9043-9.
123. Kupczyńska M., Barszcz K. 2013. Pies - wybrane zagadnienia z użytkowania i patologii. [w:] Szarek J., Szweda M., Strzyżewska E. (red.) *Zwierzęta Laboratoryjne patologia i użytkowanie*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, Olsztyn 2013, s. 193-208.
124. Kuźniewicz J., Filistowicz A. 1999. Chów i hodowla zwierząt futerkowych. Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław 1999, s. 29-35, 294-317.
125. Langford C.F., Fischer P.E., Binns M.M., Holmes N.G., Carter N.P. 1996. Chromosome-specific paints from a high resolution flow karyotype of the dog. *Chromosome Research* 4, 115-123. Doi: 10.1007/BF02259704.
126. Langie S.A.S., Koppen G., Desaulniers D., Al-Mulla F., Al-Temaimi R., Amedei A., Azqueta A., Bisson W.H., Brown D., Brunborg G., Charles A.K., Chen T., Colacci A., Darroudi F., Forte S., Gonzalez L., Hamid R.A., Knudsen L.E., Leyns L., de Certain Salsamendi A.L., Memeo L., Mondello C., Mothersill

- C., Olsen A.-K., Pavanello S., Raju J., Rojas E., Roy R. Ryan E., Ostrosky-Wegman P., Salem H.K., Scovassi I., Singh N., Vaccari M., Van Schooten F.J., Valverde M., Kirsch-Volders M., Collins A.R. 2015. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society. *Carcinogenesis* 36, S61-S88. Doi: 10.1093/carcin/bgv031.
127. Li Y., Chen D.H., Yan J., Chen Y., Mittelstaedt R.A., Zhang Y., Biris A.S., Heflich R.H., Chen T. 2012. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and *in vitro* micronucleus assay. *Mutation Research* 745, 4-10. Doi: 10.1016/j.mrgentox.2011.11.010.
128. Li Y., Cummins E. 2020. Hazard characterization of silver nanoparticles for human exposure router. *Journal of Environmental Science and Health, Part A: Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 55, 704-725. Doi: 10.1080/10934529.2020.1735852.
129. Lindblad-Toh K., Wade C.M., Mikkelsen T.S., Karlsson E.K., Jaffe D.B., Kamal M., Clamp M., Chang J.L., Kulbokas E.J., Zody M.C., Mauceli E., Xie X., Breen M., Wayne R.K., Ostrander E.A., Ponting C.P., Galibert F., Smith D.R., DeJong P.J., Kirkness E., Alvarez P., Biagi T., Brockan W., Butler J., Chin C.-W., Cook A., Cuff J., Daly M.J., DeCaprio D., Gnerre S., Grabherr M., Kellis M., Kleber M., Bardeleben C., Goodstadt L., Heger A., Hitte C., Kim L., Koepfli K.-P., Parker H.G., Pollinger J.P., Searle S.M., Sutter N.B., Thomas R., Webber C., Broad Institute Genome Sequencing Platform, Lander E.S. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438, 803-819. Doi: 10.1038/nature04338.
130. Liu W., Wu Y., Wang C., Li H.C., Wang T., Liao C.Y., Ciu L., Zhou Q.F., Yan B., Jiang G.B. 2010. Impact of silver nanoparticles on human cells: Effect of particle size. *Nanotoxicology* 4, 319-330. Doi: 10.3109/17435390.2010.483745.
131. Longo-Sorbello G.S.A., Saydam G., Banerjee D., Bertino J.R. 2006. Cytotoxicity and Cell Growth Assays. Chapter 38 [w:] Celis J.E. (eds) *Cell Biology, A Laboratory Handbook*, Third Edition, Academic Press, Denmark, 315-324. Doi: 10.1016/b978-012164730-8/50039-3.
132. Mackevica A., Olsson M.E., Hansen S.F. 2016. Silver nanoparticle release from commercially available plastic food containers into food simulants. *Journal of Nanoparticle Research* 18, 5. Doi. 10.1007/s11051-015-3313-x.

133. Maeshima K., Ide S., Hibino K., Sasai M. 2016. Liquid-like behavior of chromatin. *Current Opinion in Genetics & Development* 37, 36-45. Doi: 10.1016/j.gde.2015.11.006.
134. Mafuné F., Kohno J., Takeda Y., Kondow T. 2000. Structure and Stability of Silver Nanoparticles in Aqueous Solution Produced by Laser Ablation. *The Journal of Physical Chemistry B* 104, 35, 8333-8337. Doi: 10.1021/jp001803b.
135. Magdolenova Z., Collins A., Kumar A., Dhawan A., Stone V., Dusinska M. 2014. Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* 8, 233-278. Doi: 10.3109/17435390.2013.773464.
136. Makinen A., Gustavsson I. 1980. Chromosome variability in the blue fox. *Scientifur* 4, 6-9.
137. Makinen A., Gustavsson I. 1982. A comparative chromosome-banding study in the silver fox, the blue fox, and their hybrids. *Hereditas* 97, 289-297.
138. Makinen A., Lohi O., Juvonen M. 1981. Supernumerary chromosome in the chromosomally polymorphic Blue Fox, *Alopex lagopus*. *Hereditas* 94, 277-279.
139. Makinen A., Gustavsson I., Świtoński M., Takagi N. 1985. The standard karyotype of the blue fox (*Alopex lagopus* L.). *Hereditas* 103, 33-38.
140. Malina D., Sobczak-Kupiec A., Kowalski Z. 2010. Nanocząstki srebra – przegląd chemicznych metod syntezy. *Czasopismo Techniczne. Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej* 107, 10.
141. Mallick K., Wang Z.L., Pal T. 2001. Seed-mediated successive growth of gold particles accomplished by UV irradiation: A photo chemical approach for size-controlled synthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 140, 75–80. Doi: 10.1016/S1010-6030(01)00389-6.
142. McAuliffe M.E., Perry M.J. 2007. Are nanoparticles potential male reproductive toxicants? A literature review. *Nanotoxicology* 1, 204-210. Doi: 10.1080/17435390701675914.
143. McShan D., Ray P.C., Yu H. 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *Journal of Food and Drug Analysis* 22, 116-127. Doi: 10.1016/j.fda.2014.01.010.
144. Mecwan M., Das M., Thakore S., Bakshi S.R. 2021. In-vitro Study on Genotoxicity of Green Synthesized Silver Nanoparticles. *Nano Biomedicine and Engineering* 13, 72-81. Doi: 10.5101/nbe.v13i1.p72-81.

145. Mei N., Zhang Y., Chen Y., Guo X., Ding W., Ali S.F., Biris A.S., Rice P., Moore M.M., Chen T. 2012. Silver Nanoparticle-Induced Mutations and Oxidative Stress in Mouse Lymphoma Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 53, 409-419. Doi: 10.1002/em.21698.
146. Mellersh C. 2008. Give a dog a genome. *The Veterinary Journal* 178, 46-52. Doi: 10.1016/j.tvjl.2007.06.029.
147. Melnik E.A., Buzulukov Y.P., Demin V.F., Demin V.A., Gmoshinski I.V., Tyshko N.V., Tutelyan V.A. 2013. Transfer of Silver Nanoparticles through the Placenta and Breast Milk during in vivo Experiments on Rats. *Acta Naturae* 5, 107-115. PMID: PMC3848846.
148. Mittal A.K., Chisti Y., Banerjee U.C. 2013. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances* 31, 346–356. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.003.
149. Mol A., Stolarek M. 2011. Indukowane mutagenami uszkodzenia DNA I mechanizmy ich powstawania. *Postepy Biologii Komórki* 38, 491-505.
150. Møller O.M., Nes N.N., Syed M., Fougner J.A., Norheim K., Smith A.J. 1985. Chromosomal polymorphism in blue fox (*Alopex lagopus*) and its effect on fertility. *Hereditas* 102, 159-164. Doi: 10.1111/j.1601-5223.1985.tb00609.x.
151. Morelli G., Stefanutti D., Ricci R. 2021. A Survey among Dog and Cat Owners on Pet Food Storage and Preservation in the Households. *Animals* 11, 273. Doi: 10.3390/ani11020273.
152. Mosesso P., Cinelli S. 2019. In Vitro Cytogenetic Assays: Chromosomal Aberrations and Micronucleus Tests. [w:] Dhawan A., Bajpayee M. (eds.), *Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, Second edition, vol. 2031, Humana Press, New York, pp. 79-104. Doi: 10.1007/978-1-4939-9646-9_4.
153. Mukherjee P., Ahmad A., Mandal D.D., Senapati S., Sainkar S.R., Khan M.I., Parishcha R., Ajaykumar P.V., Alam M., Kumar R., Sastry M. 2001. Fungus-Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Immobilization in the Mycelial Matrix: A Novel Biological Approach to Nanoparticle Synthesis. *Nano Letters* 1, 515-519. Doi: 10.1021/nl0155274.
154. Naidu K.S.B., Govender P., Adam J.K. 2015. Biomedical Applications and toxicity of nanosilver: a review. *Medical Technology SA* 29, 13-19. Doi:10520/EJC187494

155. Nair B., Pradeep T. 2002. Coalescence of Nanoclusters and Formation of Submicron Crystallites Assisted by *Lactobacillus* Strains. *Crystal Growth & Design* 2, 293-298. Doi: 10.1021/cg0255164.
156. Nair N., Shoaib M., Sørensen C.S. 2017. Chromatin Dynamics in Genome Stability: Roles in Suppressing Endogenous DNA Damage and Facilitating DNA Repair. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 1486. Doi:10.3390/ijms18071486.
157. Nanda A., Saravanan M. 2009. Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 5, 452–456. Doi: 10.1016/j.nano.2009.01.012.
158. Nash W.G., Menninger J.C., Wienberg J., Padilla-Nash H.M., O'Brien S.J. 2001. The pattern of phylogenomic evolution of the Canidae. *Cytogenetics and Cell Genetics* 95, 210-224.
159. Norodd N. 1988. Beautiful Fur Animals – and their colour genetics. *Scientifur*, 89-97.
160. Norppa H. 2004. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicology Letters* 149, 309-334. Doi: 10.1016/j.toxlet.2003.12.042.
161. O'Brien S.J., Menninger J.C., Nash W.G. 2006. Atlas of mammalian chromosomes. Wiley, Canada, s. 455, 467. Doi:10.1002/0471779059.
162. Olive P.L., Banáth J.P., Durand R.E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using using the “comet” assay. *Journal of Radiation Research* 122, 86-94.
163. Olive P.L., Wlodek D., Banáth J.P. 1991. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Research* 51, 4671-4676.
164. Olive P.L., Banáth J.P. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 1, 23-29. Doi: 10.1038/nprot.2006.5.
165. Ostrander E.A. 2007. Genetics and the Shape of Dogs. *American Scientist* 95, 406-413.
166. Ou H., Phan S., Deerinck T.J., Thor A., Ellisman M.H., O’Shea C.C. 2017. ChromEMT: Visualizing 3D chromatin structure and compaction in interphase and mitotic cells. *Science* 357, 1-13. Doi: 10.1126/science.aag0025.

167. Palumbo E., Russo A. 2019. Common fragile site instability in normal cells: Lessons and perspectives. *Genes Chromosomes Cancer* 58, 260-269. Doi: 10.1002/gcc.22705.
168. Panyala N.R., Peña-Méndez E.M., Havel J. 2008. Silver or silver nanoparticles: a hazardous threat to the environment and human health? *Journal of Applied Biomedicine* 6, 117-129. Doi: 10.32725/jab.2008.015
169. Papamichos-Chronakis M., Peterson C.L. 2013. Chromatin and the genome integrity network. *Nature Reviews Genetics* 14, 62-75. Doi:10.1038/nrg3345.
170. Park E.-J., Yi J., Choi K., Park K. 2010. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicology in Vitro* 24, 872-878. Doi: 10.1016/j.tiv.2009.12.001.
171. Park M.V.D.Z., Neigh A.M., Vermeulen J.P., de la Fonteyne L.J.J., Verharen H.W., Briedé J.J., van Loveren H., de Jong W.H. 2011. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials* 32, 9810-9817. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.085.
172. Patete J.M., Peng X., Koenigsmann C., Xu Y., Karn B., Wong S.S. 2011. Viable Methods for the Synthesis of High Quality Nanostructures. *Green Chemistry* 13, 482-519. Doi: 10.1039/c0gc00516a.
173. Pathak S., Van Tuinen P., Merry D.E. 1982. Heterochromatin, synaptonemal complex, and NOR activity in the somatic and germ cells of a male domestic dog, *Canis familiaris (Mammalia, Canidae)*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 34, 112-118. Doi: 10.1159/000131799.
174. Pattnaik P. 2005. Surface Plasmon Resonance: Applications in Understanding Receptor-Ligand Interaction. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 126, 79-92. Doi: 10.1016/j.saa.2007.12.002.
175. Pearce A.I., Richards R.G., Milz S., Schneider E., Switzerland S.G. 2007. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *European Cells and Materials* 13, 1-10. Doi: 10.22203/ecm.v013a01.
176. Pentzold C., Kokal M., Pentzold S., Weise A. 2021. Sites of chromosomal instability in the context of nuclear architecture and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 78, 2095-2103. Doi: 10.1007/s00018-020-03698-2.
177. Perde-Schrepler M., Florea A., Brie I., Virag P., Fischer-Fodor E., Vâlcău A., Gurzău I., Lisencu C., Maniu A. 2019. Size-Dependent Cytotoxicity and

- Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Cochlear Cells *In Vitro*. Hindawi Journal of Nanomaterials, ID 6090259. Doi: 10.1155/2019.6090259.
178. Phillips D.H., Arlt V.M. 2009. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. [w:] Luch A. (eds.) Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, Vol. 1, Basel 2009, Birkhäuser Verlag, s. 87-110.
179. Piao M.J., Kang K.A., Lee I.K., Kim H.-S., Kim S., Choi J.Y., Choi J., Hyun J.W. 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicology Letters* 201, 92-100. Doi: 10.1016/j.toxlet.2010.12.010.
180. Pieńkowska A., Świtoński M. 1998. Chromosomal localization and activity of nucleolar organizer regions in the dog (*Canis familiaris*). *Genetics, Selection, Evolution* 30, 79-84. Doi: 10.1186/1297-9686-30-1-79.
181. Piórkowska M. 2010. Lisy – perspektywy hodowli. *Wiadomości Zootechniczne, R.XLVIII*, 4, 85-97.
182. Plotnikov E., Zhuravkov S., Gapeyev A., Plotnikov V., Martemianova I., Martemianov D. 2017. Comparative Study of Genotoxicity of Silver and Gold Nanoparticles Prepared by the Electric Spark Dispersion Method. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 7, 035-039. Doi: 10.7324/JAPS.2017.70705.
183. Prabhu, S., Poullose, E.K., 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters* 2, 32. Doi: 10.1186/2228-5326-2-32.
184. Prieto E.I., Maeshima K. 2019. Dynamic chromatin organization in the cell. *Essays in Biochemistry* 63, 133-145. Doi: 10.1042/EBC20180054.
185. Pryshchepa O., Pomastowski P., Buszewski B. 2020. Silver nanoparticles: Synthesis, investigation techniques, and properties. *Advances in Colloid and Interface Science* 284, 102246. Doi: 10.1016/j.cis.2020.102246.
186. Pulit-Prociak J., Banach M. 2016. Silver nanoparticles – a material of the future...? *Open Chemistry* 14, 76-91. Doi: 10.1515/chem-2016-0005.
187. Rafique M., Sadaf I., Rafique M.S., Tahir M.B. 2017. A review on green synthesis of the silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology* 45, 1272-1291. Doi: 10.1080/21691401.2016.1241792.

188. Rauwel P., Küünaal S., Ferdov S., Rauwel E. 2015. A review on the green synthesis of silver nanoparticles and their morphologies studied via TEM. *Advances in Materials Science and Engineering* 2015, 682749. Doi: 10.1155/2015/682749.
189. Reimann N., Bartnitzke S., Bullerdiek J., Schmitz U., Rogall P., Nolte I., Rønne M. 1996. An extended nomenclature of the canine karyotype. *Cytogenetics and Cell Genetics* 73, 140-144. Doi: 10.1159/000134326.
190. Rodriguez-Garraus A., Azqueta A., Vettorazzi A., López de Certain A. 2020. Genotoxicity of Silver Nanoparticles. *Nanomaterials* 10, 251. Doi: 10.3390/nano10020251.
191. Rønne M., Poulsen B.S., Shibasaki Y. 1991. NOR association in *Canis familiaris*. *Genetics Selection Evolution* 23, 191-195. Doi: 10.1186/1297-9686-23-S1-S191.
192. Sacharowski S.P., Sarnowski T.J. 2019. Mechanizmy kontrolujące strukturę chromatyny. *Postępy biochemii* 65, 9-20. Doi: 10.18388/pb.2019_252.
193. Samadi N., Golkaran D., Eslamifar A., Jamalifar H., Fazeli M.R., Mohseni F.A. 2009. Intra/extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by an autochthonous strain of *Proteus mirabilis* isolated from photographic waste. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 5, 247–253. Doi: 10.1166/jbn.2009.1029.
194. Sarkies P., Reams C., Simpson L.J., Sale J.E. 2010. Epigenetic Instability due to Detective Replication of Structured DNA. *Molecular Cell* 40, 703-713. Doi: 10.1016/j.molcel.2010.11.009.
195. SAS. SAS/STAT 13.2 User's Guide. SAS Institute Inc. Cary, NC 2014.
196. Sastry M., Ahmad A., Khan M.I., Kumar R. 2003. Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current Science* 85, 162–170. www.jstor.org/stable/24108579.
197. Schwartz M., Zlotorynski E., Kerem B. 2006. The molecular basis of common and rare fragile sites. *Cancer Letters* 232, 13-26. Doi: 10.1016/j.canlet.2005.07.039.
198. Semaltianos N.G. 2010. Nanoparticles by Laser Ablation. *Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences* 35, 105–124. Doi:10.1080/10408431003788233.

199. Selden J.R., Moorhead P.S., Oehlert M.L., Patterson D.F. 1975. The Giemsa banding pattern of the canine karyotype. *Cytogenetics and Cell Genetics* 15, 380-387. Doi: 10.1159/000130537.
200. Shahverdi A.R., Minaeian S., Shahverdi H.R., Jamalifar H., Nohi A. 2007. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach. *Process Biochemistry* 42, 919-923. Doi: 10.1016/j.procbio.2007.02.005.
201. Shearin A.L., Ostrander E.A. 2010. Leading the way: canine models of genomics and disease. *Disease Models & Mechanisms* 3, 27-34. Doi: 10.1242/dmm.004358.
202. Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G.M. 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology* 140, 1307-1320. Doi: 10.1083/jcb.140.6.1307.
203. Shin S.-H., Ye M.-K., Kim H.-S., Kang H.-S. 2007. The effect of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology* 7, 1813-1818. Doi: 10.1016/j.intimp.2007.08.025.
204. Sidharta S. 2013. Bio toxicity of Nanosilver Particle. *Chem* 120, 6720.
205. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191. Doi: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.
206. Słonina D., Gasińska A. 1997. Intrinsic radiosensitivity of healthy donors and cancer patients as determined by the lymphocyte micronucleus assay. *International Journal of Radiation Biology* 72, 693-701. Doi: 10.1080/095530097142852.
207. Smitha S.L., Nissamudeen K.M., Philip D., Gopchandran K.G. 2008. Studies on surface plasmon resonance and photoluminescence of silver nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 71, 186-190. Doi: 10.1016/j.saa.2007.12.002.
208. Socol Y., Abramson O., Gedanken A., Meshorer Y., Berensein L., Zaban A. 2002. Suspensive Electrode Formation in Pulsed Sonoelectrochemical Synthesis of Silver Nanoparticles. *Langmuir* 18, 4736-4740. Doi: 10.1021/la015689f.

209. Sommer S., Buraczewska I., Kruszewski M. 2020. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 1534. Doi: 10.3390/ijms21041534.
210. Sonne C., Wolker H., Rigét F.F., Jensen J-E.B., Teilmann J., Jenssen B.M., Fuglei E., Ahlstrøm Ø., Dietz R., Muir D.C.G., Jørgensen E.H. 2009. Mineral density and biomechanical properties of bone tissue from male Arctic foxes (*Vulpes lagopus*) exposed to organochlorine contaminants and emaciation. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 149, 97-103. Doi: 10.1016/j.cbpc.2008.07.015.
211. Srikar S.K., Giri D.D., Pal D.B., Mishra P.K., Upadhyay S.N. 2016. Green Synthesis of Silver Nanoparticles: A Review. *Green and Sustainable Chemistry* 6, 34-56. Doi: 10.4236/gsc.2016.61004.
212. Stone D.M., Jacky P.B., Prieur D.J. 1991. Chromosomal Fragile Site Expression in Dogs: II. Expression in Boxer Dogs With Mast Cell Tumors. *American Journal of Medical Genetics* 40, 223-229.
213. Stone D.M., Stephens K.E. 1993. Bromodeoxyuridine Induces Chromosomal Fragile Sites in the Canine Genome. *American Journal of Medical Genetics* 46, 198-202.
214. Suriati G., Mariatti M., Azizan A. 2014. Synthesis of Silver Nanoparticles by Chemical Reduction Method: Effect of Reducing Agent and Surfactant Concentration. *International Journal of Automotive and Mechanical Engineering* 10, 1920-1927. Doi: 10.15282/ijame.10.2014.9.0160.
215. Sutter N.B., Ostrander E.A. 2004. Dog star rising: The Canine genetic system. *Nature Reviews. Genetics* 5, 900-910. Doi: 10.1038/nrg1492.
216. Świdwińska-Gajewska A.M., Czerczak S. 2014. Nanocząstki – szkodliwe skutki działania biologicznego. *Medycyna Pracy* 65, 831-845. Doi: 10.13075/mp.5893.00114.
217. Świtoński M. 1981. Robertsonian translocation in the blue fox (*Alopex lagopus*) and its effect on fertility. *Genetica Polonica* 22 (4), 465-474.
218. Świtoński M., Gustavsson I. 1991. Centric-fusion translocation and whole-arm heterochromatin in the karyotype of the blue fox (*Alopex lagopus* L.): synaptonemal complex analysis. *Cytogenetics and Cell Genetics* 57, 1-8. Doi: 10.1159/000133101.

219. Świtoński M., Reimann N., Bosma A.A., Long S., Bartnitzke S., Pieńkowska A., Moreno-Milan M.M., Fisher P. 1996. Report on the progress of standardization of the G-banded canine (*Canis familiaris*) karyotype. Committee for the Standardized Karyotype of the Dog (*Canis familiaris*). Chromosome Research 4, 306-309. Doi: 10.1007/BF02263682.
220. Świtoński M., Rogalska-Niznik N., Szczerbal I., Baer M. 2003. Chromosome polymorphism and karyotype evolution of four canids: the dog, red fox, arctic fox and raccoon dog. Caryologia 56, 375-385. Doi: 10.1080/00087114.2003.10589348.
221. Świtoński M., Szczerbal I., Nowacka J. 2004. The dog genome map and its use in mammalian comparative genomics. Journal of Applied Genomics 45, 195-214.
222. Tang B., Zhou Q., Dong L., Li W., Zhang X., Lan L., Zhai S., Xiao J., Zhang Z., Bao Y., Zhang Y-P. Wang G-D., Zhao W. 2019. iDog: an integrated resource for domestic dogs and wild canids. Nucleic Acids Research 47. Doi: 10.1093/nar/gky1041.
223. Tarasenko N.V., Butsen A.V., Nevar E.A., Savastenko N.A. 2006. Synthesis of nanosized particles during laser ablation of gold in water. Applied Surface Science 252, 4439-4444. Doi: 10.1016/j.apsusc.2005.07.150.
224. Tavares P., Balbinot F., de Oliveira H.M., Fagundes G.E., Venâncio M., Ronconi J.V.V., Merlini A., Streck E.L., da Silva Paula M.M., de Andrade V.M. 2012. Evaluation of genotoxic effect of silver nanoparticles (Ag-Nps) in vitro and in vivo. Journal of Nanoparticle Research 14, 791. Doi: 10.1007/s11051-012-0791-y.
225. Tian Y., Liu H., Chen Y., Zhou C., Jiang Y., Gu C., Jiang T., Zhou J. 2019. Seedless one-spot synthesis of 3D and 2D Ag nanoflowers for multiple phase SERS-based molecule detection. Sensors and Actuators B: Chemical 301, 127142. Doi: 10.1016/j.snb.2019.127142.
226. Tien D.-C., Tseng K.-H., Liao C.-Y., Huang J.-C., Tsung T.T. 2008. Discovery of ionic silver in silver nanoparticle suspension fabricated by arc discharge method. Journal of Alloys and Compounds 463, 408– 411. Doi: 10.1016/j.allcom.2007.09.048.
227. Tortella G.R., Rubilar O., Durán N., Diez M.C., Martínez M., Parada J., Seabra A.B. 2020. Silver nanoparticles: Toxicity in model organisms as an overview of

- its hazard for human health and the environment. *Journal of Hazardous Materials* 390, 121974. Doi: 10.1016/j.hazmat.2019.121974.
228. Trzaskoma P., Magalska A. 2019. Nowoczesne techniki mikroskopowe w badaniach nad trójwymiarową strukturą chromatyny. *KOSMOS Problemy Nauk Biologicznych* 68, 19-33.
229. Tsuji T., Iryo K., Watanabe N., Tsuji M. 2002. Preparation of silver nanoparticles by laser ablation in solution: influence of laser wavelength on particle size. *Applied Surface Science* 202, 80-85. Doi: 10.1016/S0169-4332(02)00936-4.
230. Turkez H., Arslan M.E., Ozdemir O. 2017. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* 13, 1089-1098. Doi: 10.1080/17425255.2017.1375097.
231. Umegaki K., Fenech M. 2000. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: a sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils. *Mutagenesis* 15, 261–269. Doi: 10.1093/mutage/15.3.261.
232. Vahabi K., Mansoori G.A., Karimi S. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles by fungus *Trichoderma reesei* (a route for large-scale production of AgNPs). *Insciences Journal* 1, 65–79. Doi: 10.5640/insc.010165.
233. Valverde M., Rojas E. 2009. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research* 681, 93- 109. Doi: 10.1016/j.mrrev.2008.11.001.
234. Van Houtert E.A.E., Endenburg N., Rodenburg T.B., Vermetten E. 2021. Do Service Dogs for Veterans with PTSD Mount a Cortisol Response in Response Training? *Animals* 11, 650. Doi: 10.3390/ani11030650.
235. Vigneshwaran N., Ashtaputre N.M., Varadarajan P.V., Nachane R.P., Paralikar K.M., Balasubramanya R.H. 2007. Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials Letters* 61, 1413–1418. Doi: 10.1016/j.matlet.2006.07.042.
236. Wang H.C., Fedoroff S. 1972. Banding in Human Chromosomes treated with Trypsin. *Nature New Biology* 235, 52-54. Doi: 10.1038/newbio235052a0.
237. Wang J., Che B., Zhang L.W., Dong G., Luo Q., Xin L. 2017. Comparative genotoxicity of silver nanoparticles in human liver HepG2 and lung epithelial A549 cells. *Journal of Applied Toxicology* 37, 495-501. Doi: 10.1002/jat.3385.

238. Wang X., Li T., Su X., Li J., Li W., Gan J., Wu T., Kong L., Zhang T., Tang M., Xue Y. 2019. Genotoxic effects of silver nanoparticles with/without coating in human liver HepG2 cells and in mice. *Journal of Applied Toxicology* 39, 908-918. Doi: 10.1002/jat.3779.
239. Wei L., Lu J., Xu H., Patel A., Chen Z.-S., Chen G. 2015. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today* 20, 595-601. Doi: 10.1016/j.drudis.2014.11.014.
240. Wen H., Dan M., Yang Y., Lyu J., Shao A., Cheng X., Chen L., Xu L. 2017. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. *PLoS ONE* 12, e0185554. Doi: 10.1371/journal.pone.0185554.
241. Wheeler J.J., Allen-Moyer K.N., Davis J.M., Mishra S.K. 2020. A systematic review of animal models and sex as a variable in itch research. *Itch* 5:e40. Doi: 10.1097/itx.0000000000000040.
242. Widłak P. 2002. Struktura chromatyny a powstanie i naprawa uszkodzeń DNA. *KOSMOS Problemy Nauk Biologicznych* 51, 5-12.
243. Wilhelm K., Pentzold C., Schoener S., Arakelyan A., Hakobyan A., Mrasek K., Weise A. 2018. Fragile Sites as Drives of Gene and Genome Evolution. *Current Genetic Medicine Reports* 6, 136-143. Doi: 10.1007/s40142-018-0154-9.
244. Wilson D. E., Reeder D.M. (eds.). 2005. *Mammalian Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA, pp 2142. www.departments.bucknell.edu/biology/resources/msw3/, dostęp: 15.05.2018
245. Wójcik E., Smalec E., Góral K. 2009. Łamliwe miejsca chromosomu. *KOSMOS Problemy Nauk Biologicznych* 58, 135-142.
246. Wójcik E., Szostek M. 2019. Assessment of genome stability in various breeds of cattle. *PLoS ONE* 14, e0217799. Doi:10.1371/journal.pone.0217799.
247. Yang F., O'Brien P.C.M., Milne B.S., Graphodatsky A.S., Solanky N., Trifonov V., Rens W., Sargan D., Ferguson-Smith M.A. 1999. A Complete Comparative Chromosome Map for the Dog, Red Fox, and Human and Its Integration with Canine Genetic Maps. *Genomics* 62, 189-202. ID: 1999.5989.
248. Yao Y., Dai W. 2014. Genomic Instability and Cancer. *Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis* 5, Doi:10.4172/2157-2518.1000165.

249. Yen H.-J., Hsu S.-H., Tsai C.-L. 2009. Cytotoxicity and Immunological Response of Gold and Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Small* 5, 1553-1561. Doi: 10.1002/sml.200900126.
250. Zalecenie Komisji Europejskiej z dnia 18 października 2011r. dotyczące definicji nanomateriału (2011/696/UE); <https://sip.lex.pl/akty-prawne/dzienniki-UE/definicja-nanomaterialu-68071376>, dostęp: 03.04.2019.
251. Zentrichová V., Pechová A., Kovaříková S. 2021. Selenium and Dogs: A Systematic Review. *Animals* 11, 418. Doi: 10.3390/ani11020418.
252. Zhang W., Qiao X., Chen J. 2007 a. Synthesis of nanosilver colloidal particles in water/oil microemulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 299, 22-28. Doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.11.012.
253. Zhang W., Qiao X., Chen J., 2007 b. Review. Synthesis of silver nanoparticles – Effects of concerned parameters in water/oil microemulsion. *Materials Science and Engineering B*, 142, 1-15. Doi: 10.1016/j.mseb.2007.06.014.
254. Zhang W., Qiao X., Chen J., Chien Q. 2008 a. Self-assembly and controlled synthesis of silver nanoparticles in SDS quaternary microemulsion. *Materials Letters* 62, 1689-1692. Doi: 10.1016/j.matlet.2007.09.060.
255. Zhang N., Ge G., Meyer R., Sethi S., Basu D., Pradhan S., Zhao Y.-J., Li X.-N., Cai W.-W., El-Naggar A.E., Baladandayuthapani V., Kittrell F.S., Rao P.H., Medina D., Pati D. 2008 b. Overexpression of Separase induces aneuploidy mammary tumorigenesis. *PNAS* 105, 13033-13038. Doi: 10.1073/pnas.0801610105.
256. Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S. 2016. Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 1534. Doi: 10.3390/ijms17091534.
257. Żegała M., Wiland E., Kurpisz M. 2006. Topologia chromosomów w jądrze komórkowym. Diploidalna komórka somatyczna. Część 1. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (online)* 60, 331-342.

8. Spis rycin, fotografii i wykresów

Spis rycin:

1. **Ryc.1.** Kariogram psa domowego, $2n=78,XY$. Barwienie GTG (O'Brien i wsp. 2006).
2. **Ryc.2.** Kariogram lisa polarnego, $2n=50, XY$. Barwienie GTG (O'Brien i wsp. 2006).
3. **Ryc.3.** Polimorfizm liczby chromosomów w kariotypie lisa polarnego (*Alopex lagopus*): a) osobnik posiadający $2n=48$ chromosomów, b) heterozygota z $2n=49$ chromosomów. Strzałkami zaznaczono chromosomy akrocentryczne należące do pary 23 i 24 (Christensen i Pedersen 1982, za Gustavsson 1979).

Spis fotografii:

1. **Fot 1.** Płytki metafazowe: a) z prawidłowym kariotypem psa domowego $2n=78,XY$; b) wariant kariotypu lisa polarnego $2n=49,XX$. Powiększenie 1000x, skala 10 μm .
2. **Fot. 2.** Ocena żywotności komórek po barwieniu błękitem trypanu w komorze Bürkera: a) limfocyty psa domowego z próbki kontrolnej po 3h; b) limfocyty psa domowego po 24h ekspozycji na AgNP 20 $\mu\text{g/ml}$; c) limfocyty lisa polarnego z próbki kontrolnej po 3h; d) limfocyty lisa polarnego po ekspozycji 3h na AgNO₃ $\mu\text{g/ml}$. Zdjęcia przedstawione w skali szarości prezentują komórki żywe, jako jasne nie wybarwione natomiast komórki martwe są widoczne na fotografiach jako szare. Powiększenie 250x (a-c) i 125x (d). Skala 10 μm .
3. **Fot. 3.** Płytki metafazowe barwione techniką GTG w teście Fragile site: a) psa domowego $2n=78,XY$; b) lisa polarnego $2n=49,XX$. Powiększenie 1000x, skala 10 μm .
4. **Fot. 4.** Płytki metafazowe z chromosomami psa domowego: a i d) $2n=78, XY$, b i c) $2n=78, XX$. Chromosomy barwione Giemszą w teście FS z poszczególnych grup doświadczalnych: a) grupa kontrolna; b) po ekspozycji na AgNP; c) po ekspozycji na AgNP+C; d) po ekspozycji na AgNO₃. Powiększenie 1000x, skala 10 μm . Strzałkami zaznaczono przykładowe FS.
5. **Fot. 5.** Płytki metafazowe z chromosomami lisa polarnego $2n=49,XX$. Chromosomy barwione Giemszą w teście FS z poszczególnych grup doświadczalnych: a) grupa

kontrolna; b) po ekspozycji na AgNP; c) po ekspozycji na AgNP+C; d) po ekspozycji na AgNO₃. Powiększenie 1000x, skala 10 μm. Strzałkami zaznaczono przykładowe FS.

6. **Fot. 6.** Komórki analizowane w ramach testu CBMN w próbkach psa domowego: a) komórka dwujądrzasta BNC; b) komórka dwujądrzasta z jednym mikrojądrem BNC+1MN; c) komórka dwujądrzasta z dwoma mikrojądrami BNC+2MN; d) komórka dwujądrzasta z mostkiem nukleoplazmatycznym NPB; e) komórka dwujądrzasta z pękiem jądrowym NBUD; f) komórka wielojądrzasta MNC. Barwienie Giemśa, powiększenie 1000x, skala 10 μm. Strzałkami zaznaczono formy niestabilności chromosomowych.

7. **Fot. 7.** Komórki analizowane w ramach testu CBMN w próbkach lisa polarnego: a) komórka dwujądrzasta BNC; b) komórka dwujądrzasta z jednym mikrojądrem BNC+1MN; c) komórka dwujądrzasta z dwoma mikrojądrami BNC+2MN; d) komórka dwujądrzasta z mostkiem nukleoplazmatycznym NPB; e) komórka dwujądrzasta z pękiem jądrowym NBUD; f) komórka wielojądrzasta MNC. Barwienie Giemśa, powiększenie 1000x, skala 10 μm. Strzałkami zaznaczono formy niestabilności chromosomowych.

8. **Fot. 8.** Limfocyty psa domowego po teście kometowym, barwione bromkiem etydyny, z poszczególnych grup doświadczalnych: a) grupa kontrolna; b) po ekspozycji na AgNP; c) po ekspozycji na AgNP+C; d) po ekspozycji na AgNO₃. Powiększenie 400x, skala 10 μm.

9. **Fot. 9.** Limfocyty lisa polarnego po teście kometowym, barwione bromkiem etydyny, z poszczególnych grup doświadczalnych: a) grupa kontrolna; b) po ekspozycji na AgNP; c) po ekspozycji na AgNP+C; d) po ekspozycji na AgNO₃. Powiększenie 400-krotne, skala 10 μm..

Spis wykresów:

1. **Wykres 1.** Rodzaje uszkodzeń chromosomów w teście Fragile site w komórkach pochodzących od psa domowego.

2. **Wykres 2.** Rodzaje uszkodzeń chromosomów w teście Fragile site w komórkach pochodzących od lisa polarnego.

9. Spis tabel

1. **Tabela 1.** Średnia procentowa przeżywalność komórek w grupach kontrolnych u badanych gatunków zwierząt.
2. **Tabela 2.** Żywotność komórek po ekspozycji na badane roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych psowatych.
3. **Tabela 3.** Żywotność komórek w zależności od dawki roztworów srebra u badanych psowatych.
4. **Tabela 4.** Żywotność komórek w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych.
5. **Tabela 5.** Żywotność komórek w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji.
6. **Tabela 6.** Średnia liczba miejsc łamliwych w komórkach krwi obwodowej po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do próby kontrolnej u badanych gatunków psowatych.
7. **Tabela 7.** Średnia liczba miejsc łamliwych w komórkach w zależności od dawki roztworów srebra u badanych gatunków psowatych.
8. **Tabela 8.** Średnia liczba miejsc łamliwych w komórkach w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych.
9. **Tabela 9.** Średnia liczba miejsc łamliwych w komórkach krwi w zależności od działania zastosowanej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji.
10. **Tabela 10.** Średnia liczba BNC z 1 lub 2 mikrojądrami w komórkach krwi obwodowej po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych gatunków psowatych.
11. **Tabela 11.** Średnia liczba BNC z 1 lub 2 mikrojądrami w komórkach w zależności od dawki roztworów srebra u badanych psowatych.
12. **Tabela 12.** Średnia liczba BNC z 1 lub 2 mikrojądrami w komórkach w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych.

13. **Tabela 13.** Średnia liczba BNC z 1 mikrojądrem w komórkach w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji.
14. **Tabela 14.** Średnia liczba BNC z 2 mikrojądrami w komórkach w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji.
15. **Tabela 15.** Średnia liczba NPB i NBUD w komórkach krwi obwodowej po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych gatunków psowatych.
16. **Tabela 16.** Średnia liczba NPB i NBUD w komórkach w zależności od dawki roztworów srebra u badanych gatunków psowatych.
17. **Tabela 17.** Średnia liczba NPB i NBUD w komórkach w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych
18. **Tabela 18.** Średnia liczba NPB w komórkach w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji.
19. **Tabela 19.** Średnia liczba NBUD w komórkach w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji.
20. **Tabela 20.** Średnia liczba komórek wielojądrzastych w komórkach krwi obwodowej po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych gatunków psowatych.
21. **Tabela 21.** Średnia liczba komórek wielojądrzastych w komórkach krwi w zależności od dawki roztworów srebra u badanych *Canidae*.
22. **Tabela 22.** Średnia liczba komórek wielojądrzastych w komórkach krwi w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych.
23. **Tabela 23.** Średnia liczba komórek wielojądrzastych w komórkach krwi w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji.

24. **Tabela 24.** Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w komórkach krwi obwodowej po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych gatunków psowatych.

25. **Tabela 25.** Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w komórkach krwi w zależności od dawki roztworów srebra u badanych gatunków psowatych.

26. **Tabela 26.** Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w komórkach krwi w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych.

27. **Tabela 27.** Średnia procentowa zawartość DNA w ogonie komety w komórkach w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji.

28. **Tabela 28.** Średnia wartość momentu ogonowego w komórkach krwi obwodowej po ekspozycji na roztwory srebra w porównaniu do grupy kontrolnej u badanych gatunków psowatych.

29. **Tabela 29.** Średnia wartość momentu ogonowego w komórkach w zależności od dawki roztworów srebra u badanych gatunków psowatych.

30. **Tabela 30.** Średnia wartość momentu ogonowego w komórkach w zależności od czasu ekspozycji komórek krwi na działanie roztworów srebra u badanych gatunków psowatych.

31. **Tabela 31.** Średnia wartość momentu ogonowego w komórkach krwi w zależności od działania konkretnej dawki roztworu srebra w danym czasie ekspozycji.

10. Streszczenie

Rozwój nanotechnologii i szerokie wykorzystywanie nanocząstek srebra w różnych gałęziach przemysłu wiąże z ciągłym poszukiwaniem informacji na temat potencjalnie szkodliwego wpływu AgNPs na organizmy żywe. Nanocząstki srebra ze względu na swoje niewielkie rozmiary i unikalne właściwości fizyko-chemiczne mogą wykazywać działanie genotoksyczne i cytotoksyczne w stosunku do komórek eukariotycznych. AgNPs uwolnione do środowiska, pozostają w nim, wchodząc w interakcję z otaczającymi ją elementami ekosystemu, stanowiąc zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Dotychczas wykazano, że AgNPs mogą wnikać do wnętrza organizmu, a następnie odkładać się w tkankach i narządach. W obrębie komórek nanocząstki srebra mogą wykazywać toksyczne działanie przez generowanie ROS, zaburzeń podziału komórkowego czy uszkodzeń DNA. W związku ze zróżnicowanymi właściwościami AgNPs, zależnymi od metody produkcji (chemiczna, fizyczna, biologiczna) niezwykle istotnym zagadnieniem jest określenie wpływu nanocząstek srebra na genom zwierząt i ludzi. Zmiany w obrębie chromatyny jądrowej indukowane na skutek działania AgNPs mogą być obserwowane na różnym stopniu jej upakowania, skutkując zaburzeniem stabilności genomu. Do określenia genotoksycznego i cytotoksycznego charakteru AgNPs wykorzystywane są cytogenetyczne testy niestabilności, takie jak, test kometowy, test mikrojądrowy czy analiza miejsc łamliwych.

Celem podjętych w dysertacji badań była ocena struktury chromatyny oraz integralności DNA jądrowego w komórkach somatycznych dwóch wybranych przedstawicieli rodziny *Canidae*: psa domowego (*Canis familiaris*) i lisa polarnego (*Alopex lagopus*), poddanych działaniu nanocząstek srebra wyprodukowanych metodą fizyczną wysokonapięciowych wyładowań w łuku elektrycznym, HVAD, w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem cytogenetycznych testów diagnostycznych: Fragile site, mikrojądrowego w wariancie CBMN i kometowego. Dodatkowym celem był próba określenia genotoksycznego charakteru nanocząstek srebra w zależności od zastosowanej dawki oraz czasu ekspozycji komórek.

Materiał do badań stanowiła pełna krew obwodowa pobrana od dwóch gatunków psowatych: psa domowego i lisa polarnego. Dla każdego gatunku grupa doświadczalna stanowiła 10 osobników. Komórki krwi obwodowej poddano ekspozycji

na działanie trzech roztworów koloidalnych srebra. W badaniach wykorzystano nanocząstki srebra produkowane metodą HVAD, a otrzymane w dwóch roztworach: w wodzie destylowanej – AgNP oraz w roztworze trójcytrynianu sodu – AgNP+C. Roztworem odniesienia i wskaźnikiem dla toksyczności nanocząstek srebra był azotan (v) srebra. Ocenę toksyczności trzech roztworów srebra prowadzono w trzech stężeniach 5, 10 i 20 µg/ml i w dwóch okresach ekspozycji komórek 3h i 24h. Próbę odniesienia dla związków srebra stanowiły próby kontrolne. Analizę wpływu trzech roztworów srebra, dawek i czasu ekspozycji na komórki krwi obwodowej psowatych prowadzono w oparciu o ocenę żywotności komórek, występowania miejsc łamliwych w teście Fragile site, występowanie mikrojąder, mostków nukleoplazmatycznych i pąków jądrowych w teście mikrojądrowym z zahamowaniem cytokinezy oraz zaburzeń integralności DNA w teście kometowym.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że nanocząstki srebra produkowane metodą fizyczną HVAD działają genotoksyczne na komórki somatyczne ssaków. Potwierdzono, że niskie stężenia nanocząstek srebra w zakresie od 5 do 20 µg/ml powodują zmiany integralności chromatyny jądrowej w komórkach krwi obwodowej psowatych. Po analizie testem kometowym i Fragile site stwierdzono, że genotoksyczność AgNP produkowanych metodą HVAD była istotnie zależna od dawki i czasu ekspozycji. Ponadto, wykazano, że komórki krwi obwodowej psa domowego charakteryzowały się mniejszą stabilnością genomu, wynikającą z większej podatności na powstawanie uszkodzeń po krótkotrwałej ekspozycji na badane roztwory koloidalne srebra. Z kolei, w komórkach krwi obwodowej lisa polarnego poziom uszkodzeń wzrastał po 24h ekspozycji, co wskazuje na większą stabilność genomu tego gatunku.

Podsumowując, przeprowadzone w niniejszej dysertacji badania potwierdziły genotoksyczny charakter trzech roztworów koloidalnych srebra: AgNP, AgNP+C i AgNO₃ w stosunku do komórek somatycznych ssaków.

11. Summary

The development of nanotechnology and the widespread use of silver nanoparticles in various industries is associated with a continuous quest for information on the potentially harmful effects of AgNPs on living organisms. Silver nanoparticles, due to their small size and unique physical and chemical properties, may exhibit genotoxic and cytotoxic effects against eukaryotic cells. When released into the environment, AgNPs remain in the environment, interacting with surrounding ecosystem components, posing a threat to human and animal health. To date, it has been shown that AgNPs can enter the body and subsequently deposit in tissues and organs. Within cells, silver nanoparticles can cause toxic effects by generating ROS, disturbed cell division or DNA damage. Due to different properties of AgNPs, which depend on the production method (chemical, physical, biological) it is extremely important to determine the effect of silver nanoparticles on the animal and human genome. Changes in nuclear chromatin induced by AgNPs can be observed at different stages of its formation, resulting in disruption of genome stability. Cytogenetic instability assays such as, comet assay, micronucleus assay or fragile site assay are used to determine the genotoxic and cytotoxic nature of AgNPs.

The aim of this dissertation was to evaluate chromatin structure and nuclear DNA integrity in somatic cells of two selected representatives of the Canidae family: domestic dog (*Canis familiaris*) and blue fox (*Alopex lagopus*), treated with silver nanoparticles produced by the physical method of high voltage arc discharge, HVAD, *in vitro* using cytogenetic diagnostic tests: Fragile site, micronucleus variant CBMN and comet assay. An additional aim was to try to determine the genotoxic character of silver nanoparticles depending on the applied dose and time of cell exposure.

The material for the study consisted of whole peripheral blood collected from two canine species: domestic dog and blue fox. For each species the experimental group consisted of 10 individuals. Peripheral blood cells were exposed to three colloidal silver solutions. Silver nanoparticles produced by HVAD method and obtained in two solutions: in distilled water - AgNP and in sodium tricitrate solution - AgNP+C were used in the study. The reference solution and indicator for the toxicity of silver nanoparticles was silver nitrate. The toxicity evaluation of the three silver solutions was conducted at three concentrations of 5, 10 and 20 µg/ml and two cell exposure periods

of 3h and 24h. The reference sample for the tested silver solutions were the control samples. The effects of the three silver solutions, doses and exposure time on canine peripheral blood cells were analyzed by assessing cell viability, the frequency of breakage sites in the Fragile site assay, the occurrence of micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds in the cytokinesis block micronucleus assay and disruption of DNA integrity in the comet assay.

Based on the results, it was concluded that silver nanoparticles produced by HVAD physical method cause genotoxic effects on mammalian somatic cells. Low concentrations of silver nanoparticles in the range of 5 to 20 $\mu\text{g/ml}$ were confirmed to cause changes in nuclear chromatin integrity in canine peripheral blood cells. After analysis by comet assay and Fragile site assay, it was found that the genotoxicity of AgNP produced by HVAD method was significantly dose and exposure time dependent. Furthermore, it was shown that peripheral blood cells of the domestic dog had lower genome stability, resulting from a higher susceptibility to damage formation after short-term exposure to the tested colloidal solutions of silver. In contrast, in the peripheral blood cells of the blue fox, the level of damage increased after 24 h of exposure, indicating greater genome stability in this species.

In conclusion, the studies conducted in this dissertation confirmed the genotoxic nature of three silver colloidal solutions, AgNP, AgNP+C and AgNO₃, against mammalian somatic cells.