

mgr Patrycja Anna Talarska-Markiewicz

**Wpływ nanocząstek na reaktywność ludzkich leukocytów
krwi obwodowej**

**Rozprawa na stopień naukowy doktora w dziedzinie nauk medycznych
i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki o zdrowiu**

Promotor: dr hab. n. o zdr. Jakub Żurawski

Miejsce prowadzenia badań: Zakład Immunobiologii



Kolegium Nauk o Zdrowiu

Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań, 2021

Spis treści

Wykaz stosowanych skrótów	10
Wstęp	15
1. Charakterystyka nanocząstek	15
1.1. Zastosowanie nanocząstek srebra	15
1.2. Zastosowanie nanocząstek złota	16
1.3. Wchłanianie nanocząstek srebra	16
1.4. Wchłanianie nanocząstek złota	17
2. Wybuch oddechowy	19
2.1. Reaktywne formy tlenu	19
2.1.1. Drogi powstawania reaktywnych form tlenu	20
3. Kaspaza-1	21
3.1. Pyroptoza i inflamasom	21
3.2. Interleukina-1	25
Materiał badawczy	28
Cele pracy	29
Materiały i metody	30
1. Materiały	30
1.1. Badania wstępne	30
1.1.1. Opis wykorzystanych nanocząstek złota	30
1.1.2. Otrzymywanie nanocząstek złota	31
1.1.2.1. Kuliste nanocząstki złota	31
1.1.2.2. Prętopodobne nanocząstki złota	32
1.1.3. Otrzymanie nanocząstek srebra (AgNP)	34
2. Metody	37
2.1. Techniki użyte w pomiarach	37
2.1.1. Cytometria przepływowa	37
2.1.2. ELISA (test immunoenzymatyczny)	38
2.2. Ilościowa ocena aktywności wybuchu oddechowego monocytów i granulocytów w heparynizowanej pełnej krwi ludzkiej	39
2.2.1. Zasada metody	39
2.2.2. Przygotowanie materiału do badań	40
2.2.2.1. Inkubacja z nanocząstkami złota	40
2.2.2.2. Inkubacja z nanocząstkami srebra	44

2.3.	Ocena wpływu nanocząstek srebra i złota we krwi na indukcję pyroptozy	46
2.3.1.	Zasada metody.....	46
2.3.2.	Przygotowanie materiału do badań	47
2.3.2.1.	Inkubacja z nanocząstkami złota	47
2.3.2.2.	Inkubacja z nanocząstkami srebra	50
2.4.	Określenie stężenia interleukiny-1 β	52
2.4.1.	Zasady metody.....	52
2.4.2.	Przygotowanie materiału do badań	52
2.5.	Analiza statystyczna.....	54
2.5.1.	Ocena aktywności wybuchu oddechowego monocytów i granulocytów w heparynizowanej pełnej krwi ludzkiej.....	54
2.5.2.	Ocena indukcji pyroptozy wywołanej inkubacją krwi z nanocząstkami srebra i złota	54
2.5.3.	Ocena wartości interleukiny-1 β	55
	Wyniki	56
1.	Wyniki badań wstępnych.....	56
1.1.	Porównanie próbki zawierającej rodaminę i bufor z próbkami zawierającymi rodaminę i nanocząstki złota (Au1-Au6).....	56
1.2.	Porównanie próbki zawierającej rodaminę, PMA i bufor z próbkami zawierającymi rodaminę, PMA i Au1-Au6.....	57
I.	Ocena aktywności wybuchu oddechowego granulocytów i monocytów w heparynizowanej pełnej krwi ludzkiej	59
A.	Komórki inkubowane z nanocząstkami złota	61
1.	Granulocyty	61
1.1.	Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą i nanocząstkami złota	61
1.1.1.	Porównanie próbek zawierających rodaminę i bufor względem próbek z rodaminą i Au3 lub Au6	62
1.1.1.1.	Próbka zawierająca rodaminę i bufor vs. rodaminę i Au3	62
1.1.1.2.	Próbka zawierająca rodaminę i bufor vs. rodaminę i Au6	63
1.1.2.	Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz Au3 lub Au6 w różnych stężeniach przy tym samym czasie inkubacji.....	64
1.1.2.1.	Próbki zawierające rodaminę oraz inkubowane przez 30 minut z Au3 lub Au6 w różnych stężeniach.....	64
1.1.2.2.	Próbki zawierające rodaminę oraz inkubowane przez 60 minut z Au3 lub Au6 w różnych stężeniach.....	65

1.1.3. Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz Au ³ lub Au ⁶ w tym samym stężeniu 20, 100 lub 200 µg/ml i różnym czasie inkubacji.....	65
1.1.3.1. Próbka zawierająca rodaminę oraz Au ³	65
1.1.3.2. Próbka zawierająca rodaminę oraz Au ⁶	65
1.1.1. Porównanie prób zawierających rodaminę ze względu na typ nanocząstek złota przy tym samym czasie inkubacji i różnym stężeniu.....	66
1.2. Średnia intensywność fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i AuNP	68
1.2.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA i bufor względem próbek z rodaminą, PMA i Au ³ lub Au ⁶	68
1.2.1.1. Próbka zawierająca rodaminę PMA i bufor vs. rodaminę, PMA i Au ³	68
1.2.1.2. Próbka zawierająca rodaminę PMA i bufor vs. rodaminę, PMA i Au ⁶	69
1.2.2. Porównanie próbek zawierających rodaminę i PMA z zastosowaniem różnych zmiennych - typu nanocząstek złota Au ³ lub Au ⁶ w różnych stężeniach i czasach inkubacji .	70
B. Komórki inkubowane z nanocząstkami srebra	72
1. Granulocyty	72
1.1. Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą i nanocząstkami srebra	72
1.1.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę i bufor względem próbek z rodaminą i Ag	72
1.1.2. Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz Ag z wykorzystaniem różnych stężeń przy tym samym czasie inkubacji.....	73
1.1.3. Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz Ag w tym samym stężeniu 20, 100 lub 200 µg/ml i różnym czasie inkubacji	73
1.2. Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i nanocząstki srebra ..	74
1.2.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA i bufor względem próbek z rodaminą, PMA i Ag	74
1.2.3.1. Próbka zawierająca rodaminę, PMA oraz Ag w stężeniu 20 µg/ml	75
1.2.3.2. Próbka zawierająca rodaminę, PMA oraz Ag w stężeniu 100 µg/ml	76
1.2.3.3. Próbka zawierająca rodaminę, PMA oraz Ag w stężeniu 200 µg/ml	76
C. Komórki inkubowane z nanocząstkami złota	77
1. Monocyty.....	77
1.1. Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą i nanocząstkami złota	77
1.1.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę i bufor względem próbek z rodaminą i Au ³ lub Au ⁶	77

1.1.1.1.	Próbka zawierająca rodaminę i bufor vs. rodaminę i Au3	77
1.1.1.2.	Próbka zawierająca rodaminę i bufor vs. rodaminę i Au6	78
1.1.2.	Porównanie w obrębie prób zawierających rodaminę z zastosowaniem zmiennych - typu nanocząstek złota Au3 lub Au6 w różnych stężeniach i czasie inkubacji	79
1.2.	Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i nanocząstkami złota	80
1.2.1.	Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA i bufor względem próbek z rodaminą, PMA i Au3 lub Au6	80
1.2.1.1.	Próbka zawierająca rodaminę PMA i bufor vs. rodaminę, PMA i Au3	80
1.2.1.2.	Próbka zawierająca rodaminę PMA i bufor vs. rodaminę, PMA i Au6	81
1.2.2.	Porównanie w obrębie komórek wykazujących stan zapalny z zastosowaniem różnych zmiennych tj. typu nanocząstek złota Au3 lub Au6 w różnych stężeniach i czasie inkubacji	82
D.	Komórki inkubowane z nanocząstkami srebra	84
1.	Monocyty	84
1.1.	Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą i Ag	84
1.1.1.	Porównanie próbek zawierających rodaminę i bufor względem próbek z rodaminą i Ag	84
1.1.2.	Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz inkubowanych z nanocząstkami srebra w różnym stężeniu	85
1.1.2.1.	Porównanie próbek zawierających rodaminę i PMA oraz inkubowanych przez 30 minut z nanocząstkami srebra w różnym stężeniu	85
1.1.2.2.	Porównanie próbek zawierających rodaminę i PMA oraz inkubowanych przez 60 minut z nanocząstkami srebra w różnym stężeniu	85
1.1.3.	Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz Ag w stężeniu 20, 100 lub 200 µg/ml przy różnym czasie inkubacji	86
1.2.	Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i Ag	87
1.2.1.	Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA i bufor względem próbek z rodaminą, PMA i Ag	87
1.2.2.	Porównanie próbek zawierających rodaminę i PMA oraz inkubowanych z nanocząstkami srebra w różnym stężeniu	88
1.2.3.	Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA oraz Ag w stężeniu 20, 100 lub 200 µg/ml przy różnym czasie inkubacji	89
II.	Ocena wpływu nanocząstek srebra i złota we krwi na indukcję pyroptozy	90
A.	Komórki inkubowane z nanocząstkami złota	91

1.	Granulocyty	91
1.1.	Porównanie komórek prawidłowych względem komórek wykazujących pyroptozę	91
1.2.	Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę zawierających bufor z komórkami zawierającymi nanocząstki złota Au3 lub Au6	93
1.2.1.	Próbka zawierająca bufor vs. próbka zawierająca Au3	93
1.2.2.	Próbka zawierająca bufor vs. próbka zawierająca Au6	94
1.2.3.	Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę inkubowanych przez 30 lub 60 minut z Au3 lub Au6 w różnym stężeniu	95
1.2.4.	Porównanie w obrębie komórek pyroptotycznych inkubowanych w różnym czasie z Au3 lub Au6 w stężeniu 20, 100 lub 200 µg/ml	95
1.2.4.1.	Próbka zawierająca Au3 w stężeniu 20 µg/ml	95
1.2.4.2.	Próbka zawierająca Au3 w stężeniu 100 µg/ml	96
1.2.4.3.	Próbka zawierająca Au3 w stężeniu 200 µg/ml	96
1.2.4.4.	Próbka zawierająca Au6 w stężeniu 20, 100 lub 200 µg/ml	96
1.2.5.	Porównanie prób inkubowanych z nanocząstkami złota Au3 vs. Au6 przez 30 lub 60 minut w różnym stężeniu	97
B.	Komórki inkubowane z nanocząstkami srebra	98
1.	Granulocyty	98
1.1.	Porównanie komórek prawidłowych względem komórek wykazujących pyroptozę	98
1.2.	Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę zawierających bufor z komórkami zawierającymi nanocząstki srebra	99
1.2.1.	Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę inkubowanych z nanocząstkami srebra przez 30 lub 60 minut	100
1.2.2.	Porównanie w obrębie komórek pyroptotycznych z wykorzystaniem tego samego stężenia nanocząstek srebra	100
C.	Komórki inkubowane z nanocząstkami złota	102
2.	Monocyty	102
2.1.	Porównanie komórek prawidłowych względem komórek wykazujących pyroptozę	102
2.2.	Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę zawierających bufor z komórkami zawierającymi nanocząstki złota	103
2.2.1.	Porównanie próbek zawierających bufor względem próbek z Au3 lub Au6	103
2.2.1.1.	Próbka zawierająca bufor vs. Au3	103
2.2.1.2.	Próbka zawierająca bufor vs. Au6	104

2.2.2. Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę z zastosowaniem różnych zmiennych, tj. typu nanocząstek złota Au3 lub Au6 w różnych stężeniach i czasie inkubacji.	105
D. Komórki inkubowane z nanocząstkami srebra	106
1. Monocyty	106
1.1. Porównanie komórek prawidłowych względem komórek wykazujących pyroptozę	106
1.2. Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę zawierających bufor z komórkami zawierającymi nanocząstki srebra	107
1.3. Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę inkubowanych z nanocząstkami srebra z zastosowaniem różnych zmiennych, tj. stężenia i czasu inkubacji.	108
III. Określenie stężenia interleukiny-1 β	109
A. Komórki inkubowane z nanocząstkami złota	109
1. Porównanie w obrębie komórek zawierających bufor z komórkami zawierającymi nanocząstki złota	109
1.1. Porównanie stężenia IL-1 β w próbkach krwi inkubowanych przez 24 godziny z Au3 vs. próba kontrolna	109
1.2. Porównanie stężenia IL-1 β w próbkach krwi inkubowanych przez 24 godziny z Au6 vs. próba kontrolna	110
2. Porównanie w obrębie komórek z zastosowaniem różnych stężeń nanocząstek złota i inkubacji 24-godzinnej	110
3. Porównanie prób ze względu na typ nanocząstek złota w różnym stężeniu i 24-godzinnej inkubacji	111
B. Komórki inkubowane z nanocząstkami srebra	113
1. Porównanie próbek zawierających bufor z zawierającymi nanocząstki srebra	113
2. Porównanie próbek inkubowanych przez 24 godziny z nanocząstkami srebra w różnych stężeniach	113
Dyskusja	114
1. Funkcjonalizacja powierzchni nanocząstek	114
2. Produkcja ROS	114
2.1. Nanocząstki srebra	115
2.2. Nanocząstki złota	118
3. Wybuch oddechowy stymulowany PMA	119
3.1. Nanocząstki srebra	120
3.2. Nanocząstki złota	121

4. Ocena indukcji pyroptozy wywołanej inkubacją krwi z nanocząstkami srebra i złota	122
4.1. Nanocząstki srebra	123
4.2. Nanocząstki złota	126
5. Podsumowanie	128
Wnioski	130
Streszczenie	131
Summary	132
Spis rycin i tabel	133
Lista załączników	138
Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej	138
Załącznik 2 Opis syntezy kulistych nanocząstek złota	138
Załącznik 3. Opis syntezy prętopodobnych nanocząstek złota	139
Załącznik 4. Opis syntezy nanocząstek srebra	141
Piśmiennictwo	142

Składam najszczerze podziękowania
Promotorowi dr hab. Jakubowi Żurawskiemu,
Dr Arturowi Kostrzewie,
Dr Tomaszowi Kubackiemu,
za nieskończoną cierpliwość, okazane wsparcie,
cenne uwagi i przekazaną wiedzę.

Profesorowi Krzysztofowi Wiktorowiczowi
za mobilizowanie do pracy badawczej.

Dziękuję także Mężowi
za motywowanie do ukończenia rozprawy doktorskiej
i możliwość merytorycznych konsultacji.

Dziękuję również Rodzicom,
za całokształt wsparcia.

Wykaz stosowanych skrótów

143B	linia komórkowa ludzkiego kostniakomięsa (ang. human bone osteosarcoma)
143B	ludzka linia komórkowa kostniakomięsa (ang. human osteosarcoma cell lines)
A431	ludzka linia komórkowa nowotworu skóry (ang. human skin carcinoma)
A498	ludzka linia komórkowa raka nerki (ang. human renal cell carcinoma cells)
A549	ludzka linia komórkowa niedrobnokomórkowego raka płuca (ang. human lung carcinoma epithelial cells)
AgNP	nanocząstki srebra (ang. silver nanoparticles)
AIM2	białko indukowane interferonem (ang. interferon-inducible protein)
ALT	aminotransferaza alaninowa (ang. alanine aminotransferase)
ASC	domena rekrutacji kaspazy/ białko adaptorowe (ang. caspase-recruitment domain)
AST	aminotransferaza asparaginianowa (ang. aspartate aminotransferase)
ATP	adenozynotrifosforan (ang. adenosine triphosphate)
AuNP	nanocząstki złota (ang. gold nanoparticles)
BREC	pierwotne komórki śródbłona siatkówki bydła (ang. primary bovine retinal endothelial cells)
CARD	domena aktywacji i rekrutacji kaspaz (ang. caspase activation and recruitment domain)
CHO	linia komórkowa uniesmiertnionych komórek jajnika chomika chińskiego (ang. Chinese hamster ovary cells)
CRL-1469	linia komórek ludzkiego nowotworu trzustki (ang. human pancreatic ductal carcinoma PANC-1)
CRL-4023	uniesmiertniona ludzka linia komórek nabłonka przewodu trzustkowego (ang. immortalized human pancreas duct epithelial cell line hTERT-HPNE)
DAMP	wzorce molekularne wskazujące na uszkodzenie komórki (ang. damage associated molecular patterns)
DCF-DA	diocetan 2',7'- dichlorodihydrofluoresceiny (ang. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate)
DHR	dihydorodamina 123 (ang. dihydrorhodamine 123)
DLS	dynamiczne rozpraszanie światła (ang. dynamic light scattering)
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe (ang. deoxyribonucleic acid)
EDS	promieniowanie rentgenowskie z dyspersją energii (ang. energy dispersive X-ray)

ELISA	test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)
ER	retikulum endoplazmatyczne
FAM	karboksyluoresceina (ang. carboxyfluorescein)
FAM-VAD-	karboksyluoresceina sprzężona z syntetycznym inhibitorem kaspaz
FMK	fluorometyloketonowa pochodna kwasu walinoalanoasparginowego
FLICA	znakowane fluorescencyjnie inhibitory kaspaz (ang. fluorescent labeled inhibitor of caspase)
FMK	keton fluorometylowy (ang. fluoromethyl ketone)
FSC	detektor przedni światła rozproszonego (ang. forward scatter channel); parametr względnej wielkości komórki
GPx	peroksydaza lipidowa (ang. glutathione peroxidase)
GSH	zredukowana forma glutationu (ang. reduced glutathione)
GSSG	utleniony glutation (ang. oxidized glutathione)
GST	S-transferaza glutationu (ang. glutathione-S-transferase)
H ₂ O ₂	nadtlenek wodoru
HepG2	komórki ludzkiego nowotworu wątroby (ang. human hepatocellular carcinoma cells)
hFOB 1.19	linia komórkowa ludzkich płodowych osteoblastów (ang. human fetal osteoblast)
HRTEM	wysokorozdzielczy mikroskop transmisyjny (ang. high resolution transmission electron microscopy)
HT-1080	ludzka linia komórkowa włókniakomięsa (ang. human fibrosarcoma)
HT29	ludzka linia komórek raka okrężnicy (ang. human colonic epithelial cell line)
HUVEC	ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej (ang. human umbilical vein endothelial cells)
IFI16	białko indukowane interferonem gamma 16 (ang. interferon gamma inducible protein 16)
IFN	interferon typu I (ang. type I interferon)
IL	interleukina
IL-1R1	receptor interleukiny-1 typu I
IL-1R2	receptor interleukiny-1 typu II
IL-1 β	interleukina-1 β (ang. interleukin 1 β , interleukin-1 beta)
IMR-90	linia komórkowa ludzkich fibroblastów płucnych (ang. normal human lung fibroblast cells)
IRF	czynn timerulatorowy interferonu (ang. interferon regulatory factor)

J774.1	linia komórkowa mysich makrofagów (ang. mouse macrophage cell line)
L929	mysia linia komórkowa fibroblastów (ang. mouse fibroblast cells)
LDH	dehydrogenaza mleczanowa (ang. lactate dehydrogenase)
LMP	permeabilizacja błony lizosomalnej (ang. lysosomal membrane permeabilization)
LPS	lipopolisacharyd (ang. lipopolysaccharide)
LRR	białko zawierające powtórzenia bogate w leucynę (ang. leucine-rich repeat)
MAPK	kinaza białkowa aktywowana mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinase)
MCF-7	linia komórkowa ludzkiego raka piersi (ang. human breast adenocarcinoma cells lines)
MDA	dialdehyd malonowy (ang. malondialdehyde)
MG63	ludzka linia komórkowa kostniakomięsaka (ang. human osteosarcoma cell lines)
MPO	mieloperoksydaza (ang. myeloperoxidase)
MTT	bromek 3- (4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowy (ang. 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NACHT	domena składająca się z (NAIP, ang. NLP family apoptosis inhibitor protein), CIITA (ang. MHC class II transcription activator), HET-E (ang. incompatibility locus protein from <i>Podospora anserina</i> , TEP1 (ang. telomerase-associated protein)
NADPH	zespół oksydazy fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NE	elastaza neutrofilu (ang. neutrophil elastase)
NET	zewnątrzkomórkowe pułapki neutrofilowe (ang. neutrophil extracellular traps)
Neuro-2A	komórki mysiej linii neuroblastoma (ang. mouse neuroblastoma cell line)
NF- κ B	jądrowy czynnik transkrypcyjny, NF kappa B (ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NLR	receptory NOD-podobne (ang. nod-like receptor)
NLR1b	białko NOD-podobne (ang. NLR family, domains-containing protein 1b allele 2)
NLRC4	białko NOD-podobne, zawierające domenę 4 (ang. NLR family CARD domain-containing protein 4)
NLRP3	białko NOD-podobne, zawierające domenę 3 (ang. NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3)

NO [•]	tlenek azotu
NO ₂ [•]	dwutlenek azotu
NOD1	białko zawierające domenę oligomeryzacyjną wiążącą nukleotyd 1 (ang. nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1)
NOD2	białko zawierające domenę oligomeryzacyjną wiążącą nukleotyd 2 (ang. nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2)
NOX	rodzina oksydaz NADPH (ang. family of NADPH oxidases)
NR	test wychwytu czerwieni obojętnej (ang. neutral red uptake viability assay)
O ₂	tlen cząsteczkowy
O ₂ ^{•-}	anionorodnik ponadtlenkowy
O ₃	ozon
ONOO ⁻	anion nadtlenoazotynowy
OH [•]	rodnik hydroksylowy
PAMP	wzorce molekularne związane z patogenem (ang. pathogen associated molecular patterns)
PBMC	jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells)
PEG	tiomonometylowy glikol polietylenowy (ang. O-[2-(3-Mercaptopropionylamino)ethyl]-O'-methylpolyethylene glycol)
PKC	kinaza białkowa C (ang. protein kinase C)
PMA	12-mirystynian 13-octanu forbolu (ang. phorbol 12-myristate 13-acetate)
pro-IL	prekursorowa postać interleukiny
pro-IL-1β	prekursorowa postać interleukiny-1β (ang. pro-interleukin-1β)
PRR	receptor rozpoznający wzorce (ang. pattern recognition receptor)
PVP	poliwinylopirolidon (ang. polyvinylpyrrolidone)
RAW264.7	linia komórkowa mysich makrofagów monocytowych (ang. mouse macrophage cell line)
RCKiK	Regionalne Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa
RIG-I	gen I indukowany kwasem retinowym (ang. retinoic acid-inducible gene I)
RLR	receptory RIG-I – podobne (ang. RIG-I-like receptor)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. ribonucleic acid)
RNS	reaktywne formy azotu (ang. reactive nitrogen species)
RO [•]	rodnik alkoksylowy
RO ₂ [•]	rodnik peroksyalkoksylowy
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species)
SEM	skaningowy mikroskop elektronowy (ang. scanning electron microscope)

SGC-7901	ludzka linia komórkowa raka żołądka (ang. human stomach cancer cells)
SH-SY5Y	komórki ludzkiej linii neuroblastoma (ang. human neuroblastoma)
SSC	detektor boczny światła rozproszonego (ang. side scatter channel); parametr względnej ziarnistości komórki
TEM	transmisyjny mikroskop elektronowy (ang. transmission electron microscope)
THP-1	ludzka linia komórkowa białaczki monocytowej (ang. human monocytic leukemia cell line)
TLR	receptory Toll-podobne (ang. toll-like receptors)
TNF	czynnik martwicy nowotworu (ang. tumor necrosis factor)
TNF α	czynnik martwicy nowotworów alfa (ang. tumor necrosis factor α)
U251	ludzka linia komórkowa glejaka (ang. human glioblastoma cells)
UV-Vis	spektroskopia w ultrafiolecie i świetle widzialnym (ang. ultraviolet-visible spectroscopy)
WBC	białe krwinki (ang. white blood cells)

Wstęp

1. Charakterystyka nanocząstek

Nanocząstki to struktury, których co najmniej jeden z wymiarów zawiera się w przedziale od 1 do 100 nm [1]. Nanocząstki przedostają się do wnętrza komórki głównie na drodze endocytozy, poprzez tworzenie się pęcherzyków endocytarnych i uwalnianie jonów cząstek z pęcherzyków do komórki [2,3].

Szybki postęp nanotechnologii przyczynił się do sposobu, w jaki ludzie diagnozują, zwalczają i pokonują różne choroby. Umożliwiło to odmienne podejście terapeutyczne niż przy tradycyjnych metodach leczniczych. Nanocząstki stosowane są m.in. jako środki przeciwbakteryjne, a także, jako składowe systemów dostarczania leków i narzędzi diagnostycznych. Używane są również jako składniki produktów do pielęgnacji ciała oraz kosmetyków [4,5].

Z klinicznego punktu widzenia zastosowanie nanocząstek wynika z tego, że małe rozmiarowo nanocząstki posiadają wysoki stosunek powierzchni do objętości i wykazują wysoką aktywność biologiczną nawet przy niskim stężeniu w porównaniu z większymi cząstkami. Częste wykorzystywanie nanocząstek w medycynie, jest związane z ich właściwościami fizykochemicznymi, między innymi zdolnościami katalitycznymi oraz stosunkowo niską temperaturą topnienia (w korelacji do właściwości makroskopowych metalu, z którego powstały) [6–9].

Dodatkowo cechą charakterystyczną nanocząstek są ich różne kształty. Przykładowo, dla nanocząstek złota wyróżnić można kształt sferyczny, sześciokątny, trójkątny oraz bardziej skomplikowane przestrzennie struktury jak ośmiościany lub heksagony [10,11]. Nanocząstki są coraz częściej wykorzystywane w różnych gałęziach przemysłu. Ich formy, takie jak nanorurki, nanoprzewody, pochodne fulerenów i kropki kwantowe używane są do tworzenia nowych rodzajów narzędzi analitycznych w dziedzinie nauk przyrodniczych i biotechnologii [12].

1.1. Zastosowanie nanocząstek srebra

Nanocząstki srebra (AgNP, ang. silver nanoparticles) to jedne z najczęściej używanych substancji w produktach konsumenckich [13–16]. Stosowane są często w powłokach tkanin lub innych tekstyliach, np. odzieży sportowej, urządzeniach do przechowywania żywności, kosmetykach. Znajdują się także w produktach z sektora opieki zdrowotnej i wyrobach medycznych, takich jak środki dezynfekcyjne, opatrunki na rany, centralne cewniki żyłne czy siatki chirurgiczne. Wyniki badań wskazują także, że AgNP mogą w organizmie wykazywać właściwości cytotoksyczne, wywołując m.in.

zwiększanie przepuszczalności błon komórkowych, wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS, ang. reactive oxygen species), a także zatrzymanie replikacji kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) [12,17–20]. AgNP wykazały również właściwości przeciwbakteryjne wobec *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, grzybobójcze *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, a także przeciwwirusowe, w tym również dla wirusa SARS-CoV-2 [21–23].

Nanocząstki srebra wykazują także znaczną biogodność wynikającą z dwukierunkowych interakcji między nanocząstkami a komórkami lub tkankami gospodarza. Posiadają również właściwości optyczne i elektroniczne, zależnie od wielkości i kształtu [17,24–29].

1.2. Zastosowanie nanocząstek złota

Nanocząstki złota (AuNP, ang. gold nanoparticles) charakteryzują się łatwością asymilowania przez komórki. W związku z tym główne swoje zastosowanie znalazły w branży biomedycznej, ze względu na ich właściwości powierzchniowe, elektroniczne i optyczne. Wykorzystuje się je jako innowacyjne narzędzia w badaniach diagnostycznych, np. przy wykrywaniu biomarkerów chorób serca czy nowotworów, a także w systemach dostarczania leków [17,30–35]. Opublikowano liczne doniesienia dotyczące cytotoksyczności nanocząstek złota w zależności od ich kształtu lub struktury powłoki oraz spektrum mierzonych eksperymentalnie parametrów. Opisano toksyczność zależną od rozmiaru nanocząstek złota w stosunku do różnych typów komórek, wykazując, że mniejsze cząsteczki są bardziej toksyczne [36,37]. W przeciwieństwie do tego inne zespoły naukowców stwierdziły brak efektów cytotoksycznych w nowotworowych liniach komórkowych, poddanych działaniu AuNP [38–40].

1.3. Wchłanianie nanocząstek srebra

Nanocząstki srebra mogą przedostać się do wnętrza organizmu przez układ oddechowy, pokarmowy lub skórę [19,41].

U szczurów podlegających narażeniu inhalacyjnemu, nanocząstki srebra wykryto we krwi i płucach. W mniejszych ilościach występowały także w innych narządach wewnętrznych, takich jak wątroba, nerki, śledziona, serce i mózg. Nie stwierdzono zależnych od stężenia zmian w przyroście masy ciała, masie narządów wewnętrznych czy zmian we wskaźnikach biochemicznych. Wystąpiły natomiast różnice w parametrach oddechowych u szczurów np. zmniejszenie objętości oddechowej oraz wentylacji minutowej, a także zmiany histopatologiczne w płucach przy 90-dniowej ekspozycji na nanocząstki srebra o wielkości 20 nm [41]. U szczurów Sprague Dawley poddawanych

28-dniowej ekspozycji na aerozol AgNP obserwowano w płucach pojawienie się wielojądrowych makrofagów (ang. multinucleated macrophages), które wskazują na stan zapalny i aktywne wchłanianie nanocząstek [42].

Poprzez drogę pokarmową AgNP mogą być wchłaniane z jelit do krwi, a następnie do innych narządów, takich jak dwunastnica, wątroba, nerki i śledziona. Zostało to potwierdzone u szczurów karmionych przez zgłębnik. Nie zaobserwowano u nich jednak zmian patologicznych [43]. U myszy, którym podawano AgNP przez 14 dni również nie wykazano zmian histopatologicznych w wątrobie, nerkach, jądrach, płucach. Po 28 dniach zaobserwowano jedynie w korze nerek niewielki naciek komórkowy. Na podstawie zwiększenia stężenia cytokin prozapalnych, potwierdzono indukcję stanu zapalnego w surowicy inkubowanej z AgNP. Zaobserwowano również zwiększenie poziomu enzymów wątrobowych [44].

Z kolei u świnki morskiej stwierdzono nagromadzenie zagregowanych AgNP w warstwach naskórka, po 24-godzinnej ekspozycji przy najwyższej zastosowanej dawce (100 000 ppm). Ocena mikroskopowa nie wykazała żadnych nieprawidłowości w warstwach naskórka i skóry traktowanych koloidalnym AgNP w porównaniu z kontrolami [45].

Zbadano także przenikalność nanocząstek srebra z tekstyliów. W badaniach Bianco i wsp. ochotnicy nosili na przedramieniu rękaw zawierający nanocząstki srebra przez 8 godzin przez pięć kolejnych nocy. Badania potwierdziły obecność agregatów AgNP w skórze rogowej, natomiast w głębszych warstwach było ich zdecydowanie mniej niż w najwyższych [46]. George i wsp. wykazali obecność skupisk srebra w warstwie rogowej i głębszych warstwach naskórka zdrowych osób, eksponowanych przez 5 dni, na działanie srebra nanokrystalicznego obecnego w opatrunku. Potwierdzili tym samym możliwość przenikania AgNP przez nieuszkodzoną skórę. Pomimo osadzania się srebra w skórze właściwej, nanocząstki srebra nie przeniknęły do krążenia ogólnoustrojowego, a zatem nie powinny mieć konsekwencji narządowych [47].

1.4. Wchłanianie nanocząstek złota

Z publikacji, w których przeprowadzono badania na szczurach wynika, że nanocząstki złota mogą być wchłaniane drogą oddechową i pokarmową [19,48].

U szczurów Sprague Dawley poddanych inhalacyjnemu działaniu AuNP przez 90 dni zaobserwowano pogorszenie parametrów oddechowych tj. czynności płuc, objętości oddechowej i objętości minutowej w porównaniu z próbą kontrolną. Badanie

histopatologiczne wykazało, naciek zapalny z mieszanym typem komórek (limfocyty/neutrofile/makrofagi) i zwiększoną liczbę makrofagów u szczurów otrzymujących duże dawki AuNP ($20 \mu\text{g}/\text{m}^3$) [49]. Badania Kreyling i wsp. również potwierdziły wchłanianie nanocząstek złota drogą inhalacyjną u szczurów. Około 30% AuNP gromadziło się w nabłonku dróg oddechowych, powodując ich szybkie usuwanie śluzowo-rzęskowe i połykanie do przewodu pokarmowego. W długotrwałym eliminowaniu AuNP dominował transport za pośrednictwem makrofagów z tkanki śródmiąższowej do krtani i przewodu pokarmowego. Zaobserwowano także kumulowanie się AuNP w wątrobie, śledzionie, nerkach, macicy i mózgu [50].

U mężczyzn poddanych inhalacjom przez 2 godziny podczas przerywanego wysiłku także potwierdzono przenikanie AuNP do płuc. Złoto było wykrywane w moczu po ekspozycji na cząstki o wielkości 4 nm. W moczu ochotników wystawionych na działanie większych cząstek (34 nm), nie zaobserwowano AuNP. Także u myszy nanocząstki złota wykrywane były w moczu, tylko po ekspozycji na cząstki o długości ≤ 5 nm. Po inhalacji AuNP występowały w ludzkiej krwi na niskim poziomie, chociaż ich stężenie dla mniejszych cząstek było znacznie wyższe. Efekt ten został również potwierdzony u myszy, u których częstość występowania wykrywanego złota i jego stężenie we krwi były znacznie większe po ekspozycji na mniejsze cząstki [51].

U szczurów Wistar po 10 dniach od dożylnego podania AuNP o wielkości 25 nm, ponad 50% z nich gromadziło się w wątrobie, a mniejsze ilości w płucach i śledzionie. Było to związane z pochłanianiem AuNP przez układ fagocytów jednojądrzastych z układu krążenia. Całkowita zawartość AuNP we wszystkich narządach stanowiła 60% dawki początkowej. Natomiast po podaniu doustnym zaobserwowano prawie 50-krotnie mniejsze stężenie nanocząstek złota przy zastosowaniu tej samej dawki. Całkowita zawartość AuNP wynosiła 1,4% dawki początkowej. Większość z nich została wydalona z kałem w ciągu 4 dni po podaniu. Po 72 godzinach od podania dożylnego AuNP zaobserwowano zmiany w parametrach biochemicznych. Wraz ze wzrostem aktywności aminotransferazy asparaginianowej (AST, ang. aspartate aminotransferase), występował spadek aminotransferazy alaninowej (ALT, ang. alanine aminotransferase), co jest wskaźnikiem nieprawidłowej pracy wątroby. Zaobserwowano także wzrost stężenia glukozy we krwi, dlatego nie można wykluczyć wpływu AuNP na funkcje trzustki [52]. U myszy nerki były głównym miejscem gromadzenia się AuNP podawanych drogą pokarmową przez 8 dni. Nanocząstki złota mogą wywołać działanie przeciwzapalne

w makrofagach, poprzez redukcję receptora lipopolisacharydu na powierzchni komórki, a także katalityczną detoksykację nadtlenu azotynu i nadtlenu wodoru [53].

Badanie możliwości przechodzenia nanocząstek złota przez ludzką skórę zostało wykonane *in vitro* przy wykorzystaniu skóry poddanej resekcji chirurgicznej. Fragment skóry poddano 24-godzinnej inkubacji z AuNP. Przenikalność nanocząstek została potwierdzona przez wykonanie zdjęć z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM, ang. transmission electron microscope). Zaobserwowano nanocząstki znajdujące się w głębszej warstwie rogowej, naskórku i skórze właściwej [54]. Przenikanie nanocząstek złota przez skórę tylnej łapy i przedniej ściany brzucha szczurów Sprague Dawley potwierdzili także Raju i wsp. Mniejsze AuNP (22 nm) wykazały wyższą penetrację w porównaniu z większymi nanocząstkami (105 i 186 nm). Zbadano także wpływ 3-godzinnej inkubacji z AuNP na mysią linię komórkową fibroblastów (L929, ang. mouse fibroblast cells). W trakcie analizy nie stwierdzono wpływu AuNP na żywotność fibroblastów [55].

2. Wybuch oddechowy

Wybuch oddechowy to szybkie uwalnianie reaktywnych form tlenu (m.in. anionu nadtlenkowego i nadtlenu wodoru) z różnych typów komórek, np. z komórek odpornościowych, takich jak neutrofile i makrofagi. Jest kluczową reakcją zachodzącą w fagocytach w celu degradacji pochłoniętych cząstek i bakterii. Oksydaza zredukowanej formy fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH, ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), będąca rodziną enzymów występującą w wielu typach komórek, wytwarza anion ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) na drodze jednoelektrodowej redukcji tlenu. Rodnik ten spontanicznie reaguje z innymi cząsteczkami, tworząc kolejne wolne rodniki [49]. $O_2^{\cdot-}$ produkowany przez oksydazę NADPH jest przekształcany w H_2O_2 z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) [56]. Neutrofile i monocyty wykorzystują mieloperoksydazę do dalszego łączenia H_2O_2 z Cl^- w celu wytworzenia podchlorynu, który odgrywa rolę w niszczeniu bakterii [49]. Oprócz reaktywnych form tlenu granulocyty mogą generować także reaktywne formy azotu (RNS) poprzez aktywację indukowalnej syntazy tlenku azotu (NOS-2, ang. nitric oxide synthase-2), enzymu, który przekształca O_2 w tlenek azotu ($NO^{\cdot}$) [56].

2.1. Reaktywne formy tlenu

Reaktywne formy tlenu (ROS) mające udział w wybuchu oddechowym odnoszą się do reaktywnych metabolitów pochodzących z tlenu cząsteczkowego (O_2). Należą do nich

anionorodnik nadadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$, nadtlenek wodoru H_2O_2 , rodnik hydroksylowy $OH^{\cdot}$, rodnik peroksyalkoksyłowy $RO_2^{\cdot}$, rodnik alkoksyłowy $RO^{\cdot}$, tlen singletowy 1O_2 i ozon O_3 . Do reaktywnych utleniaczy należą także reaktywne formy azotu (RNS, ang. reactive nitrogen species) tj. tlenek azotu $NO^{\cdot}$, dwutlenek azotu $NO_2^{\cdot}$ i anion nadtlenoazotynowy $ONOO^{\cdot-}$. Stężenia ROS i RNS są równoważone przez złożone układy antyoksydacyjne, które pozwalają zachować homeostazę redoksową w komórce. W wyniku stresu oksydacyjnego reakcje utleniania przekraczają zdolności antyoksydacyjne komórki i równowaga zostaje utracona. Skutkuje to niekorzystnymi konsekwencjami biologicznymi np. peroksydacją lipidów, uszkodzeniami białek i kwasów nukleinowych, a ostatecznie może zahamować proliferację komórek i doprowadzić do jej śmierci [1,12,20,57–65]. Głównymi źródłami ROS są: mitochondrialny system transportu elektronów, a także retikulum endoplazmatyczne (ER). Światło ER posiada odpowiednie środowisko utleniające (o wysokim stosunku utlenionych do zredukowanych form glutationu (GSH)), potrzebne do zwijania białek i tworzenia wiązań dwusiarczkowych. Kolejnymi źródłami ROS w komórce są peroksosomy, mikrosomy i kompleksy NOX (oksydaza NADPH) w błonach komórkowych [2].

2.1.1. Drogi powstawania reaktywnych form tlenu

Anionorodnik nadadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$ może być wytwarzany poprzez dwa główne szlaki:

1. transfer elektronów z fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH) do O_2 katalizowanego przez oksydazę NADPH (NOX);
2. wyciek elektronów z mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów kompleksu I (oksydoreduktazyna ubichinonowa NADH) z macierzy mitochondrialnej i kompleksu III (koenzym Q, kompleks cytochromów bc1 oraz reduktaza ubichinonu / cytochrom c) z przestrzeni międzybłonowej do O_2 (ubichinon/ oksydaza cytochromu c).

Powstały na drodze obu szlaków $O_2^{\cdot-}$ może zostać przekształcony w H_2O_2 w reakcji katalizowanej przez dysmutazę nadadtlenkową [2,58].

Nadtlenek wodoru wytwarzany przez aktywowane fagocyty wpływa na proces zapalny np. kontrolując proliferację komórek lub ich apoptozę [66].

Podczas wybuchu oddechowego makrofagów nadtlenek wodoru jest generowany bez jednoczesnego wytwarzania tlenu azotu. Proces ten jest stymulowany przez bodźce inne niż lipopolisacharyd (LPS, ang. lipopolysaccharide), np. przez 12-mirystynian 13-octanu forbolu (PMA, ang. phorbol 12-myristate 13-acetate) [67]. AuNP mogą katalizować

dysproporcjonowanie nadtlenu wodoru w warunkach fizjologicznych [68], co nadaje im właściwości przeciwutleniające [53].

3. Kaspaza-1

Kaspaza-1 jest proteazą cysteinową, która przekształca prekursorową postać interleukiny-1 β (pro-IL-1 β , ang. pro-interleukin-1 β) w aktywną interleukinę-1 β (IL-1 β , ang. interleukin-1 β). Jest ona następnie uwalniana pozakomórkowo w celu programowania sygnałów zapalnych [69,70].

3.1. Pyroptoza i inflamasom

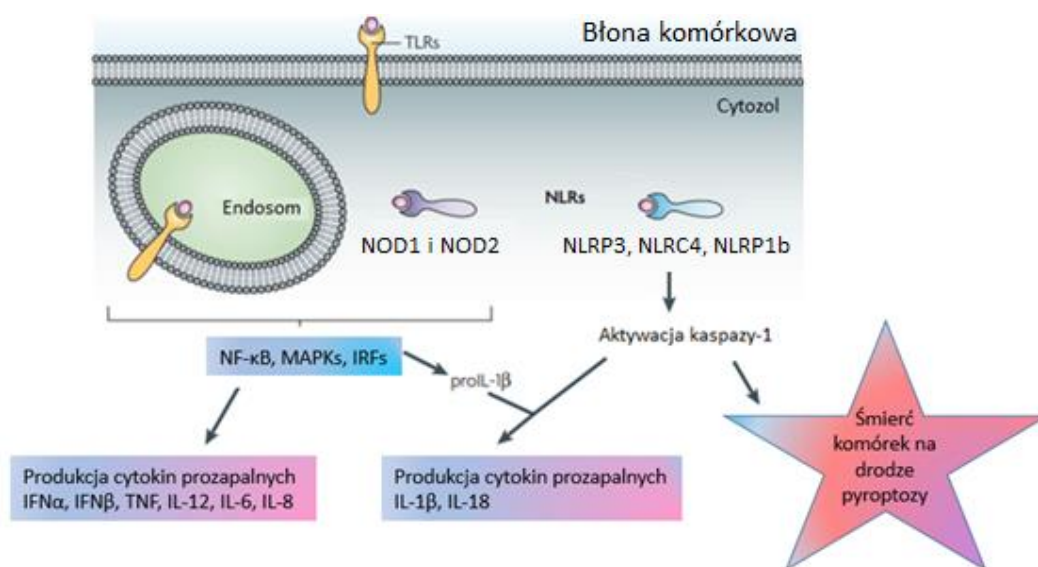
Zaktywowane kaspazy rozszczepiają substraty białkowe, prowadząc do ewentualnej dezaktywacji komórki. Kaspazy ssaków odgrywają odrębną rolę zarówno w apoptozie, jak i zapaleniu. Aktywacja kaspazy-1 prowadzi m.in. do pyroptozy i aktywności prozapalnej. Wraz z dojrzewaniem prekursora kaspazy-1 do aktywnego heterotetrameru, rozszczepia ona prekursor IL-1 β , powodując aktywację cytokiny, a następnie prowadząc do pyroptotycznej śmierci komórki. Wykazano, że makrofagi i monocyty szybko wydzielają kaspazę-1 [71–73].

Pyroptoza jest mechanizmem odporności wrodzonej, morfologicznie i mechanicznie odrębna od innych programowanych śmierci komórki. Jest związana z procesem zapalnym i sygnałami z wzorców molekularnych wskazujących na uszkodzenie komórki (DAMP, ang. damage associated molecular patterns) i wzorcami molekularnymi związanymi z patogenem (PAMP, ang. pathogen associated molecular patterns), które docierają do receptorów rozpoznających bodźce. Kaspaza-1 jest enzymem pośredniczącym w tym procesie śmierci komórki. Proces ten charakteryzuje się szybkim pęknięciem błony plazmatycznej i uwalnianiem prozapalnej zawartości wewnątrzkomórkowej. Obserwuje się również kondensację jądrową w komórce, ale zachowana jest integralność jądrowa, w przeciwieństwie do fragmentacji jądrowej obserwowanej podczas apoptozy [71,74].

Receptory Toll-podobne (TLR, ang. toll-like receptors) inicjują kaskadę sygnalizacyjną, która prowadzi do aktywacji komórkowej i produkcji cytokin zapalnych, takich jak czynnik martwicy nowotworu (TNF ang. tumor necrosis factor), interleukina-6 (IL-6, interleukin-6), interleukina-8 (IL-8, ang. interleukin-8) i interferony typu I (IFN, ang. type I interferon), w odpowiedzi na zewnątrzkomórkowe sygnały [71].

Receptory NOD-podobne (NLR, ang. nod-like receptors) biorą udział w rozpoznawaniu sygnałów zagrożenia wprowadzonych do cytozolu komórki gospodarza. NLR wyzwala aktywację kaspazy-1, co prowadzi do pyroptozy oraz

przetwarzania i uwalniania zapalnych cytokin IL-18 i IL-1 β . Receptory TLR, białko zawierające domenę oligomeryzacyjną wiążącą nukleotyd 1 (NOD1, ang. nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1) i białko zawierające domenę oligomeryzacyjną wiążącą nukleotyd 2 (NOD2, ang. nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2) stymulują wytwarzanie i akumulację pro-IL-1 β . Przygotowują komórkę do aktywacji kaspazy-1 i wytwarzania IL-1 β w odpowiedzi na późniejsze sygnały zagrożenia. Receptory TLR wykrywają sygnały zagrożenia zlokalizowane w środowisku pozakomórkowym i wewnątrz endosomów. Inicjują kaskadę sygnalizacyjną, która prowadzi do aktywacji komórkowej poprzez szlaki zależne od jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B (NF- κ B, ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), kinazy białkowej aktywowanej mitogenami (MAPK, ang. mitogen-activated protein kinase), interferonu i produkcji cytokin zapalnych (**ryc. 1**) [71].



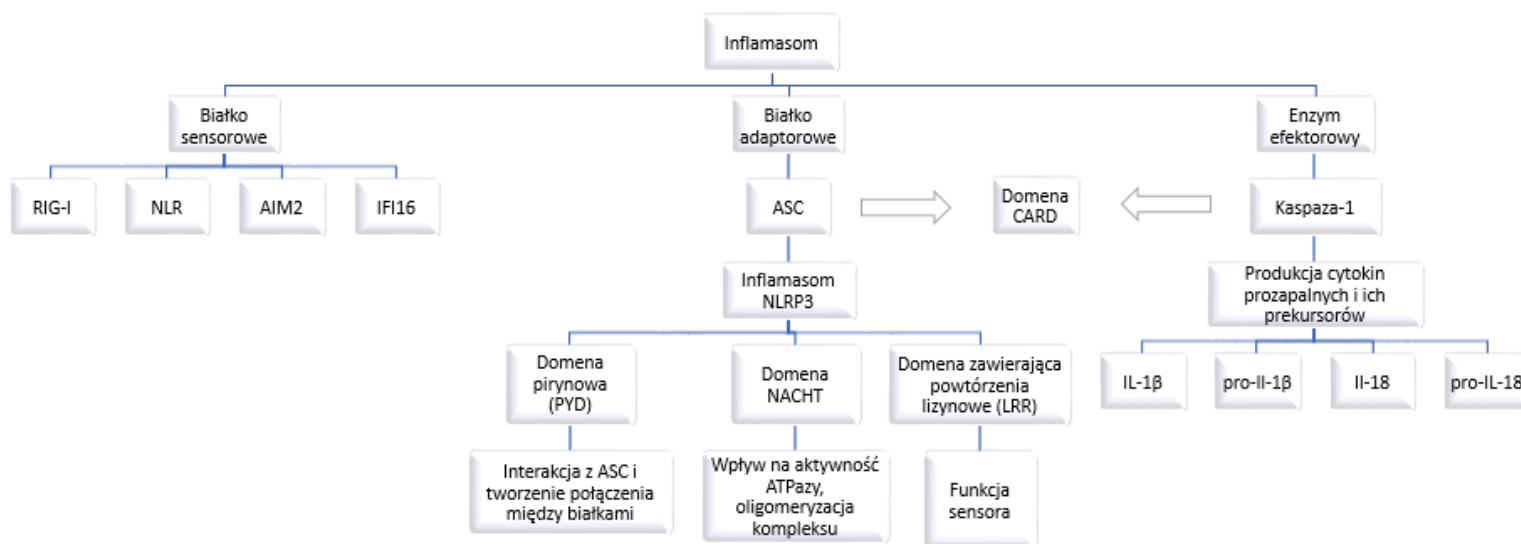
Ryc. 1. Sygnały odbierane przez komórkę prowadzące do aktywacji komórki lub jej śmierci, zmodyfikowany za: Bergsbaken i wsp. (2009) [71].

NLRP3- białko NOD-podobne, zawierające domenę 3, (ang. NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3); NLRC4 – białko NOD-podobne, zawierające domenę 4 (ang. NLR family CARD domain-containing protein 4); NLR1b – białko NOD-podobne (ang. NLR family, domains-containing protein 1b allele 2); interleukina (IL) IL-1 β , IL-18, pro-IL-1 β , IL-1 β , IL-18, pro-IL-1 β); jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (NF- κ B, ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells); kinaza białkowa aktywowana mitogenami (MAPK, ang. mitogen-activated protein kinase), interferon (IFN, ang. type I interferon); czynnik regulatorowy interferonu (IRF, ang. interferon regulatory factor); białko zawierające domenę oligomeryzacyjną wiążącą nukleotyd 1 (NOD1, ang. nucleotide-binding

oligomerization domain-containing protein 1); białko zawierające domenę oligomeryzacyjną wiążącą nukleotyd 2 (NOD2, ang. nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2).

Większość receptorów NOD może wchodzić w interakcje z białkiem zawierającym domenę rekrutacji kaspazy (ASC, ang. caspase-recruitment domain) i kaspazę-1. Powstały kompleks inflamasomu jest wskaźnikiem uszkodzenia komórek i sygnałem do dojrzewania i wydzielania IL-1 β z komórek [71,73].

Inflamasom jest kompleksem białkowym, zlokalizowanym w cytozolu. Składa się z receptorów rozpoznających wzorce białek sensorowych (PRR, ang. pattern recognition receptors), takich jak: NLR, białka indukowane interferonem (AIM2, ang. interferon-inducible protein; IFI16 ang. interferon gamma inducible protein 16), receptory RIG-I-podobne (RLR, ang. RIG-I-like receptor); białka adaptorowego (ASC) i kaspazy-1 (**ryc. 2**). Wśród nich inflamasom NLRP3 jest prototypowym inflamasomem, który jest odpowiedzialny za wykrywanie wzorców molekularnych wskazujących na uszkodzenie komórki (DAMP), tj. jonów potasu, reaktywnych form tlenu, adenosynotrifosforanu (ATP, ang. adenosine triphosphate). Wykrywa także obecność wzorców molekularnych związanych z patogenami powodującymi infekcję (PAMP), np. bakteryjne kwasy rybonukleinowe (RNA, ang. ribonucleic acid), lipopolisacharyd (LPS). W odpowiedzi na sygnał z DAMP i PAMP produkuje cytokiny prozapalne (**ryc. 2**) [73,74].



Ryc. 2. Schemat budowy inflamasomu, na podstawie: Świerczyński i wsp. (2021) [74].

AIM2 - białko indukowane interferonem, ang. interferon-inducible protein), IFI16 (białko indukowane interferonem gamma 16, ang. interferon gamma inducible protein 16), gen indukowany kwasem retinowym (RIG-I, ang. retinoic acid-inducible gen I); interleukina 1 β (IL-1 β), IL-18; precursory interleukin (pro-IL-1 β , pro-IL-18), adaptorowe białko apoptotyczne (ASC ang. adaptor-apoptosis-associated-speck-like protein), domena aktywacji i rekrutacji kaspaz (CARD, ang. caspase activation and recruitment domain), białka zawierające powtórzenia bogate w leucynę (LRR ang. leucine-rich repeat), NACHT– domena składająca się z neuronalnego białka hamującego apoptozę (NAIP, ang. NLP family apoptosis inhibitor protein), CIITA (ang. MHC class II transcription activator), HET-E (ang. incompatibility locus protein from *Podospora anserina*, TEP1 (ang. telomerase-associated protein) za: Świerczyński i wsp. (2021) [73].

Inflamasom NLRP3 to wielobiałkowy kompleks, pośredniczący w aktywacji kaspazy-1. Zależna od inflamasomu kaspaza-1 jest odpowiedzialna za aktywację silnie zapalnych cytokin IL-1 β i IL-18 oraz indukcję pyroptozy [69,75,76].

Pierwszym sygnałem do aktywacji inflamasomu jest jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B (NF- κ B), prowadzący do wytwarzania pro-IL-1 β [77]. Aktywacja inflamasomu NLRP3 może przebiegać w sposób dwuetapowy:

1. pierwszy etap pośredniczy w transkrypcyjnym i posttranslacyjnym pobudzeniu NLRP3, a następnie dochodzi do aktywacji inflamasomu. Etap 1 to synteza biologicznie nieaktywnego prekursora IL-1 β . Receptory TLR odbierają sygnał od DAMP i PAMP, następnie wysyłają go prowadząc do indukcji czynnika transkrypcyjnego NF- κ B, a także cytokin TNF i IL-1 β .

2. drugi etap to przetwarzanie w dojrzałą, biologicznie aktywną IL-1 β przez kaspazę-1 aktywowaną inflamasomem. W odpowiedzi na sygnał aktywujący, np. przyływ jonów potasowych (K⁺) i wapniowych (Ca²⁺), powstanie ROS, pojawienie się stresu retikulum endoplazmatycznego (spowodowanego gromadzeniem się nieprawidłowo sfałdowanych białek) czy działanie enzymów lizosomalnych, powoduje aktywację sensora [73,74].

Wykazano, że nanocząstki wywołują stan zapalny poprzez aktywację kompleksu białkowego inflamasomu NLRP3 [78–80].

W tworzenie się inflamasomu NLRP3 zaangażowane są 2 mechanizmy:

1. internalizacja AgNP w lizosomach, przerywająca błony lizosomalne, a następnie wywołująca uwalnianie katepsyn z lizosomów do cytoplazmy,
2. wnikanie nanocząstek do cytoplazmy bezpośrednio przez błonę komórkową i powodujące naruszenie integralności błony komórkowej, a następnie wywołany przez nanocząstki srebra wypływ K⁺ przez pory błony komórkowej [81].

3.2. Interleukina-1

W rodzinie interleukiny-1 (IL-1) zidentyfikowano i scharakteryzowano 11 molekuł: IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, IL-18, IL-33, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-36Ra, IL-37, IL-38 [73].

Interleukina-1 beta jest wytwarzana, jako prekursor (pro-IL-1 β) i jest przetwarzana przez kaspazę-1 oraz proteazy serynowe. Jest głównym regulatorem stanu zapalnego, poprzez kontrolowanie różnych procesów odpornościowych [73].

Należąca do rodziny IL-1, interleukina-1 β jest silną cytokiną prozapalną, która ma kluczowe znaczenie dla odpowiedzi obronnych gospodarza na zakażenie i uszkodzenie komórek [78,82]. Działając przez receptor IL-1 związany z błoną komórkową typu 1, IL-1 β indukuje aktywację komórek prezentujących antygen, co prowadzi do wytworzenia

adaptacyjnych mechanizmów obronnych gospodarza [83,84]. IL-1 β wywiera wpływ na komórki odpornościowe np. aktywuje makrofagi i komórki śródbłónka do produkcji cytokin. Ma również działanie ogólnoustrojowe np. wywołuje gorączkę czy pobudza hepatocyty do wydzielania białek ostrej fazy [81].

W związku z kontrolowaniem dojrzewania IL-1 β przez inflamasom NLRP3, nawet jeśli białko pro-IL-1 β jest obecne w komórce, nie może zostać uwolnione, dopóki nie zostanie uformowany inflamasom NLRP3. Następnie kaspaza-1 jest aktywowana i rozszczepia pro-IL-1 β , aby wytworzyć dojrzałą IL-1 β , która następnie jest uwalniana do komórek. Dlatego czynniki inicjujące tworzenie inflamasomu są również istotne dla wytwarzania funkcjonalnej IL-1 β [81].

Wpływ K⁺, rozpad lizosomalny i ROS są uważane za aktywatory PAMP, które następnie wywołują stymulację komórek do wytwarzania IL-1 β . Aby prokaspaza-1 mogła stać się formą aktywną, białko cytozolowe ulega rozszczepieniu proteolitycznemu z wytworzeniem podjednostek p20 i p10, które następnie tworzą heterodimer stanowiący aktywną kaspazę-1 (enzym konwertujący IL-1 β) [81,85].

IL-1 β ulega ekspresji w wielu tkankach i komórkach, głównie w makrofagach i narządach limfatycznych takich jak grasica, śledziona, węzły chłonne, szpik kostny, a także monocytych. Receptor interleukiny-1 typu I (IL-1R1) znajdujący się na powierzchni interleukiny-1 inicjuje odpowiedź zapalną, gdy zwiąże się z ligandami IL-1 β . A następnie ulega ekspresji na limfocytach T, fibroblastach, komórkach nabłonka i komórkach śródbłónka. Receptor interleukiny-1 typu II (IL-1R2) nie inicjuje transdukcji sygnału, ale ulega ekspresji w różnych komórkach krwiotwórczych, zwłaszcza w limfocytach B, fagocytach jednojądrzastych, leukocytach wielojądrzastych i komórkach szpiku kostnego [73].

Poziomy ekspresji IL-1R1 i IL-1R2 różnią się między typami komórek; na przykład w neutrofilach ulegają ekspresji głównie IL-1R2. W konsekwencji do aktywacji neutrofili wymagane są znacznie wyższe stężenia IL-1 β , podczas gdy niskie stężenia IL-1 β są wystarczające do aktywacji komórek śródbłónka [73].

Nanocząstki srebra powodują aktywację inflamasomu skutkującą uwolnieniem interleukiny-1 β . Inkubacja komórek z AgNP może wywoływać powstawanie reaktywnych form tlenu, prowadzących do uszkodzenia komórki i inicjacji stanu zapalnego. Stres oksydacyjny powoduje wzrost ekspresji cytokin, w tym IL-1, IL-6 i czynnika martwicy nowotworów (TNF α , ang. tumor necrosis factor α), które z kolei przyczyniają się do wytwarzania ROS. Występuje, zatem związek między stresem

oksydacyjnym a stanem zapalnym zainicjowanym przez ekspozycję na AgNP. Wyniki uzyskane z badań na monocytach wskazują na możliwą rolę kaspazy-1 w aktywacji inflamasomu za pośrednictwem AgNP [77].

Aktywność przeciwzapalna AuNP jest związana ze zdolnością do oddziaływania z zewnątrzkomórkową IL-1 β , a tym samym do neutralizowania właściwości zapalnych tej cytokiny [84].

Materiał badawczy

W związku z licznymi publikacjami opisującymi badania przeprowadzane na liniach komórkowych, jako model badawczy wykorzystano ludzką krew obwodową.

Nanocząstki metali szlachetnych są coraz częściej wykorzystywane w urządzeniach i implantach mających kontakt z krwią. Może to się wiązać z wprowadzaniem nanocząstek do krążenia ogólnoustrojowego [75,86]. Badania na szczurach i myszach potwierdzają możliwość migracji nanocząstek do krwi i odległych narządów z głównymi miejscami wchłaniania w wątrobie i śledzionie, ale także płucach, nerkach i sercu [75,87–90].

Dane literaturowe potwierdzają możliwość uwalniania się nanocząstek w stężeniach 0,1-100 $\mu\text{g/ml}$ z urządzeń medycznych i opatrunków na rany, a także ich możliwość wnikania do wnętrza organizmu [91–93].

Nanocząstki metali szlachetnych, a wśród nich zwłaszcza nanocząstki srebra i złota osiągnęły w ostatnich latach dominującą pozycję w przemyśle technologicznym oraz biomedycznym, w środkach codziennego użytku, testach diagnostycznych czy jako nośniki leków. Związane jest z tym też częste narażenie na ich działanie [94]. Dlatego zdecydowano się na przeprowadzenie badań w rozprawie doktorskiej z wykorzystaniem tych nanocząstek.

Cele pracy

Celem podjętych badań w rozprawie doktorskiej było określenie wpływu nanocząstek srebra i złota na reaktywność ludzkich leukocytów krwi obwodowej.

Główne założenie badawcze zostało zrealizowane poprzez cele pośrednie. Należą do nich:

1. Ocena aktywności wybuchu oddechowego monocytów i granulocytów heparynizowanej pełnej krwi ludzkiej, na podstawie analizy intensywności fluorescencji w zakresie zielonego widma światła, próbek inkubowanych z nanocząstkami srebra i złota z użyciem pochodnej rodaminy 123 techniką cytometryczną.
2. Ocena indukcji pyroptozy monocytów i granulocytów heparynizowanej pełnej krwi ludzkiej, za pomocą analizy aktywowanej kaspazy-1 próbek inkubowanych z nanocząstkami srebra i złota, w zakresie zielonego widma światła techniką cytometryczną.
3. Ocena stężenia interleukiny-1 β we krwi pod wpływem 24-godzinnej inkubacji krwi z nanocząstkami srebra i złota, za pomocą testu immunoenzymatycznego.

Materialy i metody

1. Materiały

Do badań wykorzystano ludzką heparynizowaną pełną krew obwodową, pozyskaną od potencjalnie zdrowych dawców z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa (RCKiK) w Poznaniu. Badania były przeprowadzane na terenie Zakładu Immunobiologii UMP w przeciągu 2 godzin od pobrania próbek krwi. W związku z komercyjnym pozyskiwaniem krwi z RCKiK w Poznaniu nie była wymagana zgoda Komisji Bioetycznej (załącznik 1).

Grupę badaną stanowiła krew inkubowana z nanocząstkami srebra i złota, natomiast grupą kontrolną była krew z buforem, w którym zawieszone były nanocząstki.

Materiał badawczy pozyskano od 120 potencjalnie zdrowych dawców. Przed pobraniem materiału, dawca został poinformowany o celu wykorzystania próbki krwi. Każda z osób wyraziła pisemną zgodę na pobranie i wykorzystanie materiału biologicznego.

1.1. Badania wstępne

Badania wstępne zostały wykonane w celu oceny wybuchu oddechowego granulocytów krwi obwodowej inkubowanej przez 60 minut z różnego typu nanocząstkami złota. Zastosowano nanocząstki w stężeniu 100 µg/ml. W badaniach użyto dwa typy nanocząstek złota: kuliste i prętopodobne. Oba analizowano jako:

- A. roztwory koloidalne nanocząstek w wodzie (Au1, Au4),
- B. roztwory koloidalne nanocząstek w wodzie, sfunkcjonalizowane PEG (Au2, Au5),
- C. roztwory koloidalne nanocząstek w soli fizjologicznej (0,9% roztwór NaCl), sfunkcjonalizowane PEG (Au3, Au6)

1.1.1. Opis wykorzystanych nanocząstek złota

1. kuliste nanocząstki złota, wszystkie o stężeniu 100 µg/ml

Au1 zawiera zawieszone w wodzie kuliste nanocząstki złota o rozmiarze ok. 13,24 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=525$ nm.

Au2 zawiera zawieszone w wodzie kuliste nanocząstki złota o rozmiarze ok. 13,24 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=525$ nm, sfunkcjonalizowane tiomonometylowym glikolem polietylenowym (PEG, ang. O-[2-(3-mercaptopropionylamino)ethyl]-O'-methylpolyethylene glycol) składającym się z 2000 merów (PEG 2000).

Au3 zawiera zawieszone w 0,9% NaCl kuliste nanocząstki złota o rozmiarze ok. 13,24 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=526$ nm, sfunkcjonalizowane

tiomonometylowym glikolem polietylenowym składającym się z 2000 merów (PEG 2000).

2. prętopodobne nanocząstki złota, wszystkie o stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$

Au4 zawiera zawieszone w wodzie prętopodobne nanocząstki złota o rozmiarze ok. 31,92 x 11,85 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=683$ nm.

Au5 zawiera zawieszone w wodzie prętopodobne nanocząstki złota o rozmiarze ok. 31,92 x 11,85 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=685$ nm, sfunkcjonalizowane tiomonometylowym glikolem polietylenowym składającym się z 2000 merów (PEG 2000).

Au6 zawiera zawieszone w 0,9% NaCl prętopodobne nanocząstki złota o rozmiarze ok. 31,92 x 11,85 nm, wykazujące maksimum absorpcji przy długości fali $\lambda=685$ nm, sfunkcjonalizowane tiomonometylowym glikolem polietylenowym składającym się z 2000 merów (PEG 2000).

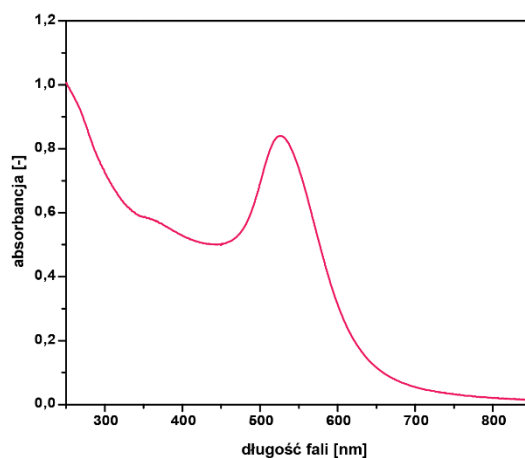
1.1.2. Otrzymywanie nanocząstek złota

1.1.2.1. Kuliste nanocząstki złota

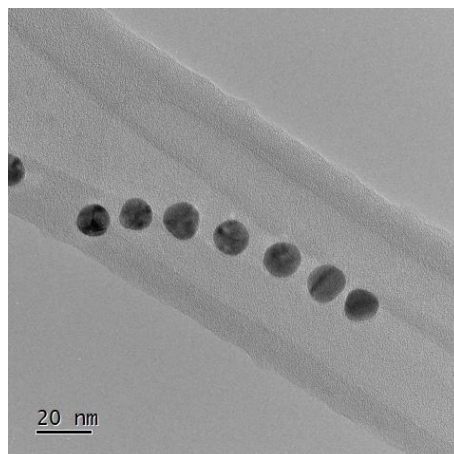
Kuliste nanocząstki złota zostały otrzymane zmodyfikowaną metodą Turkevicha [95,96].

Opis syntezy kulistych nanocząstek złota przygotowanych w Zakładzie Fizyki Molekularnej Politechniki Poznańskiej, został przedstawiony w załączniku 2.

Przeprowadzona charakterystyka otrzymanych nanostruktur metodą spektroskopową (w obszarze UV-Vis) i mikroskopową (wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego, HRTEM, ang. High Resolution Transmission Electron Microscopy) potwierdziła, kształt i rozmiar kulistych nanocząstek złota (**ryc. 3 i 4**).



Ryc. 3. Widmo UV-Vis kulistych nanocząstek złota (Au3), max absorpcji przy długości fali $\lambda= 526$ nm, źródło: Wielkopolskie Centrum Zaawansowanych Technologii.



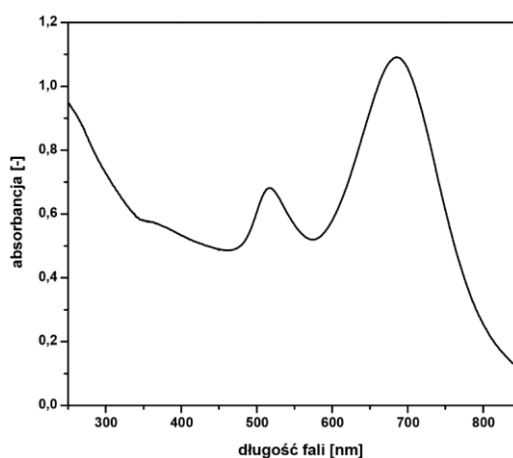
Ryc. 4. Zdjęcie kulistych nanocząstek złota wykonane za pomocą wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego (HRTEM ang. High Resolution Transmission Electron Microscopy) Jeol ARM 200F, wielkość $13,24 \pm 1,80$ nm. źródło: Centrum NanoBiomedyczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

1.1.2.2. Prętopodobne nanocząstki złota

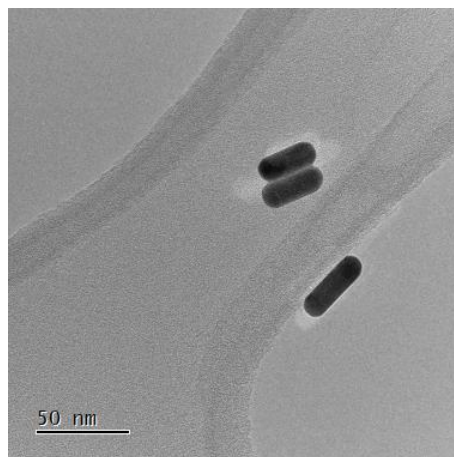
Synteza prętopodobnych nanocząstek złota wykazujących rezonans w zakresie spektralnym ok. 660 nm, została przeprowadzona metodą *in situ bottom-up* [96–99].

Opis syntezy kulistych nanocząstek złota przygotowanych w Zakładzie Fizyki Molekularnej Politechniki Poznańskiej, został przedstawiony w załączniku 3.

Przeprowadzona charakterystyka otrzymanych nanostruktur metodą spektroskopową (w obszarze UV-Vis) i mikroskopową (wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego, HRTEM) potwierdziła, kształt i rozmiar prętopodobnych nanocząstek złota (**ryc. 5 i 6**).



Ryc. 5. Widmo UV-Vis prętopodobnych nanocząstek złota (Au6), max absorpcji przy długości fali $\lambda=685$ nm, źródło: Wielkopolskie Centrum Zaawansowanych Technologii.



Ryc. 6. Zdjęcie prętopodobnych nanocząstek złota wykonane za pomocą wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego (HRTEM ang. High Resolution Transmission Electron Microscopy) Jeol ARM 200F, wielkość $31,92 \pm 4,47 \times 11,85 \pm 3,13$ nm. źródło: Centrum NanoBiomedyczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Ze względu na wydajność syntezy nanocząstek złota oraz możliwość tworzenia się aglomeratów przy wyższych stężeniach, a także dostępności odniesień literaturowych, do dalszych badań wykorzystano stężenia: 20, 100 i 200 $\mu\text{g/ml}$. Wszystkie stężenia zawieszonych nanocząstek przygotowano w izotonicznym roztworze chlorku sodu (0,9%, Polpharma). Do przygotowania odpowiednich stężeń użyto buforu, w którym są one zawieszone.

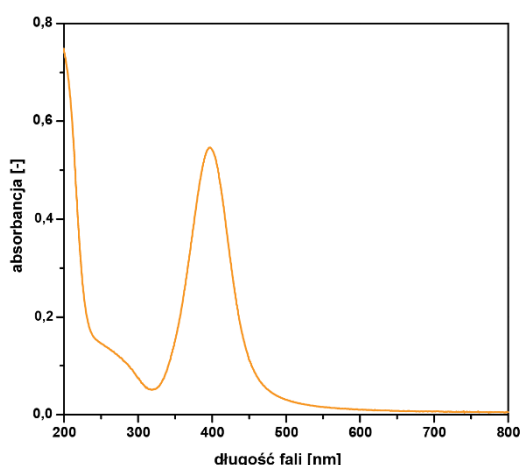
1.1.3. Otrzymanie nanocząstek srebra (AgNP)

Nanocząstki srebra przygotowano zgodnie z artykułem: Bigall, N., Reitzig, M., Naumann, W., Simon, P., van Pée, K.-H. and Eychmüller, A. (2008), Fungal Templates for Noble-Metal Nanoparticles and Their Application in Catalysis [100].

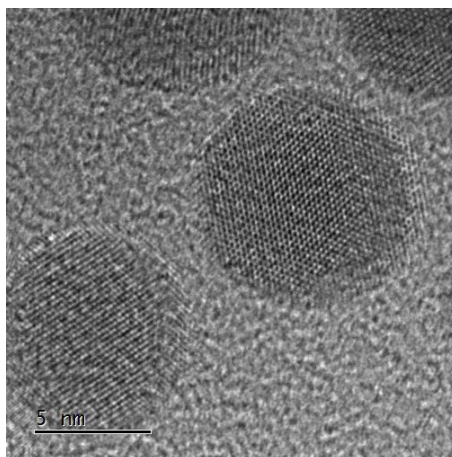
Opis syntezy kulistych nanocząstek srebra przygotowanych w Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii w Poznaniu, został przedstawiony w załączniku 4.

Przeprowadzona charakterystyka otrzymanych nanostruktur metodą spektroskopową (w obszarze UV-Vis) i mikroskopową (wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego, HRTEM) potwierdziła, kształt i rozmiar kulistych nanocząstek srebra (ryc. 7 i 8).

Wizualnie zaobserwowano powstawanie nanocząstek srebra z przebarwieniami. Powstawanie żółtawego zabarwienia próbki świadczy o tym, że w wytwarzanych koloidalnych nanocząstkach w procesie syntezy dominują ziarna nanocząstek srebra [101].



Ryc. 7. Widmo UV-Vis nanocząstek srebra (AgNP), max absorpcji przy długości fali $\lambda=397$ nm, źródło: Wielkopolskie Centrum Zaawansowanych Technologii.



Ryc. 8. Zdjęcie kulistych nanocząstek srebra wykonane za pomocą wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego (HRTEM ang. High Resolution Transmission Electron Microscopy) Jeol ARM 200F, wielkość $8,50 \pm 2,50$ nm. źródło: Centrum NanoBiomedyczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Aby zachować jednolitość stężeń z nanocząstkami złota, do badań z nanocząstkami srebra również wykorzystano 3 stężenia: 20, 100 i 200 $\mu\text{g/ml}$. Do przygotowania odpowiednich stężeń użyto buforu, w którym są one zawieszone.

Syntezę, funkcjonalizację oraz badania fizykochemiczne użytych w pracy nanocząstek - w tym widma UV-Vis - dołączone w opisie zastosowanych nanocząstek przeprowadzono w Zakładzie Fizyki Molekularnej na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej oraz Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii w Poznaniu. Pomiary mikroskopowe – morfologię oraz wymiary nanocząstek uzyskano przy pomocy wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego (HRTEM) (JEOL ARM-200F) w Centrum NanoBiomedycznym Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Celem zbadania stabilności nanocząstek w czasie, przed rozpoczęciem badań i po skończonych pomiarach wykonano ponownie widma UV-Vis nanocząstek oraz zmierzono rozkład ich wielkości z wykorzystaniem dynamicznego rozpraszania światła (DLS, ang. dynamic light scattering). Porównanie uzyskanych danych z początkowymi nie wykazało różnic.

Zastosowano spektroskopię UV-Vis, jako skuteczne narzędzie do charakteryzowania kinetyki struktury i końcowej stabilności koloidalnej nanocząstek. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) użyto jako szybkiego i łatwego narzędzia do

charakteryzowania wielkości nanocząstek [102]. Rozmiar i morfologia nanocząstek została określona za pomocą wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego (HRTEM).

2. Metody

2.1. Techniki użyte w pomiarach

2.1.1. Cytometria przepływowa

Badania wykonano z wykorzystaniem cytometru przepływowego (CyFlow Space, Partec GmbH, Niemcy). Źródłem światła w cytometrze przepływowym jest niebieski laser argonowy, emitujący podczas pomiarów światło wzbudzające o długości fali 488 nm.

Cytometr jest wyposażony w odpowiednie detektory światła – umożliwiające obserwację rozproszenia przedniego (FSC, ang. forward scatter channel) i rozproszenia bocznego (SSC, ang. side scatter channel). Dzięki temu na podstawie wielkości i ziarnistości komórek można wyodrębnić subpopulację limfocytów, monocytów i granulocytów [103,104].

Inne detektory cytometryczne umożliwiają analizę w zielonym i czerwonym zakresie widma światła, poprzez fluorescencję barwników wzbudzonych laserem [103,104].

W niniejszej pracy w badaniach cytometrycznych wykorzystano: do oceny produkcji reaktywnych form tlenu - dihydrorodaminę 123 (DHR 123, ang. dihydrorhodamine 123), do stymulacji wybuchu oddechowego - PMA (ang. phorbol 12-myristate 13-acetate), do oceny aktywności kaspazy-1 – znakowane karboksyfluoresceiną (FAM, ang. carboxyfluorescein) inhibitory kaspaz (FLICA, ang. fluorescent-labeled inhibitor of caspase). Użyto także płyn barwiący DNA, który służył do eliminowania uszkodzonych komórek i ich fragmentów w dalszej analizie.

Emisja zielonego widma światła przez wzbudzoną rodaminę 123, była analizowana za pomocą detektora FL1 [103].

Emisja zielonego widma światła emitowanego przez karboksyfluoresceinę, była analizowana za pomocą detektora FL1 [72].

Pomiar emisji światła w zakresie czerwonej fluorescencji z użyciem płynu barwiącego DNA komórkowe wykonano korzystając z detektora FL3 [103].

Do badań wykorzystano 10 000 komórek leukocytarnych na próbkę.

Analizę danych przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania FloMax Software, wersja 3.0 firmy Sysmec, Partec, GmbH, Niemcy.

2.1.2. ELISA (test immunoenzymatyczny)

ELISA jest testem immunoenzymatycznym służącym do wykrywania i ilościowego oznaczania przeciwciał lub antygenów w badanej próbce [105–107].

Metoda ta opiera się na specyficznych interakcjach między antygenami i przeciwciałami w celu wykrycia docelowych białek w próbce. Wizualizowane jest to poprzez reakcję barwną, zachodzącą pomiędzy enzymami ze skoniugowanymi immunoglobulinami a odpowiednimi substratami. Intensywność barwy zależy od ilości powstałych wiązań antygen-przeciwciało. Najczęściej jest mierzona kolorymetrycznie przy użyciu spektrofotometru. Technika ta jest uniwersalną metodą wykorzystywaną przy wielu badaniach biomedycznych [105,106].

W przedstawionych badaniach własnych wykorzystano kanapkową odmianę testu ELISA w wariantcie testu bezpośredniego. Metoda ta polega na opłaszczaniu płytki antygenem specyficznym do wykrywanego przeciwciała. Po dodaniu odpowiedniego substratu enzymatycznego, katalizującego reakcję, produkt reakcji wykrywa się spektrofotometrycznie na podstawie intensywności barwy. Zabarwienie daje wynik pozytywny, natomiast brak zabarwienia wskazuje na brak enzymów lub wynik negatywny [105,107].

Wysoka czułość bezpośredniego testu kanapkowego powoduje, że jest on najczęściej stosowaną odmianą w badaniach diagnostycznych i naukowych [105].

Pomiary wykonano z wykorzystaniem spektrofotometru - EPOCH, firmy BioTek Instruments Inc, USA.

Analizę danych przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania BioTek Gen5 wersja 2.01.14.

2.2. Ilościowa ocena aktywności wybuchu oddechowego monocytów i granulocytów w heparynizowanej pełnej krwi ludzkiej

2.2.1. Zasada metody

Aktywność wybuchu oddechowego została zmierzona przy pomocy cytometru przepływowego (CyFlow Space, Partec GmbH, Niemcy).

Analiza aktywności wybuchu oddechowego leukocytów została wykonana z wykorzystaniem komercyjnego testu Phagoburst firmy Celonic Deutschland GmbH & Co. KG nr kat. 341058. Zestaw ten pozwolił na ilościową ocenę zmian aktywności wybuchu oddechowego leukocytów w heparynizowanej pełnej krwi ludzkiej.

Phagoburst zawiera 12-mirystynian 13-octanu forbolu (PMA) będący silnym środkiem stymulującym wybuch oddechowy, a także dihydrorodaminę 123 (DHR) użytą, jako fluorogeniczny substrat. Granulocyty i monocyty stymulowane PMA wytwarzają reaktywne formy tlenu (ROS) [103]. Do wykrywania $\text{OH}^\bullet$, $\text{ONOO}^\bullet$, $\text{NO}_2^\bullet$ oraz HOCl wykorzystano dihydrorodaminę 123 (DHR). Przy obecności wolnych rodników jest utleniana do rodaminy 123 (rodamina), która jest lipofilową, fluorescencyjną cząsteczką. Ze względu na ładunek dodatni, łatwo dyfunduje przez błony komórkowe i akumuluje się w mitochondriach. Natomiast DHR z $\text{O}_2^\bullet$ i H_2O_2 reaguje tylko w wyniku wewnątrzkomórkowych przemian enzymatycznych [61,108].

Podanie płynu lizującego spowodowało usunięcie erytrocytów. Proces ten był niezbędny do właściwej analizy badań na leukocytach.

Po jednokrotnym przemyciu roztworem do płukania, dodano roztwór barwiący DNA, użyty w celu wykluczenia z analizy martwych komórek w dalszych badaniach [103,109].

Analizowano wartość procentową komórek, które wytworzyły ROS, oraz średnią intensywność fluorescencji (MFI, ang. Mean Fluorescent Intensity) rodaminy 123. Wirowanie przeprowadzono w wirówce Hermle model Z400K.

2.2.2. Przygotowanie materiału do badań

2.2.2.1. Inkubacja z nanocząstkami złota

Tabela 1. Charakterystyka oznaczanych prób inkubowanych z DHR i z nanocząstkami złota z uwzględnieniem kolejności wykonywanych czynności laboratoryjnych.

Nr próbki	Krew	NaCl	DHR	Bufor użyty do zawieszenia kulistych nanocząstek	Bufor użyty do zawieszenia prętopodobnych nanocząstek	Stężenie kulistych nanocząstek (µg/ml)			Stężenie prętopodobnych nanocząstek (µg/ml)			Czas inkubacji (min.)		PMA	Płyn lizujący	Wirowanie 250g	Płyn płuczający	Wirowanie 250g	Roztwór barwiący DNA	Płyn płuczający
						20	100	200	20	100	200	30	60							
1	+	+	+	+	+										+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+									+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+										+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+									+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+		+							+		+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+		+							+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+			+						+		+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+			+						+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+				+					+		+	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+				+					+	+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+					+				+		+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+					+				+	+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+						+			+		+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+						+			+	+	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+							+		+		+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+							+		+	+	+	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+		+						+			+	+	+	+	+	+

Nr próbki	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Krew	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DHR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bufor użyty do zawieszenia kulistych nanocząstek											
Bufor użyty do zawieszenia prętopodobnych nanocząstek											
Stężenie kulistych nanocząstek (µg/ml)	20										
	100	+	+								
	200			+	+						
Stężenie prętopodobnych nanocząstek (µg/ml)	20					+	+				
	100							+	+		
	200									+	+
Czas inkubacji (min.)	30	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	60										
PMA	+		+		+		+		+		+
Płyn lizujący	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wirowanie 250g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Płyn płuczący	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wirowanie 250g	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Roztwór barwiący DNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Płyn płuczący	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Procedura wykonania eksperymentu:

1. Do próbek 1-28 dodano 20 µl krwi oraz 20 µl roztworu soli fizjologicznej (0,9%).
2. Do wszystkich prób dodano 8 µl roztworu DHR i inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 10 minut.
3. Do prób 1-2 dodano 4 µl roztworu buforu użytego do zawieszenia kulistych nanocząstek złota,
Do prób 3-4 dodano 4 µl roztworu buforu użytego do zawieszenia prętopodobnych nanocząstek złota.
Natomiast do prób 5-10 dodano 4 µl roztworu kulistych nanocząstek złota w stężeniach 20, 100, 200 µg/ml:
- 20 µg/ml do próbek 5-6,

- 100 µg/ml do próbek 7-8,
- 200 µg/ml do próbek 9-10.

Z kolei do prób 11-16 dodano 4 µl roztworu prętopodobnych nanocząstek złota w stężeniach 20, 100, 200 µg/ml:

- 20 µg/ml do próbek 11-12,
- 100 µg/ml do próbek 13-14,
- 200 µg/ml do próbek 15-16.

Probówki 1-16 inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 60 minut.

4. Następnie do prób 17-28 dodano 8 µl roztworu DHR i inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 10 minut,

Do prób 17-22 dodano 4 µl roztworu kulistych nanocząstek złota w stężeniach 20, 100, 200 µg/ml:

- 20 µg/ml do próbek 17-18,
- 100 µg/ml do próbek 19-20,
- 200 µg/ml do próbek 21-22.

Do prób 23-28 dodano 4 µl roztworu prętopodobnych nanocząstek złota w stężeniach 20, 100, 200 µg/ml:

- 20 µg/ml do próbek 23-24,
- 100 µg/ml do próbek 25-26,
- 200 µg/ml do próbek 27-28.

Probówki 17-28 inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 30 minut.

5. Do prób 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 dodano 8 µl roztworu PMA i inkubowano w łaźni wodnej temperaturze 37°C przez 10 minut.

6. Następnie do wszystkich prób dodano 400 µl roztworu lizującego w celu usunięcia erytrocytów i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 20 minut.

7. Następnie próby z roztworem lizującym zostały odwirowane przez 5 min w temperaturze 7°C, przy prędkości obrotów 250g.

8. Ze wszystkich próbek usunięto nadsącz.

9. Do probówek 1-28 dodano 700 µl roztworu płuczącego, następnie odwirowane przez 5 min. w temperaturze 7°C przy prędkości obrotów 250g.

10. Ze wszystkich próbek wyrzucono nadsącz.

11. Do wszystkich próbek dodano 40 µl roztworu barwiącego DNA. Po wymieszaniu inkubowano przez 10 minut w łaźni lodowej, o temperaturze 4°C.

12. Dodano 700 µl roztworu płuczącego w celu wykonania pomiaru cytometrycznego

13. Zmierzono zawiesinę komórkową

Pomiar został wykonany w cytometrze przepływowym wyposażonym w niebieski laser wzburzający (długość fali 488 nm). Niezbędnego do wywołania fluorescencji DHR użytego w oznaczeniach. Analizę każdej próbki dokonano na podstawie zmierzonych 10 000 komórek leukocytarnych. Rozdziału subpopulacji limfocytów, granulocytów i monocytów spośród krwinek białych, wyznaczono dzięki detektorom rozproszenia światła w układzie parametrów FSC i SSC.

Analizę odsetka granulocytów i monocytów zawierających DHR oraz wykazujących pozytywną odpowiedź na stymulację PMA (komórek, w których wykazano wybuch oddechowy) dokonano za pomocą dwuparametrycznego wykresu (histogramu) obrazującego liczbę komórek i intensywność fluorescencji.

2.2.2.2. Inkubacja z nanocząstkami srebra

Tabela 2. Charakterystyka oznaczanych prób inkubowanych z DHR i z nanocząstkami srebra z uwzględnieniem kolejności wykonywanych czynności laboratoryjnych.

Nr próbki	Krew	NaCl	DHR	Bufor użyty do zawieszenia nanocząstek	Stężenie nanocząstek (µg/ml)			Czas inkubacji (min.)		PMA	Płyn lizujący	Wirowanie	Płyn płuczający	Wirowanie	Roztwór barwiący DNA	Płyn płuczający
					20	100	200	30	60							
1	+	+	+	+							+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+						+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+		+				+		+	+	+	+	+	+
4	+	+	+		+				+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+			+			+		+	+	+	+	+	+
6	+	+	+			+			+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+				+		+		+	+	+	+	+	+
8	+	+	+				+		+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+		+			+			+	+	+	+	+	+
10	+	+	+		+			+		+	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+			+		+			+	+	+	+	+	+
12	+	+	+			+		+		+	+	+	+	+	+	+
13	+	+	+				+	+			+	+	+	+	+	+
14	+	+	+				+	+		+	+	+	+	+	+	+

Procedura wykonania eksperymentu:

1. Do próbek 1-14 dodano 20 µl krwi oraz 20 µl roztworu soli fizjologicznej (0,9%).
 2. Do wszystkich prób dodano 8 µl roztworu DHR i inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 10 minut,
 3. Do prób 1-2 dodano 4 µl buforu użytego do zawieszenia nanocząstek srebra.
- Do prób 3-8 dodano 4 µl roztworu nanocząstek srebra w stężeniach 20, 100, 200 µg/ml:
- 20 µg/ml do próbek 3-4,

- 100 µg/ml do próbek 5-6,
- 200 µg/ml do próbek 7-8.

Probówki 1-8 inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 60 minut.

4. Następnie do prób 9-14 dodano 8 µl roztworu DHR i inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 10 minut.

Do prób 9-14 dodano 4 µl roztworu nanocząstek srebra w stężeniach 20, 100, 200 µg/ml:

- 20 µg/ml do próbek 9-10,
- 100 µg/ml do próbek 11-12,
- 200 µg/ml do próbek 13-14.

Probówki 9-14 inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 30 minut.

5. Do prób 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 dodano 8 µl roztworu PMA i inkubowano w temperaturze 37°C przez 10 minut.

6. Następnie do wszystkich prób dodano 400 µl roztworu lizującego w celu usunięcia erytrocytów i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 20 minut.

7. Próby z roztworem lizującym zostały odwirowane przez 5 min w temperaturze 7°C, przy prędkości obrotów 250g.

8. Ze wszystkich próbek usunięto nadsącz

9. Do próbek 1-14 dodano 700 µl roztworu płuczącego, następnie odwirowane przez 5 min. w temperaturze 7°C przy prędkości obrotów 250g.

10. Ze wszystkich próbek usunięto nadsącz

11. Do każdej z próbek dodano 40 µl roztworu barwiącego DNA. Po wymieszaniu inkubowano przez 10 minut w łaźni lodowej, o temperaturze 4°C.

12. Dodano 700 µl roztworu płuczącego w celu wykonania pomiaru cytometrycznego

13. Zmierzono zawiesinę komórkową

Pomiar został wykonany w cytometrze przepływowym wyposażonym w niebieski laser wzburzający (długość fali 488 nm). Niezbędnego do wywołania fluorescencji DHR użytego w oznaczeniach. Analizę każdej próbki dokonano na podstawie zmierzonych 10 000 komórek leukocytarnych. Rozdziału subpopulacji limfocytów, granulocytów i monocytów spośród krwinek białych, wyznaczono dzięki detektorom rozproszenia światła w układzie parametrów FSC i SSC.

Analizę odsetka granulocytów i monocytów zawierających DHR oraz wykazujących pozytywną odpowiedź na stymulację PMA (komórek, w których wykazano wybuch oddechowy) dokonano za pomocą dwuparametrycznego wykresu (histogramu) obrazującego liczbę komórek i intensywność fluorescencji.

2.3. Ocena wpływu nanocząstek srebra i złota we krwi na indukcję pyroptozy

2.3.1. Zasada metody

Ocena pyroptozy została wykonana przy pomocy cytometru przepływowego (CyFlow Space, Partec GmbH, Niemcy).

Użyto testu FAM-FLICA caspace assay (FAM FLICA™ CASPASE-1 KIT, nr kat. ICT097), służącego do ilościowej oceny pyroptozy na podstawie aktywności kaspazy-1 w warunkach *in vitro*. Wykorzystanie sondy FAM-VAD-FMK FLICA (karboksylfluoresceina sprzężona z syntetycznym inhibitorem kaspaz fluorometyloketonową pochodną kwasu walinoalanoasparginowego), będącej fluorescencyjnym inhibitorem kaspaz umożliwiało kowalencyjne połączenie się z aktywnym centrum kaspazy wewnątrz komórki. Obserwowany zielony sygnał fluorescencji był miarą aktywności aktywnej kaspazy-1. Niezwiązane w komórce sondy FAM-VAD-FMK FLICA były usuwane w trakcie przemywania buforem płuczącym.

Kaspazy nie mogą przeciąć sondy będącej inhibitorem FAM-VAD-FMK FLICA; zamiast tego tworzą nieodwracalne wiązanie kowalencyjne z FMK (keton fluorometylowy) mającej na celu zahamowanie dalszej aktywności enzymatycznej. Płyn barwiący DNA użyty w dalszej analizie posłużył do eliminowania uszkodzonych komórek i ich fragmentów [72].

W procedurze oznaczeń zastosowano wirowanie, które przeprowadzono w wirówce Hermle model Z400K.

Technika cytometrii przepływowej i użycie lasera zielonego o długości fali 488 nm, jako światła wzbudzającego, pozwoliło na obserwację widma fluorescencji próbek, a tym samym ocenę pyroptozy komórek.

Do badań wykorzystano 10 000 komórek leukocytarnych na próbkę.

Analizę danych przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania FloMax Software, wersja 3.0 firmy Sysmex, Partec, GmbH, Niemcy.

2.3.2. Przygotowanie materiału do badań

2.3.2.1. Inkubacja z nanocząstkami złota

Tabela 3. Charakterystyka oznaczanych prób inkubowanych z FAM i z nanocząstkami złota z uwzględnieniem kolejności wykonywanych czynności laboratoryjnych.

Nr próbki	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Krew	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Bufor użyty do zawieszenia kulistych nanocząstek	+													
Bufor użyty do zawieszenia prętopodobnych nanocząstek		+												
Stężenie kulistych nanocząstek (µg/ml)	20		+						+					
	100			+						+				
	200				+						+			
Stężenie prętopodobnych nanocząstek (µg/ml)	20						+					+		
	100												+	
	200							+						+
Czas inkubacji (min.)	30								+	+	+	+	+	+
	60			+	+	+	+	+						
FAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Płyn płuczący	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wirowanie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Płyn płuczący	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wirowanie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Roztwór barwiący DNA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Płyn lizujący	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Wirowanie	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Płyn płuczący	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Procedura wykonania eksperymentu:

1. Do próbek 1-14 20 μ l krwi i 20 μ l roztworu NaCl (0,9%)
2. Do próby 1 dodano 4 μ l buforu użytego do zawieszenia kulistych nanocząstek złota, do próby 2 dodano 4 μ l buforu użytego do zawieszenia prętopodobnych nanocząstek złota.

Do prób 3-5 dodano 4 μ l roztworu kulistych nanocząstek złota w stężeniach 20, 100, 200 μ g/ml:

- 20 μ g/ml do próbki 3,
- 100 μ g/ml do próbki 4,
- 200 μ g/ml do próbki 5.

Do prób 6-8 dodano 4 μ l roztworu prętopodobnych nanocząstek złota w stężeniach 20, 100, 200 μ g/ml:

- 20 μ g/ml do próbki 6,
- 100 μ g/ml do próbki 7,
- 200 μ g/ml do próbki 8.

Probówki 1-8 inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 60 minut.

3. Do prób 9-11 dodano 4 μ l roztworu kulistych nanocząstek złota w stężeniach 20, 100, 200 μ g/ml:

- 20 μ g/ml do próbki 9,
- 100 μ g/ml do próbki 10,
- 200 μ g/ml do próbki 11.

Do prób 12-14 dodano 4 μ l roztworu prętopodobnych nanocząstek złota w stężeniach 20, 100, 200 μ g/ml:

- 20 μ g/ml do próbki 12,
- 100 μ g/ml do próbki 13,
- 200 μ g/ml do próbki 14.

Probówki 8-14 inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 30 minut.

4. Do prób 1-14 dodano 5 μ l roztworu FAM. Probówki inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 60 minut.

5. Do wszystkich prób dodano 200 μ l roztworu płuczącego

6. Próby z roztworem płuczającym zostały odwirowane przez 7 min w temperaturze 7°C przy obrotach 200x g.

7. Z każdej próbki usunięto supernatant

8. Wszystkie próby zawieszono w 100 μ l roztworu płuczącego

7. Próby 1-14 odwirowano przez 7 min w temperaturze 7°C przy obrotach 200x g.
8. Ze wszystkich próbek usunięto supernatant.
9. Do prób 1-14 dodano 2 µl płynu barwiącego DNA i inkubowano przez 10 minut w łaźni lodowej, w temperaturze 4°C.
10. Następnie do każdej z probówek dodano 400 µl płynu lizującego w celu usunięcia erytrocytów i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 20 minut.
11. Wszystkie próby zostały odwirowane przez 7 min w temperaturze 7°C przy obrotach 200x g.
12. Usunięto supernatant
13. Dodano 700 µl roztworu płuczącego, w celu wykonania pomiaru cytometrycznego
14. Zmierzono zawiesinę komórkową

2.3.2.2. Inkubacja z nanocząstkami srebra

Tabela 4. Charakterystyka oznaczanych prób inkubowanych z FAM i z nanocząstkami srebra z uwzględnieniem kolejności wykonywanych czynności laboratoryjnych.

Nr próbki	Krew	NaCl	Bufor użyty do zawieszenia nanocząstek	Stężenie nanocząstek srebra (µg/ml)			Czas inkubacji (min.)		FAM	Płyn płuczący	Wirowanie	Płyn płuczący	Wirowanie	Roztwór barwiący DNA	Płyn lizujący	Wirowanie	Płyn płuczący
				20	100	200	30	60									
1	+	+	+						+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+		+				+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+				+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+		+			+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+			+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+				+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+

Procedura wykonania eksperymentu:

1. Do próbek 1-7 20 µl krwi i 20 µl roztwór NaCl (0,9%)

2. Do próby 1 dodano 4 µl buforu użytego do zawieszenia nanocząstek srebra.

Natomiast do prób 2-4 dodano 4 µl roztworu nanocząstek srebra w stężeniach 20, 100, 200 µg/ml:

- 20 µg/ml do próbki 2,
- 100 µg/ml do próbki 3,
- 200 µg/ml do próbki 4.

Próbki 1-4 inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 60 minut.

3. Do prób 5-7 dodano 4 µl roztworu nanocząstek srebra w stężeniach 20, 100, 200 µg/ml:

- 20 µg/ml do próbki 5,
- 100 µg/ml do próbki 6,
- 200 µg/ml do próbki 7.

Probówki 5-7 inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 30 minut.

4. Do prób 1-7 dodano 5 µl roztworu FAM. Próbkę inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 60 minut.

5. Do wszystkich prób dodano 200 µl roztworu płuczącego

6. Próby z roztworem płuczącym zostały odwirowane przez 7 min w temperaturze 7°C przy obrotach 200x g.

7. Z każdej próbki usunięto supernatant

8. Wszystkie próby zawieszono w 100 µl roztworu płuczącego

7. Próby 1-7 odwirowano przez 7 min w temperaturze 7°C przy obrotach 200x g.

8. Ze wszystkich próbek usunięto supernatant.

9. Do prób 1-7 dodano 2 µl płynu barwiącego DNA i inkubowano przez 10 minut w łaźni lodowej, w temperaturze 4°C.

10. Następnie do każdej z probówek dodano 400 µl płynu lizującego w celu usunięcia erytrocytów i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 20 minut.

11. Wszystkie próby zostały odwirowane przez 7 min w temperaturze 7°C przy obrotach 200x g.

12. Usunięto supernatant

13. Dodano 700 µl roztworu płuczącego, w celu wykonania pomiaru cytometrycznego

14. Zmierzono zawiesinę komórkową

2.4. Określenie stężenia interleukiny-1 β

2.4.1. Zasady metody

Stężenie interleukiny-1 β (IL-1 β) oznaczono za pomocą komercyjnych zestawów testów immunoenzymatycznych (ELISA, ang. enzyme-linked immunosorbent assay) (Human Interleukin-1 beta, IL-1 beta ELISA Kit, EIAab, nr kat. E0563h). Zestaw do testów immunologicznych pozwala na ilościowe oznaczenie *in vitro* stężenia przeciwciał docelowych w osoczu.

Płytką dostarczoną w tym zestawie została wstępnie pokryta antygenem specyficznym dla przeciwciała docelowego. Test ELISA jest oparty na reakcjach swoistych dla przeciwciał poliklonalnych sprzężonych z preparatem antygeny sprzężonego z biotyną. A następnie na reakcji w obecności awidyny, sprzężonej z peroksydazą chrzanową. Tylko te dołki, które zawierają antygen sprzężony z biotyną oznaczanego przeciwciała i awidynę sprzężoną z enzymem będą wykazywać zmianę koloru. Reakcja enzym-substrat została zakończona przez dodanie roztworu kwasu siarkowego [110].

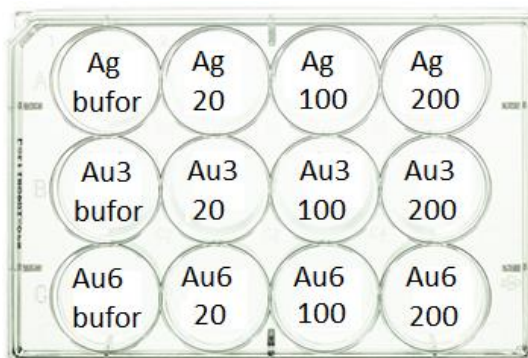
Wirowanie przeprowadzono w wirówce Hermle model Z400K. Próbkę zmierzono przy użyciu spektrofotometru - EPOCH, firmy BioTek Instruments Inc, USA, przy długości fali 450 nm.

Stężenie w próbkach określono porównując wartość absorbancji badanej próbki z krzywą wzorcową.

Analizę danych przeprowadzono z zastosowaniem oprogramowania BioTek Gen5 wersja 2.01.14.

2.4.2. Przygotowanie materiału do badań

Do poszczególnych dołków dodano 500 μ l krwi. Następnie zgodnie ze schematem (**ryc. 9**) dodano po 100 μ l nanocząstek lub buforu. Całość wymieszano. Krew z dodanymi substancjami inkubowano w inkubatorze CO₂ przez 24 godziny w temperaturze 37°C.



Ryc. 9. Schemat rozłożenia prób na płytce wielodołkowej, źródło grafiki:
<https://www.bionovo.pl/p/plytki-wielodołkowe-neoculture/>

Procedurę przygotowania odczynników wykonano zgodnie z instrukcją dołączoną do testu ELISA [110]. Po 24-godzinnej inkubacji nanocząstek srebra i złota z krwią próbki wirowano w wirówce Hermle model Z400K przy obrotach 1000 g przez 15 min w temperaturze 6°C. Z osocza pobrano supernatant służący do wykrywania IL-1 β [78].

Próbki zostały naniesione na płytkę wg schematu (**ryc. 10**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	std.1	std.1	bufor Ag	bufor Ag	Ag20 K1	Ag20 K1	Ag100 K1	Ag100 K1	Ag200 K1	Ag200 K1	bufor Au6	bufor Au6
B	std.2	std.2	bufor Au3	bufor Au3	Au3 20 K1	Au3 20 K1	Au3 100 K1	Au3 100 K1	Au3 200 K1	Au3 200 K1	Au6 20 K3	Au6 20 K3
C	std.3	std.3	bufor Au6	bufor Au6	Au6 20 K1	Au6 20 K1	Au6 100 K1	Au6 100 K1	Au6 200 K1	Au6 200 K1	Au6 100 K3	Au6 100 K3
D	std.4	std.4	bufor Ag	bufor Ag	Ag20 K2	Ag20 K2	Ag100 K2	Ag100 K2	Ag200 K2	Ag200 K2	Au6 200 K3	Au6 200 K3
E	std.5	std.5	bufor Au3	bufor Au3	Au3 20 K2	Au3 20 K2	Au3 100 K2	Au3 100 K2	Au3 200 K2	Au3 200 K2		
F	std.6	std.6	bufor Au6	bufor Au6	Au6 20 K2	Au6 20 K2	Au6 100 K2	Au6 100 K2	Au6 200 K2	Au6 200 K2		
G	std.7	std.7	bufor Ag	bufor Ag	Ag20 K3	Ag20 K3	Ag100 K3	Ag100 K3	Ag200 K3	Ag200 K3		
H	std.8	std.8	bufor Au3	bufor Au3	Au3 20 K3	Au3 20 K3	Au3 100 K3	Au3 100 K3	Au3 200 K3	Au3 200 K3		

Ryc. 10. Schemat rozkładu prób na płytce 96-dołkowej, źródło grafiki:
<http://www.izibb.binoz.uj.edu.pl/documents/4416519/ae289514-3b71-4052-bcfb-be4715e97ddb>

2.5. Analiza statystyczna

2.5.1. Ocena aktywności wybuchu oddechowego monocytów i granulocytów w heparynizowanej pełnej krwi ludzkiej

Analiza aktywności wybuchu oddechowego opierała się na dwóch zmiennych numerycznych: średniej intensywności fluorescencji rodaminy 123 (rodamina) oraz odsetka granulocytów i monocytów we krwi obwodowej. Zmienne te scharakteryzowano za pomocą podstawowych statystyk opisowych (średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego, mediany, wartości minimalnej i maksymalnej). Zbieżność badanych zmiennych z rozkładem normalnym była weryfikowana przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Z kolei ich sferyczność weryfikowano przy użyciu testu Mauchleja.

Wnioskowanie statystyczne w przypadku porównań 3 grup powiązanych opierało się na: jednowymiarowej analizie ANOVA powtarzanych pomiarów (gdy zachowane były warunki dotyczące sferyczności i normalności rozkładów zmiennych), wielowymiarowym teście Wilksa dla ANOVA powtarzanych pomiarów (gdy warunki dotyczące sferyczności nie były spełnione, ale analizowano zmienne o rozkładzie normalnym) oraz teście ANOVA Friedmana (gdy warunki o normalności rozkładów nie były spełnione). Jako testów post-hoc, których celem była identyfikacja par odpowiadających za stwierdzoną istotność różnic, użyto testu HSD Tukeya (przy jednowymiarowym teście ANOVA powtarzanych pomiarów i wielowymiarowym teście Wilksa) oraz testu Dunna (przy ANOVA Friedmana).

Natomiast, jeśli porównywano dwie grupy powiązane, jako narzędzie statystyczne zastosowano test t dla prób zależnych (przy zachowanej normalności rozkładów analizowanych zmiennych) oraz test kolejności par Wilcoxona (gdy analizowane zmienne odbiegały od rozkładu normalnego).

Za istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$. Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego STATISTICA 13.3 PL.

2.5.2. Ocena indukcji pyroptozy wywołanej inkubacją krwi z nanocząstkami srebra i złota

Analiza indukcji pyroptozy bazowała na zmiennych numerycznych opisujących odsetek komórek wykazujących pyroptozę, jak również odsetek komórek prawidłowych w badanych próbkach (w %). Zostały scharakteryzowane za pomocą podstawowych statystyk opisowych (średniej arytmetycznej, odchylenia standardowego, mediany, wartości minimalnej i maksymalnej). Zbieżność rozkładów tych zmiennych

z rozkładem normalnym została zweryfikowana przy pomocy testu Shapiro-Wilka. Z kolei ich sferyczność weryfikowano przy użyciu testu Mauchleya.

Do porównań dwóch grup powiązanych użyto testu t dla prób zależnych (przy zachowaniu warunku o normalności rozkładów). Jednak, gdy rozkłady zmiennych odbiegały od rozkładu normalnego narzędziem wykorzystanym przy wnioskowaniu statystycznym był test kolejności par Wilcoxona.

W związku z zachowaniem warunków dotyczących sferyczności i normalności rozkładów zmiennych, porównania trzech grup bazowały na analizie ANOVA dla powtarzanych pomiarów. Jako testu post-hoc użyto testu HSD Tukeya.

Za istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$. Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego STATISTICA 13.3 PL.

2.5.3. Ocena wartości interleukiny-1 β

W trzeciej części analizy statystycznej wnioskowano na temat stężenia interleukiny-1 β w badanych próbkach krwi. Analizowana zmienna miała typ numeryczny, więc jej opis bazował na podstawowych statystykach: średniej arytmetycznej, odchyleniu standardowym, medianie, wartości minimalnej i maksymalnej. Normalność jej rozkładów była zbadana za pomocą testu Shapiro-Wilka. Z kolei ich sferyczność weryfikowano przy użyciu testu Mauchleya.

Do analizy statystycznej dwóch grup wykorzystano test kolejności par Wilcoxona (niespełniony był warunek normalności rozkładów) oraz analizę ANOVA Friedmana w przypadku analiz porównawczych trzech grup (niespełniony był warunek normalności rozkładów).

Za istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$. Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego STATISTICA 13.3 PL.

Wyniki

1. Wyniki badań wstępnych

Celem badań wstępnych było przeprowadzenie oceny aktywności wybuchu oddechowego granulocytów krwi obwodowej inkubowanej przez 60 min z różnego typu nanocząstkami złota. Wykorzystano nanocząstki o stężeniu 100 µg/ml. Wykonano 20 powtórzeń badań, przy użyciu 20 krwi. Badania wstępne były podstawą wyboru nanocząstek do dalszej analizy.

1.1. Porównanie próbki zawierającej rodaminę i bufor z próbkami zawierającymi rodaminę i nanocząstki złota (Au1-Au6)

W każdej z prób była użyta rodamina 123 (rodamina), elementem różnicującym były dodane nanocząstki złota.

Analizowano próbki krwi z rodaminą po inkubacji z sześcioma typami nanocząstek złota (Au1-Au6). Wartość średniej intensywności fluorescencji (MFI) wahała się od $1,95 \pm 1,15$ w przypadku Au6 do $3,03 \pm 1,72$ dla Au4. Porównano wartości średniej intensywności fluorescencji rodaminy z analogicznymi typami nanocząstek złota zestawionymi do analizy statystycznej w pary o różnych kształtach. Każda z porównywanych par była próbką zawierającą rodaminę i nanocząstki złota. Elementem różnicującym był typ nanocząstek (kuliste lub prętopodobne), które posiadały te same substancje dodatkowe i ten sam rozpuszczalnik.

W próbkach, do których dodano nanocząstki złota bez dodatkowych substancji, a rozpuszczalnikiem była woda (Au1 vs. Au4), różnica w wartości średniej intensywności fluorescencji nie była istotna statystycznie. W próbkach, do których dodano nanocząstki złota z PEG, a rozpuszczalnikiem była woda (Au2 vs. Au5), również nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w wartości średniej intensywności fluorescencji.

Natomiast próbki, które były inkubowane z nanocząstkami złota zawieszonymi w soli fizjologicznej i z dodanym PEG, różnica w średniej intensywności fluorescencji pomiędzy kulistym a prętopodobnym typem nanocząstek (Au3 vs. Au6) okazała się być statystycznie istotna. Wartość średniej intensywności fluorescencji w przypadku próbek z kulistymi nanocząstkami złota była istotnie wyższa niż w przypadku próbek z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au3 vs. Au6: $2,54 \pm 1,06$ vs. $1,95 \pm 1,15$), **tabela 5.**

Tabela 5. Statystyki opisowe oraz ocena różnic w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach zawierających rodaminę, inkubowanych przez 60 min z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota Au1-Au6 o stężeniu 100 µg/ml.

Próbka (typ nanocząstki)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Au1	20	2,92	1,60	2,41	0,44	6,20	0,90	0,370
Au4	20	3,02	1,72	1,86	0,56	6,96		
Au2	20	2,63	1,35	1,73	0,40	5,44	0,21	0,837
Au5	20	2,68	1,40	2,56	0,53	6,29		
Au3	20	2,54	1,06	2,63	0,54	4,37	2,09	0,036
Au6	20	1,95	1,15	1,79	0,55	4,55		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p – poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2. Porównanie próbki zawierającej rodaminę, PMA i bufor z próbkami zawierającymi rodaminę, PMA i Au1-Au6

W każdej z prób była użyta rodamina oraz PMA, elementem różnicującym był typ dodanych AuNP.

Analizowano próbki krwi z rodaminą i PMA po inkubacji z sześcioma typami nanocząstek złota (Au1-Au6). Wartość średniej intensywności fluorescencji wahała się od $19,23 \pm 7,02$ w przypadku Au6 do $24,18 \pm 6,92$ dla Au4. Parami porównano wartość średniej intensywności fluorescencji próbek zawierających rodaminę i PMA z analogicznymi typami nanocząstek złota, tzn. zawierającymi te same substancje dodatkowe i ten sam rozpuszczalnik w każdej z porównywanych par.

W próbkach, do których dodano nanocząstki złota bez dodatkowych substancji, a rozpuszczalnikiem była woda (Au1 vs. Au4), różnica w wartości średniej intensywności fluorescencji nie była istotna statystycznie. Również w próbkach zawierających nanocząstki złota z PEG, w których rozpuszczalnikiem była woda (Au2 vs. Au5), nie wykazano istotnej statystycznie różnicy.

Natomiast w próbkach, które były inkubowane z nanocząstkami złota zawierającymi NaCl+PEG, różnica pomiędzy wartością średniej intensywności fluorescencji pomiędzy kulistym a prętopodobnym typem nanocząstek (Au3 vs. Au6) okazała się być statystycznie istotna. Wartość średniej intensywności fluorescencji w przypadku kulistych nanocząstek złota była istotnie wyższa niż w przypadku prętopodobnych nanocząstek złota (Au3 vs. Au6: $24,16 \pm 6,90$ vs. $19,23 \pm 7,02$), **tabela 6**.

Tabela 6. Statystyki opisowe oraz ocena różnic w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą oraz PMA inkubowanych przez 60 min z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota Au1-Au6.

Próbka (typ nanocząstki)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Au1	20	27,32	9,34	26,43	14,25	48,70	1,60	19	0,127
Au4	20	24,18	6,92	22,23	10,72	40,48			
Au2	20	22,64	8,40	22,26	8,41	42,23	-1,36	19	0,189
Au5	20	20,97	9,01	20,97	13,95	43,65			
Au3	20	24,16	6,90	24,16	14,01	41,60	3,62	19	0,002
Au6	20	19,23	7,02	19,23	11,29	39,85			

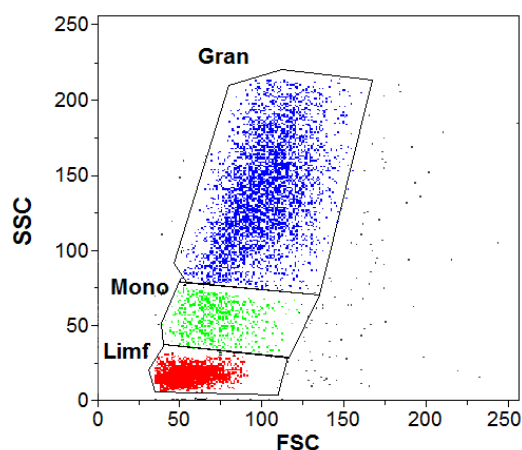
t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df - liczba stopni swobody, p – poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

Ze względu na wystąpienie różnic istotnych statystycznie między próbkami zawierającymi nanocząstki złota z NaCl+PEG (Au3 i Au6), zarówno w przypadku próbek krwi z rodaminą, jak i z rodaminą i PMA, dalszej analizie poddano te dwa rodzaje nanocząstek.

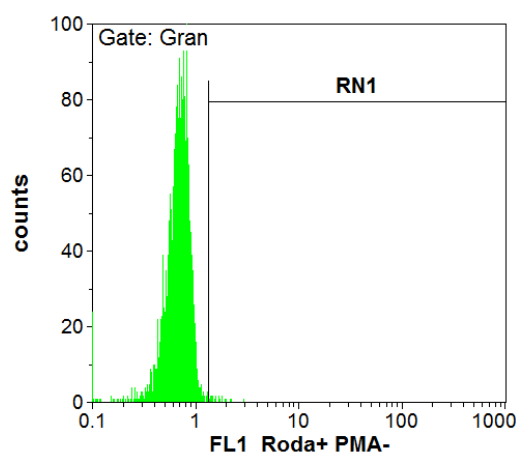
I. Ocena aktywności wybuchu oddechowego granulocytów i monocytów w heparynizowanej pełnej krwi ludzkiej

Rozdziálu subpopulacji granulocytów i monocytów spośród krwinek białych, dokonano dzięki detektorom rozproszenia w układzie parametrów względnej wielkości komórki (FSC) i względnej ziarnistości komórki (SSC) (**ryc. 11, 14**).

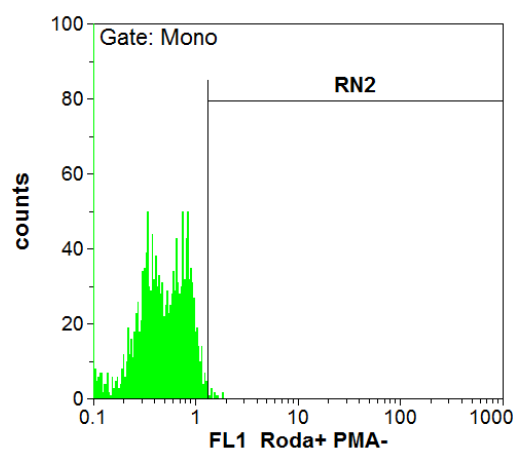
Średnią intensywność fluorescencji rodaminy 123 (rodaminy) przedstawiono za pomocą histogramu, wyznaczającego stopień aktywności wybuchu oddechowego po stymulacji PMA (**ryc. 15, 16**), w porównaniu z próbami niestymulowanymi (**ryc. 12, 13**).



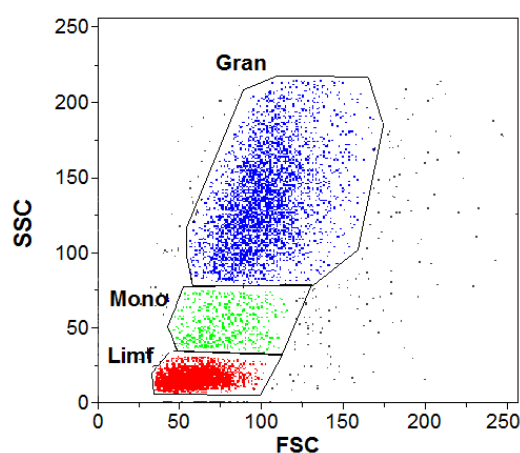
Ryc. 11. Przykładowy cytogram przedstawiający wyodrębnione bramkami populacje leukocytów w obrazie cytometrycznym, bez stymulacji PMA. Gran – granulocyty, Mono – monocyty, Limf – limfocyty, źródło własne.



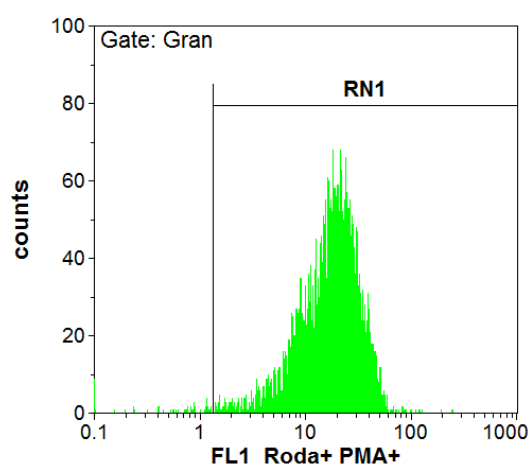
Ryc. 12. Przykładowy histogram przedstawiający wartość intensywności fluorescencji granulocytów wykazujących fluorescencję rodaminy 123, bez stymulacji PMA, źródło własne.



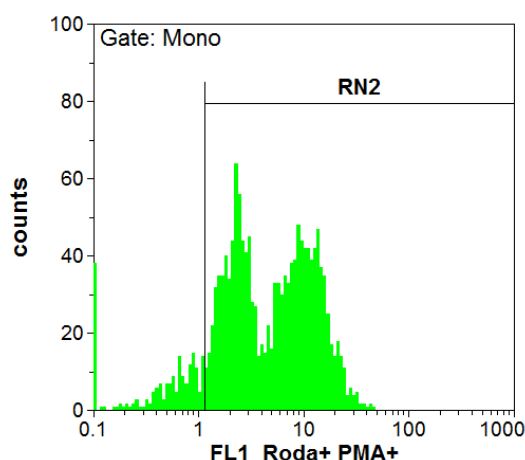
Ryc. 13. Przykładowy histogram przedstawiający wartość intensywności fluorescencji monocyty wykazujących fluorescencję rodaminę 123, bez stymulacji PMA, źródło własne.



Ryc. 14. Przykładowy cytogram przedstawiający wyodrębnione bramkami populacje leukocytów w obrazie cytometrycznym, stymulowanych PMA. Gran – granulocyty, Mono – monocyty, Limf – limfocyty, źródło własne.



Ryc. 15. Przykładowy histogram przedstawiający wartość intensywności fluorescencji granulocytów wykazujących fluorescencję rodaminę 123 i stymulowanych PMA, źródło własne.



Ryc. 16. Przykładowy histogram przedstawiający wartość intensywności fluorescencji monocytów wykazujących fluorescencję rodaminę 123 i stymulowanych PMA, źródło własne.

A. Komórki inkubowane z nanocząstkami złota

1. Granulocyty

1.1. Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą i nanocząstkami złota

W każdej z prób była użyta rodamina. Elementem różnicującym było dodanie kulistych (Au3) lub prętopodobnych (Au6) nanocząstek złota (próby badane) lub samego buforu, w którym zawieszone są nanocząstki (próba kontrolna).

Wartości odsetkowe uczestniczących w wybuchu oddechowym granulocytów przedstawione na cytogramie, odpowiadały wielkościom opisanym przez producenta testu Phagoburst i utrzymywały się na średnim poziomie $94,13 \pm 4,25\%$. Analiza statystyczna wartości odsetkowych nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy żadnymi próbami.

Wykonano 22 powtórzenia badań, przy użyciu 22 próbek krwi.

1.1.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę i bufor względem próbek z rodaminą i Au3 lub Au6

1.1.1.1. Próbką zawierającą rodaminę i bufor vs. rodaminę i Au3

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji w próbkach kontrolnych (bufor bez AuNP) z próbkami zawierającymi nanocząstki złota, z rozróżnieniem na czas inkubacji (30 min lub 60 min) oraz zastosowane stężenie (20, 100, 200 µg/ml) dodawanych kulistych nanocząstek złota (Au3). Wartość średniej intensywności fluorescencji dla próby kontrolnej wyniosła $2,59 \pm 1,62$. Natomiast po inkubacji z kulistymi nanocząstkami złota (Au3), średnia intensywności fluorescencji wahała się między $2,16 \pm 1,31$ przy stężeniu nanocząstek 100 µg/ml oraz czasie inkubacji 30 min do $2,81 \pm 2,60$ przy stężeniu nanocząstek 200 µg/ml oraz czasie inkubacji 60 min. Różnica pomiędzy krwią inkubowaną z kulistymi nanocząstkami złota a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie w przypadku stężenia 20 µg/ml i czasie inkubacji 30 min oraz stężenia 100 µg/ml i czasie inkubacji 30 min. W obu przypadkach średnia intensywności fluorescencji była istotnie wyższa w próbkach z nanocząstkami. Wartości średniej intensywności fluorescencji rodaminy z kulistymi Au3 przy stężeniu i czasie inkubacji, które okazały się statystycznie różnicować ten parametr, zostały przedstawione w **tabeli 7**. Wszystkie pozostałe pary wykazały brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy wartością średniej intensywności fluorescencji próbek zawierających tylko bufor vs. próbek z użyciem AuNP (**tabela 7**).

Tabela 7. Statystyki opisowe dla średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o różnym stężeniu vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Bufor do Au3	22	2,59	1,62	2,06	1,36	8,33	2,84	0,005
Au3 / 20 / 30	22	2,18	1,42	1,66	1,14	7,38		
Bufor do Au3	22	2,59	1,62	2,06	1,36	8,33	2,42	0,016
Au3 / 100 / 30	22	2,16	1,31	1,63	1,33	6,74		
Bufor do Au3	22	2,59	1,62	2,06	1,36	8,33	1,87	0,062
Au3 / 200 / 30	22	2,36	1,44	1,69	1,37	7,46		
Bufor do Au3	22	2,59	1,62	2,06	1,36	8,33	0,80	0,426
Au3 / 20 / 60	22	2,58	1,91	1,94	1,22	9,55		

Bufor do Au3	22	2,59	1,62	2,06	1,36	8,33	0,99	0,322
Au3 / 100 / 60	22	2,59	2,10	1,86	1,15	11,09		
Bufor do Au3	22	2,59	1,62	2,06	1,36	8,33	0,23	0,821
Au3 / 200 / 60	22	2,81	2,60	2,08	1,21	13,56		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p – poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.1.1.2. Próbką zawierającą rodaminę i bufor vs. rodaminę i Au6

Porównanie wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach kontrolnych z zawierającymi nanocząstki, przy zastosowaniu 2 czasów inkubacji (30 min lub 60 min) oraz stężenia (20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) prętopodobnych nanocząstek złota (Au6). Różnica w wartości średniej intensywności fluorescencji pomiędzy krwią inkubowaną z prętopodobnymi nanocząstkami złota a próbą kontrolną okazała się być nieistotna statystycznie w przypadku wszystkich zastosowanych stężeń i obu czasów inkubacji (tabela 8).

Tabela 8. Statystyki opisowe dla średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota o różnym stężeniu vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, $\mu\text{g/ml}$ / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Bufor do Au6	22	2,80	2,46	1,87	1,30	12,48	1,75	0,0796
Au6 30 min 20	22	2,42	1,95	1,66	1,27	9,32		
Bufor do Au6	22	2,80	2,46	1,87	1,30	12,48	0,45	0,6495
Au6 30 min 100	22	2,46	1,75	1,89	1,33	9,55		
Bufor do Au6	22	2,80	2,46	1,87	1,30	12,48	1,66	0,0978
Au6 30 min 200	22	2,21	1,00	1,80	1,21	5,51		
Bufor do Au6	22	2,80	2,46	1,87	1,30	12,48	0,96	0,3392
Au6 60 min 20	22	2,68	2,09	1,90	1,23	10,80		
Bufor do Au6	22	2,80	2,46	1,87	1,30	12,48	0,93	0,3548
Au6 60 min 100	22	2,67	2,07	2,05	1,33	10,79		
Bufor do Au6	22	2,80	2,46	1,87	1,30	12,48	0,80	0,4264
Au6 60 min 200	22	2,56	1,68	1,97	1,28	8,65		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p – poziom prawdopodobieństwa.

1.1.2. Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz Au3 lub Au6 w różnych stężeniach przy tym samym czasie inkubacji

1.1.2.1. Próbkki zawierające rodaminę oraz inkubowane przez 30 minut z Au3 lub Au6 w różnych stężeniach

Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek zawierających rodaminę i inkubowanych przez 30 minut z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) wyniosła $2,16 \pm 1,31$ przy stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, $2,18 \pm 1,42$ przy stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$. Najwyższą wartość $2,36 \pm 1,44$ zanotowano przy stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$. Przeprowadzono ocenę istotności statystycznej zależności średniej intensywności fluorescencji omawianych próbek od stężenia nanocząstek, przy tym samym czasie inkubacji 30 min. Wnioskowanie potwierdziło istotność statystyczną badanej różnicy na poziomie $p < 0,001$. Kolejno, zbadano, które pary wśród trzech próbek odpowiadają za istotność statystyczną analizowanej zależności. Wynikiem tego kroku było potwierdzenie, że zależność od stężenia nanocząstek jest determinowana przez różnicę w średniej intensywności fluorescencji między stężeniem 20 $\mu\text{g/ml}$ a 200 $\mu\text{g/ml}$ oraz 100 $\mu\text{g/ml}$ a 200 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0,05$ dla każdej z par). W obu przypadkach wyższą wartość osiągnęto przy stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$. Opisane zależności zostały przedstawione w **tabeli 9**.

Tabela 9. Statystyki opisowe oraz różnice w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o różnym stężeniu i czasie inkubacji 30 min.

Próbka (nanocząstka / stężenie, $\mu\text{g/ml}$ / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	χ^2	df	p
Au3 / 20 / 30 ^a	22	2,18	1,42	1,66	1,14	7,38	17,95	2	<0,001
Au3 / 100 / 30 ^b	22	2,16	1,31	1,63	1,33	6,74			
Au3 / 200 / 30 ^{ab}	22	2,36	1,44	1,69	1,37	7,46			

χ^2 – wartość statystyki testowej testu ANOVA Friedmana, df – liczba stopni swobody, p – poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik testu ANOVA Friedmana ($p < 0,05$). a, b - różnice istotne statystycznie zbadane za pomocą testu post-hoc Dunna $p < 0,05$.

Pomiędzy próbkami inkubowanymi przez 30 minut z różnymi stężeniami prętopodobnych nanocząstek złota nie wykazano różnic istotnych statystycznie (20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$).

1.1.2.2. Próbkki zawierające rodaminę oraz inkubowane przez 60 minut z Au3 lub Au6 w różnych stężeniach

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy średnią intensywnością fluorescencji w próbach z rodaminą inkubowanych z kulistymi lub prętopodobnymi nanocząstkami złota w czasie inkubacji 60 min oraz różnym stężeniu nanocząstek (20, 100, 200 µg/ml).

1.1.3. Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz Au3 lub Au6 w tym samym stężeniu 20, 100 lub 200 µg/ml i różnym czasie inkubacji

1.1.3.1. Próbkka zawierająca rodaminę oraz Au3

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji próbek z rodaminą inkubowaną z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) w stężeniu 20 µg/ml względem czasów inkubacji 30 min i 60 min. Wynik wskazał na istotną różnicę pomiędzy tymi próbkami. Średnia intensywność fluorescencji była wyższa dla czasu inkubacji 60 min ($2,58 \pm 1,91$) vs. czas inkubacji 30 min ($2,18 \pm 1,42$) (**tabela 10**).

Tabela 10. Statystyki opisowe oraz różnice w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o stężeniu 20 µg/ml i różnym czasie inkubacji (30 i 60 minut).

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Au3 / 20 / 30	22	2,18	1,42	1,66	1,14	7,38	2,81	0,005
Au3 / 20 / 60	22	2,58	1,91	1,94	1,22	9,55		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcozona, p – poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy średnią intensywnością fluorescencji próbek z rodaminą inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) o stężeniu 100 lub 200 µg/ml i różnym czasie inkubacji (30 i 60 minut).

1.1.3.2. Próbkka zawierająca rodaminę oraz Au6

Zmierzono średnią intensywności fluorescencji prób z rodaminą inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) przy stężeniu nanocząstek 200 µg/ml i różnym czasie inkubacji (30 i 60 minut). Wykazano istotną statystycznie różnicę pomiędzy analizowanymi próbkami. Wyższą wartość średniej intensywności

fluorescencji zanotowano w przypadku czasu inkubacji 60 min ($2,56 \pm 1,68$) vs. 30 min ($2,21 \pm 1,00$), **tabela 11**.

Tabela 11. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 o stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$ i ich analiza względem czasu inkubacji (30 i 60 minut).

Próbka (nanocząstka / stężenie, $\mu\text{g/ml}$ / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Au6 / 200 / 30	22	2,21	1,00	1,80	1,21	5,51	2,09	0,037
Au6 / 200 / 60	22	2,56	1,68	1,97	1,28	8,65		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p – poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

Dla prób inkubowanych z Au6 w stężeniu 20 lub 100 $\mu\text{g/ml}$ i różnym czasie inkubacji (30 i 60 minut) także nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy analizowanymi próbkami.

1.1.1. Porównanie prób zawierających rodaminę ze względu na typ nanocząstek złota przy tym samym czasie inkubacji i różnym stężeniu

Porównano wartości średniej intensywności fluorescencji parami pomiędzy próbkami krwi zawierającymi rodaminę inkubowanymi przez 30 min z kulistymi oraz prętopodobnymi nanocząstkami złota o różnym stężeniu. Otrzymano w ten sposób w sumie 3 pary: dla stężeń 20 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ oraz 200 $\mu\text{g/ml}$. Przy stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, różnica w średniej intensywności fluorescencji pomiędzy próbkami z nanocząstkami kulistymi vs. prętopodobnymi (Au3 vs. Au6) okazała się być istotna statystycznie. Wyższą wartość zanotowaną dla prętopodobnych nanocząstek (Au6), dla których wyniosła ona $2,46 \pm 1,75$ vs. $2,16 \pm 1,31$ dla kulistych nanocząstek złota (Au3). Z kolei dla analogicznych par próbek o stężeniach 20 i 200 $\mu\text{g/ml}$, omawiane różnice nie były istotne ze statystycznego punktu widzenia ($p = 0,194$ i $p = 0,178$ odpowiednio), **tabela 12**.

Tabela 12. Statystyki opisowe oraz różnice w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych przez 30 min z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota o różnym stężeniu (20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$).

Nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Au3 / 20 / 30	22	2,18	1,42	1,66	1,14	7,38	1,30	0,194
Au6 / 20 / 30	22	2,42	1,95	1,66	1,27	9,32		
Au3 / 100 / 30	22	2,16	1,31	1,63	1,33	6,74	2,87	0,004
Au6 / 100 / 30	22	2,46	1,75	1,89	1,33	9,55		
Au3 / 200 / 30	22	2,36	1,44	1,69	1,37	7,46	1,35	0,178
Au6 / 200 / 30	22	2,21	1,00	1,80	1,21	5,51		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p – poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

Dla próbek krwi z rodaminą inkubowanych z kulistymi lub prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au3 lub Au6) przez 60 min, w różnych stężeniach (20, 100, 200 µg/ml), nie wykazano istotnej różnicy między typami nanocząstek dla żadnego z użytych stężeń.

1.2. Średnia intensywność fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i AuNP

W każdej z prób była użyta rodamina i PMA. Elementem różnicującym było dodanie kulistych (Au3) lub prętopodobnych (Au6) nanocząstek złota (próby badane) lub samego buforu, w którym zawieszone są nanocząstki (próba kontrolna).

1.2.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA i bufor względem próbek z rodaminą, PMA i Au3 lub Au6

1.2.1.1. Próbką zawierającą rodaminę PMA i bufor vs. rodaminę, PMA i Au3

Porównano wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach granulocytów zawierających rodaminę, PMA oraz bufor (próba kontrolna), z próbkami zawierającymi zamiast buforu kuliste nanocząstki złota (próby badane). Zastosowano dwa czasy inkubacji (30 min lub 60 min) oraz trzy stężenia (20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) kulistych nanocząstek złota (Au3). Wartość średniej intensywności fluorescencji dla próby kontrolnej wyniosła $35,82 \pm 15,78$. Po inkubacji z kulistymi nanocząstkami złota, intensywność średniej intensywności fluorescencji wahała się między $39,58 \pm 17,92$ przy stężeniu nanocząstek 20 $\mu\text{g/ml}$ oraz czasie inkubacji 30 min do $42,55 \pm 19,61$ przy stężeniu nanocząstek 100 $\mu\text{g/ml}$ oraz czasie inkubacji 30 min. Różnica pomiędzy krwią z rodaminą i PMA po inkubacji z kulistymi nanocząstkami złota a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie w przypadku wszystkich kombinacji stężeń i czasów inkubacji z wyjątkiem stężenia 20 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 30 min oraz 60 min. W przypadku pozostałych porównań, próba kontrolna wykazała niższą wartość średniej intensywności fluorescencji w każdym z przypadków. Dla stężenia 100 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 30 min analizowana wartość wyniosła $42,55 \pm 19,61$, w stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$ i czasie inkubacji 30 min wyniosła $42,47 \pm 19,29$. W stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ i czasie inkubacji 60 min było to $41,75 \pm 18,32$, natomiast dla stężenia 200 $\mu\text{g/ml}$ i czasie inkubacji 60 min analizowana wartość była równa $42,38 \pm 17,02$, **tabela 13**.

Tabela 13. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 oraz ocena różnicy vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Bufor do Au3	22	35,82	15,78	37,54	7,23	64,58	-1,59	21	0,126
Au3 / 20 / 30	22	39,58	17,92	36,73	8,27	76,09			
Bufor do Au3	22	35,82	15,78	37,54	7,23	64,58	-2,12	21	0,046
Au3 / 100 / 30	22	42,55	19,61	38,82	9,28	78,03			
Bufor do Au3	22	35,82	15,78	37,54	7,23	64,58	-2,37	21	0,027
Au3 / 200 / 30	22	42,47	19,29	37,71	7,79	82,02			
Bufor do Au3	22	35,82	15,78	37,54	7,23	64,58	-1,95	21	0,065
Au3 / 20 / 60	22	41,32	16,82	42,39	13,49	80,25			
Bufor do Au3	22	35,82	15,78	37,54	7,23	64,58	-2,97	21	0,007
Au3 / 100 / 60	22	41,75	18,32	41,31	11,63	81,72			
Bufor do Au3	22	35,82	15,78	37,54	7,23	64,58	-3,43	21	0,003
Au3 / 200 / 60	22	42,38	17,02	45,09	13,27	71,09			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df - liczba stopni swobody, p – poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2.1.2. Próbka zawierająca rodaminę PMA i bufor vs. rodaminę, PMA i Au6

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji w próbkach granulocytów zawierających rodaminę, PMA i bufor (próba kontrolna), z próbkami badanymi zawierającymi prętopodobnych nanocząstek złota (Au6). Zastosowano czas inkubacji - 30 min lub 60 min oraz stężenie (20, 100, 200 µg/ml) dodawanych prętopodobnych nanocząstek złota. Wartość średniej intensywności fluorescencji dla próby kontrolnej wyniosła $37,98 \pm 17,04$. Natomiast po inkubacji z prętopodobnymi nanocząstkami złota, średnia intensywność fluorescencji wahała się między $39,53 \pm 17,47$ przy stężeniu nanocząstek 100 µg/ml oraz czasie inkubacji 30 min do $42,43 \pm 17,80$ przy stężeniu nanocząstek 100 µg/ml oraz czasie inkubacji 60 min. Różnica pomiędzy krwią z rodaminą i PMA po inkubacji z prętopodobnymi nanocząstkami złota a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie w przypadku stężenia 100 µg/ml i czasu inkubacji 60 min. Średnia intensywność fluorescencji była istotnie wyższa w próbce z nanocząstkami i wyniosła $42,43 \pm 17,80$ (vs. $37,98 \pm 17,04$ w próbce kontrolnej). Natomiast wszystkie pozostałe pary wykazały brak istotnej statystycznie różnicy pomiędzy wartością średniej intensywności fluorescencji próbek z rodaminą i PMA po inkubacji z nanocząstkami vs. próba kontrolna, **tabela 14**.

Tabela 14. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 o różnym stężeniu oraz analiza próbek vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Bufor do Au6	22	37,98	17,04	38,64	8,99	73,27	-1,18	21	0,251
Au6 / 20 / 30	22	40,96	16,28	40,80	8,55	81,22			
Bufor do Au6	22	37,98	17,04	38,64	8,99	73,27	-0,59	21	0,565
Au6 / 100 / 30	22	39,53	17,47	35,24	8,51	81,34			
Bufor do Au6	22	37,98	17,04	38,64	8,99	73,27	-1,10	21	0,284
Au6 / 200 / 30	22	40,94	18,21	37,15	9,60	80,11			
Bufor do Au6	22	37,98	17,04	38,64	8,99	73,27	-1,62	21	0,120
Au6 / 20 / 60	22	41,54	16,99	42,90	11,59	71,06			
Bufor do Au6	22	37,98	17,04	38,64	8,99	73,27	-2,13	21	0,045
Au6 / 100 / 60	22	42,43	17,80	42,57	15,87	78,34			
Bufor do Au6	22	37,98	17,04	38,64	8,99	73,27	-0,96	21	0,347
Au6 / 200 / 60	22	40,53	19,32	40,51	12,05	78,67			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p – poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono wynik istotny statystycznie ($p < 0,05$).

1.2.2. Porównanie próbek zawierających rodaminę i PMA z zastosowaniem różnych zmiennych - typu nanocząstek złota Au3 lub Au6 w różnych stężeniach i czasach inkubacji

Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek zawierających rodaminę i PMA inkubowanych przez 30 minut z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) wyniosła $39,58 \pm 17,92$ przy stężeniu 20 µg/ml, $42,47 \pm 19,29$ przy stężeniu 200 µg/ml. Najwyższą wartość $42,55 \pm 19,61$ zanotowano przy stężeniu 100 µg/ml. Przeprowadzono ocenę istotności statystycznej zależności średniej intensywności fluorescencji omawianych próbek od stężenia nanocząstek, przy tym samym czasie inkubacji 30 min. Wnioskowanie potwierdziło istotność statystyczną badanej różnicy, **tabela 15**. Kolejno, zbadano, które pary wśród trzech próbek odpowiadają za istotność statystyczną analizowanej zależności. Wynikiem testu statystycznego post-hoc, był brak wskazania na parę, między którą różnica była statystycznie istotna. Jednak w przypadku próbek o stężeniach 20 µg/ml a 100 µg/ml poziom istotności statystycznej był bliski granicy istotności ($p = 0,054$), co było wskazaniem, że ta para przyczynia się w najwyższym stopniu do istotnego

statystycznie wyniku przy ogólnym porównaniu zależności wartości średniej intensywności fluorescencji od stężenia nanocząstek.

Tabela 15. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych przez 30 min z kulistymi nanocząstkami złota Au3 oraz ich analiza względem stężenia (20, 100, 200 µg/ml).

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	F	df	p
Au3 / 20 / 30	22	39,58	17,92	36,73	8,27	76,09	3,71	2/42	0,033
Au3 / 100 / 30	22	42,55	19,61	38,82	9,28	78,03			
Au3 / 200 / 30	22	42,47	19,29	37,71	7,79	82,02			

F – wartość statystyki testowej testu ANOVA powtarzalnych pomiarów, df – liczba stopni swobody dla efektu/błędu, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik testu ANOVA ($p < 0,05$).

Dla pozostałych porównywanych między sobą prób zawierających granulocyty, nie wykazano różnicy istotnej statystycznie pomiędzy wykorzystanym typem nanocząstek złota (Au3 lub Au6), stężeniem (20, 100, 200 µg/ml), czasem inkubacji (30 lub 60 minut).

B. Komórki inkubowane z nanocząstkami srebra

1. Granulocyty

1.1. Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą i nanocząstkami srebra

W każdej z prób była użyta rodamina, elementem różnicującym było dodanie buforu, w którym zawieszone są nanocząstki do próby kontrolnej lub nanocząstek srebra do prób badanych.

Wartości odsetkowe uczestniczących w wybuchu oddechowym granulocytów przedstawione na cytogramie, odpowiadały wielkościom opisanym przez producenta testu Phagoburst i utrzymywały się na średnim poziomie $93,27 \pm 1,66\%$. Analiza statystyczna wartości odsetkowych nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy żadnymi próbami.

Wykonano 22 powtórzenia badań, przy użyciu 22 próbek krwi.

1.1.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę i bufor względem próbek z rodaminą i Ag

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji w próbkach granulocytów zawierających rodaminę i bufor (próba kontrolna), z próbami zawierającymi nanocząstki srebra. Zastosowano czas inkubacji 30 min lub 60 min oraz stężenie 20, 100 lub 200 $\mu\text{g/ml}$ dodawanych nanocząstek srebra (Ag). W przypadku żadnej z badanych próbek wartość średniej intensywności fluorescencji nie okazała się być statystycznie różna od próby kontrolnej (**tabela 16**).

Tabela 16. Statystyki opisowe dla średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z nanocząstkami srebra o różnym stężeniu vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Bufor do Ag	22	3,27	1,95	2,83	0,88	6,85	0,16	0,8721
Ag 30 min 20	22	3,56	1,18	3,68	1,81	5,32		
Bufor do Ag	22	3,27	1,95	2,83	0,88	6,85	1,03	0,3046
Ag 30 min 100	22	3,40	1,01	3,78	1,68	4,98		
Bufor do Ag	22	3,27	1,95	2,83	0,88	6,85	0,34	0,7369
Ag 30 min 200	22	3,54	1,21	3,51	1,83	5,35		
Bufor do Ag	22	3,27	1,95	2,83	0,88	6,85	1,46	0,1454
Ag 60 min 20	22	2,68	1,36	2,21	1,03	5,42		
Bufor do Ag	22	3,27	1,95	2,83	0,88	6,85	0,49	0,6274
Ag 60 min 100	22	2,84	1,46	2,30	1,02	5,75		
Bufor do Ag	22	3,27	1,95	2,83	0,88	6,85	0,52	0,6012
Ag 60 min 200	22	3,17	1,67	2,66	1,20	8,31		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa.

1.1.2. Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz Ag z wykorzystaniem różnych stężeń przy tym samym czasie inkubacji

Zmierzono wartości średniej intensywności fluorescencji dla krwi z rodaminą inkubowanej przez 30 oraz 60 min z nanocząstkami srebra oraz w różnych stężeniach (20, 100 lub 200 µg/ml) nanocząstek. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy analizowanymi próbkami.

1.1.3. Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz Ag w tym samym stężeniu 20, 100 lub 200 µg/ml i różnym czasie inkubacji

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji próbek z rodaminą inkubowaną z nanocząstkami srebra w stężeniu 20 µg/ml względem czasów inkubacji 30 min i 60 min. Wynik wskazał na istotną różnicę pomiędzy tymi próbkami. Wartość średniej intensywności fluorescencji była wyższa dla czasu inkubacji 30 min ($3,56 \pm 1,18$) vs. czas inkubacji 60 min ($2,68 \pm 1,36$), **tabela 17**.

Tabela 17. Statystyki opisowe oraz różnice w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z nanocząstkami srebra o stężeniu 20 µg/ml i różnym czasie inkubacji (30 i 60 minut).

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Ag / 20 / 30	22	3,56	1,18	3,68	1,81	5,32	2,73	0,006
Ag / 20 / 60	22	2,68	1,36	2,21	1,03	5,42		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p – poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

Dla prób inkubowanych z nanocząstkami srebra w stężeniu 100 lub 200 µg/ml nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy czasem inkubacji 30 i 60 minut.

1.2. Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i nanocząstki srebra

W każdej z prób była użyta rodamina i PMA, elementem różnicującym było dodanie buforu, w którym zawieszone są nanocząstki do próby kontrolnej lub nanocząstek srebra do prób badanych.

1.2.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA i bufor względem próbek z rodaminą, PMA i Ag

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji w próbkach granulocytów zawierających rodaminę, PMA oraz bufor (próba kontrolna), z próbkami posiadającymi nanocząstki srebra. Zastosowano dwa czasy inkubacji - 30 min lub 60 min oraz stężenia 20, 100, 200 µg/ml nanocząstek srebra (Ag). Wartość średniej intensywności fluorescencji dla próby kontrolnej wyniosła $36,10 \pm 16,23$. Natomiast po inkubacji z nanocząstkami srebra, średnia intensywność fluorescencji wahała się między $31,26 \pm 14,00$ przy stężeniu nanocząstek 20 µg/ml oraz czasie inkubacji 60 min do $35,62 \pm 14,30$ w stężeniu nanocząstek 200 µg/ml oraz czasie inkubacji 30 min. Różnica pomiędzy krwią z rodaminą i PMA po inkubacji z nanocząstkami srebra a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie w przypadku stężenia 20 µg/ml i czasu inkubacji 60 min ($p = 0,003$). Dla stężenia 20 µg/ml i czasu inkubacji 60 min analizowana wartość była istotnie niższa niż w próbie kontrolnej i wyniosła $31,26 \pm 14,00$ (vs. $36,10 \pm 16,23$ w próbie kontrolnej). Wśród pozostałych próbek inkubowanych z nanocząstkami srebra, żadna nie była istotnie różna od próby kontrolnej, **tabela 18**.

Tabela 18. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z nanocząstkami srebra oraz porównanie vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Bufor do Ag	22	36,10	16,23	27,65	19,97	77,56	1,21	0,227
Ag / 20 / 30	22	33,65	14,24	28,94	20,54	77,56		
Bufor do Ag	22	36,10	16,23	27,65	19,97	77,56	1,08	0,279
Ag / 100 / 30	22	33,71	13,68	28,87	21,06	72,26		
Bufor do Ag	22	36,10	16,23	27,65	19,97	77,56	0,11	0,911
Ag / 200 / 30	22	35,62	14,30	32,24	19,29	74,77		
Bufor do Ag	22	36,10	16,23	27,65	19,97	77,56	3,02	0,003
Ag / 20 / 60	22	31,26	14,00	26,11	18,75	70,35		
Bufor do Ag	22	36,10	16,23	27,65	19,97	77,56	1,87	0,062
Ag / 100 / 60	22	33,25	15,81	27,07	18,70	82,85		
Bufor do Ag	22	36,10	16,23	27,65	19,97	77,56	1,61	0,108
Ag / 200 / 60	22	33,23	14,95	28,65	13,55	69,40		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcozona, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2.2. Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA oraz Ag w różnym stężeniu przy tym samym czasie inkubacji

Zmierzono średnią intensywność fluorescencji dla krwi z rodaminą i PMA inkubowanej z nanocząstkami srebra przez 30 lub 60 min oraz różnych stężeniach nanocząstek (20, 100, 200 µg/ml). Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy analizowanymi próbkami.

1.2.3. Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA oraz Ag w tym samym stężeniu 20, 100 lub 200 µg/ml i różnym czasie inkubacji

1.2.3.1. Próbką zawierającą rodaminę, PMA oraz Ag w stężeniu 20 µg/ml

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji prób z rodaminą i PMA inkubowaną z nanocząstkami srebra (Ag) o stężeniu 20 µg/ml względem czasów inkubacji 30 min i 60 min. Wynik wskazał na istotną różnicę pomiędzy tymi próbkami ($p = 0,006$). Średnia intensywność fluorescencji była wyższa dla czasu inkubacji 30 min ($33,65 \pm 14,24$) vs. czas inkubacji 60 min ($31,26 \pm 14,00$), **tabela 19**.

Tabela 19. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z nanocząstkami srebra o stężeniu 20 µg/ml oraz ich analiza względem czasu inkubacji.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Ag / 20 / 30	22	33,65	14,24	28,94	20,54	77,56	2,73	0,006
Ag / 20 / 60	22	31,26	14,00	26,11	18,75	70,35		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2.3.2. Próbka zawierająca rodaminę, PMA oraz Ag w stężeniu 100 µg/ml

Następnie badana była średnia intensywność fluorescencji prób z rodaminą i PMA inkubowanych z nanocząstkami srebra o stężeniu nanocząstek 100 µg/ml i różnym czasie inkubacji (30 i 60 minut). Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy analizowanymi próbkami.

1.2.3.3. Próbka zawierająca rodaminę, PMA oraz Ag w stężeniu 200 µg/ml

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji prób z rodaminą i PMA inkubowaną z nanocząstkami srebra przy stężeniu 200 µg/ml względem czasów inkubacji 30 min i 60 min. Wynik wskazał na istotną różnicę pomiędzy tymi próbkami ($p = 0,010$). Wartość średniej intensywności fluorescencji była wyższa dla czasu inkubacji 30 min ($35,62 \pm 14,30$) vs. czas inkubacji 60 min ($33,23 \pm 14,95$), **tabela 20**.

Tabela 20. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z nanocząstkami srebra o stężeniu 200 µg/ml i ich analiza względem czasu inkubacji.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Ag / 200 / 30	22	35,62	14,30	32,24	19,29	74,77	2,58	0,010
Ag / 200 / 60	22	33,23	14,95	28,65	13,55	69,40		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

C. Komórki inkubowane z nanocząstkami złota

1. Monocyty

Wartości odsetkowe uczestniczących w wybuchu oddechowym monocytów przedstawione na cytogramie, odpowiadały wielkościom opisanym przez producenta testu Phagoburst i utrzymywały się na średnim poziomie $80,75 \pm 5,44\%$. Analiza statystyczna wartości odsetkowych nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy żadnymi próbami.

Wykonano 22 powtórzenia badań, przy użyciu 22 próbek krwi.

1.1. Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą i nanocząstkami złota

W każdej z prób była użyta rodamina. Elementem różnicującym były dodanie AuNP (próby badane) lub samego buforu, w którym zawieszone są nanocząstki (próba kontrolna).

1.1.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę i bufor względem próbek z rodaminą i Au3 lub Au6

1.1.1.1. Próbka zawierająca rodaminę i bufor vs. rodaminę i Au3

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji monocytów w próbkach zawierających rodaminę i bufor (próba kontrolna), z próbkami zawierającymi kuliste nanocząstki złota (Au3). Zastosowano rozróżnienie na czas inkubacji (30 min lub 60 min) oraz stężenie 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ nanocząstek. W przypadku żadnej z badanych próbek wartość średniej intensywności fluorescencji nie okazała się być statystycznie różna od próby kontrolnej (**tabela 21**).

Tabela 21. Statystyki opisowe dla średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o różnym stężeniu vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Bufor do Au3	22	2,82	2,53	2,20	1,10	12,10	0,33	0,7439
Au3 20 30 min	22	2,02	0,51	1,91	1,34	3,10		
Bufor do Au3	22	2,82	2,53	2,20	1,10	12,10	0,11	0,9133
Au3 100 30 min	22	2,65	1,82	2,26	1,22	8,85		
Bufor do Au3	22	2,82	2,53	2,20	1,10	12,10	0,61	0,5421
Au3 200 30 min	22	2,27	0,71	2,30	1,43	3,84		
Bufor do Au3	22	2,82	2,53	2,20	1,10	12,10	0,41	0,6791
Au3 20 60 min	22	2,39	1,54	2,16	1,17	8,26		
Bufor do Au3	22	2,82	2,53	2,20	1,10	12,10	0,30	0,7605
Au3 100 60 min	22	2,29	0,79	2,21	1,15	3,73		
Bufor do Au3	22	2,82	2,53	2,20	1,10	12,10	0,37	0,7113
Au3 200 60 min	22	2,98	2,49	2,26	1,20	9,75		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa

1.1.1.2. Próbka zawierająca rodaminę i bufor vs. rodaminę i Au6

Przeanalizowano wartość średniej intensywności fluorescencji w próbkach zawierających rodaminę i bufor, z próbkami inkubowanymi z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6). Zastosowano dwa czasy inkubacji (30 min lub 60 min) oraz trzy stężenia 20, 100, 200 µg/ml nanocząstek. W przypadku żadnej z badanych próbek wartość średniej intensywności fluorescencji nie okazała się być statystycznie różna od próby kontrolnej (tabela 22).

Tabela 22. Statystyki opisowe dla średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) o różnym stężeniu vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Bufor do Au6	22	2,14	0,58	1,98	1,26	3,02	1,11	0,2668
Au6 20 30 min	22	2,04	0,66	1,93	1,08	3,81		
Bufor do Au6	22	2,14	0,58	1,98	1,26	3,02	0,02	0,9826
Au6 100 30 min	22	2,27	1,14	2,17	0,61	5,14		
Bufor do Au6	22	2,14	0,58	1,98	1,26	3,02	0,24	0,8107
Au6 200 30 min	22	2,25	0,99	1,89	1,34	4,49		
Bufor do Au6	22	2,14	0,58	1,98	1,26	3,02	0,20	0,8446
Au6 20 60 min	22	2,30	0,91	1,94	1,22	4,28		
Bufor do Au6	22	2,14	0,58	1,98	1,26	3,02	0,81	0,4204
Au6 100 60 min	22	2,34	0,81	2,22	1,06	4,20		
Bufor do Au6	22	2,14	0,58	1,98	1,26	3,02	0,52	0,6013
Au6 200 60 min	22	2,34	0,80	2,14	1,32	3,94		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa

1.1.2. Porównanie w obrębie prób zawierających rodaminę z zastosowaniem zmiennych - typu nanocząstek złota Au3 lub Au6 w różnych stężeniach i czasie inkubacji

Dla pozostałych porównywanych między sobą prób zawierających monocyty, nie wykazano różnicy istotnej statystycznie pomiędzy wykorzystanym typem nanocząstek złota (Au3 lub Au6), stężeniem (20, 100, 200 µg/ml), czasem inkubacji (30 lub 60 minut).

1.2. Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i nanocząstkami złota

W każdej z prób użyta była rodamina i PMA. Elementem różnicującym było dodanie AuNP (w próbach badanych) lub buforu, w którym zawieszone są nanocząstki w próbie kontrolnej.

1.2.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA i bufor względem próbek z rodaminą, PMA i Au3 lub Au6

1.2.1.1. Próbka zawierająca rodaminę PMA i bufor vs. rodaminę, PMA i Au3

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji w próbkach monocytów zawierających rodaminę, PMA oraz bufor (próba kontrolna), z próbkami zawierającymi rodaminę, PMA i kuliste nanocząstki złota (Au3) (próba badana). Zastosowano różnicowanie ze względu na zastosowany czas inkubacji (30 min lub 60 min) oraz stężenie (20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) dodanych AuNP. Wartość średniej intensywności fluorescencji dla próby kontrolnej wyniosła $16,97 \pm 2,82$. Różnica pomiędzy krwią z rodaminą i PMA po inkubacji z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie w przypadku stężenia 20 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 60 min. Wyższą wartość średniej intensywności fluorescencji zanotowano w przypadku próbki po inkubacji z nanocząstkami ($18,55 \pm 3,16$ vs. $16,97 \pm 2,82$ w próbie kontrolnej). W przypadku pozostałych porównań, próba kontrolna nie okazała się być istotnie różna od próbek po inkubacji pod względem wartości średniej intensywności fluorescencji, **tabela 23.**

Tabela 23. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 i ich analiza vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Bufor do Au3	22	16,97	2,82	17,02	11,80	22,52	0,33	0,744
Au3 / 20 / 30	22	17,52	4,61	16,54	11,73	29,98		
Bufor do Au3	22	16,97	2,82	17,02	11,80	22,52	0,15	0,879
Au3 / 100 / 30	22	17,33	4,43	16,96	11,04	28,34		
Bufor do Au3	22	16,97	2,82	17,02	11,80	22,52	0,81	0,420
Au3 / 200 / 30	22	17,77	4,27	17,89	11,22	26,17		
Bufor do Au3	22	16,97	2,82	17,02	11,80	22,52	2,63	0,008
Au3 / 20 / 60	22	18,55	3,16	18,74	11,39	25,63		
Bufor do Au3	22	16,97	2,82	17,02	11,80	22,52	1,81	0,071
Au3 / 100 / 60	22	19,54	5,86	17,16	11,39	34,14		
Bufor do Au3	22	16,97	2,82	17,02	11,80	22,52	0,28	0,777
Au3 / 200 / 60	22	17,64	5,79	16,74	11,24	33,47		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2.1.2. Próbka zawierająca rodaminę PMA i bufor vs. rodaminę, PMA i Au6

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji w próbkach zawierających rodaminę i PMA i bufor (próba kontrolna), z próbkami badanymi, do których dodano rodaminę, PMA i prętopodobne nanocząstki złota (Au6). Zastosowano dwa czasy inkubacji (30 min lub 60 min) oraz trzy stężenia (20, 100, 200 µg/ml) AuNP. W przypadku żadnej z badanych próbek wartość średniej intensywności fluorescencji nie okazała się być statystycznie różna od próby kontrolnej (**tabela 24**).

Tabela 24. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) i ich analiza vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Bufor do Au6	22	17,80	4,40	17,09	11,10	28,52	1,02	0,3061
Au6 20 30 min	22	19,29	3,63	18,76	12,43	26,68		
Bufor do Au6	22	17,80	4,40	17,09	11,10	28,52	0,11	0,9133
Au6 100 30 min	22	18,05	3,40	18,52	11,37	24,78		
Bufor do Au6	22	17,80	4,40	17,09	11,10	28,52	0,11	0,9133
Au6 200 30 min	22	18,58	5,28	17,14	12,57	31,26		
Bufor do Au6	22	17,80	4,40	17,09	11,10	28,52	0,63	0,5277
Au6 20 60 min	22	17,39	4,76	17,29	10,08	28,15		
Bufor do Au6	22	17,80	4,40	17,09	11,10	28,52	0,37	0,7113
Au6 100 60 min	22	17,06	5,54	16,97	10,20	29,39		
Bufor do Au6	22	17,80	4,40	17,09	11,10	28,52	0,54	0,5862
Au6 200 60 min	22	18,88	4,32	18,37	11,99	29,11		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa.

1.2.2. Porównanie w obrębie komórek wykazujących stan zapalny z zastosowaniem różnych zmiennych tj. typu nanocząstek złota Au3 lub Au6 w różnych stężeniach i czasie inkubacji

Analiza średniej intensywności fluorescencji monocytów z rodaminą i PMA inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) w stężeniu nanocząstek 20 µg/ml przez 30 i 60 minut. Wynik wskazał na istotną różnicę pomiędzy tymi próbkami. Wartość średniej intensywności fluorescencji była wyższa dla czasu inkubacji 30 min ($19,29 \pm 3,63$) vs. czas inkubacji 60 min ($17,39 \pm 4,76$), **tabela 25**.

Tabela 25. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 o stężeniu 20 µg/ml oraz ich analiza względem czasu inkubacji.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Au6 / 20 / 30	22	19,29	3,63	18,76	12,43	26,68	2,46	0,014
Au6 / 20 / 60	22	17,39	4,76	17,29	10,08	28,15		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

Dla pozostałych porównywanych między sobą prób zawierających monocyty, nie wykazano różnicy istotnej statystycznie pomiędzy wykorzystanym typem nanocząstek złota (Au₃ lub Au₆), stężeniem (20, 100, 200 µg/ml), czasem inkubacji (30 lub 60 minut).

D. Komórki inkubowane z nanocząstkami srebra

1. Monocyty

Wartości odsetkowe uczestniczących w wybuchu oddechowym monocytów przedstawione na cytogramie, odpowiadały wielkościom opisanym przez producenta testu Phagoburst i utrzymywały się na średnim poziomie $75,76 \pm 3,96\%$. Analiza statystyczna wartości odsetkowych nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy żadnymi próbami.

Wykonano 22 powtórzenia badań, przy użyciu 22 próbek krwi.

1.1. Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą i Ag

W każdej z prób była użyta rodamina, elementem różnicującym było dodanie buforu, w którym zawieszone są nanocząstki do próby kontrolnej lub nanocząstek srebra do prób badanych.

1.1.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę i bufor względem próbek z rodaminą i Ag

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji w próbkach monocytów zawierających rodaminę będących próbą kontrolną, z próbkami zawierającymi nanocząstki srebra (Ag). Elementem różnicującym był zastosowany czas inkubacji (30 min lub 60 min) oraz stężenie (20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) dodawanych nanocząstek. Wartość średniej intensywności fluorescencji dla próby kontrolnej wyniosła $1,61 \pm 0,34$. Natomiast po inkubacji z nanocząstkami srebra, wartość średniej intensywności fluorescencji wahała się między $1,54 \pm 0,26$ przy stężeniu nanocząstek 20 $\mu\text{g/ml}$ oraz czasie inkubacji 60 min do $1,92 \pm 0,48$ przy stężeniu nanocząstek 200 $\mu\text{g/ml}$ oraz czasie inkubacji 60 min. W przypadku żadnej z badanych próbek wartość średniej intensywności fluorescencji nie okazała się być statystycznie różna od próby kontrolnej. W dwóch porównaniach, tj. dla stężenia 100 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 30 min oraz stężenia 200 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 60 min, poziomy istotności były bliskie przyjętej granicy istotności, a więc bliskie uznania za istotne statystycznie ($p = 0,069$ i $p = 0,051$ odpowiednio). W tych przypadkach wartości średniej intensywności fluorescencji były wyższe dla próbek inkubowanych z nanocząstkami srebra Ag ($1,88 \pm 0,48$ vs. $1,61 \pm 0,34$ w próbce kontrolnej oraz $1,92 \pm 0,48$ vs. $1,61 \pm 0,34$ w próbce kontrolnej, odpowiednio), **tabela 26**.

Tabela 26. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z nanocząstkami srebra i ich analiza vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Bufor do Ag	22	1,61	0,34	1,49	1,20	2,42	-0,52	18	0,609
Ag / 20 / 30	22	1,67	0,41	1,65	1,10	2,77			
Bufor do Ag	22	1,61	0,34	1,49	1,20	2,42	-1,93	18	0,069
Ag / 100 / 30	22	1,88	0,48	1,69	1,21	3,03			
Bufor do Ag	22	1,61	0,34	1,49	1,20	2,42	-1,82	18	0,085
Ag / 200 / 30	22	1,81	0,37	1,92	1,19	2,45			
Bufor do Ag	22	1,61	0,34	1,49	1,20	2,42	0,65	18	0,526
Ag / 20 / 60	22	1,54	0,26	1,46	1,11	2,05			
Bufor do Ag	22	1,61	0,34	1,49	1,20	2,42	-0,20	18	0,841
Ag / 100 / 60	22	1,63	0,36	1,62	1,02	2,45			
Bufor do Ag	22	1,61	0,34	1,49	1,20	2,42	-2,09	18	0,051
Ag / 200 / 60	22	1,92	0,48	1,84	1,23	3,08			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa.

1.1.2. Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz inkubowanych z nanocząstkami srebra w różnym stężeniu

1.1.2.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę i PMA oraz inkubowanych przez 30 minut z nanocząstkami srebra w różnym stężeniu

Zmierzono wartość średniej intensywności fluorescencji dla krwi z rodaminą inkubowanej z nanocząstkami srebra przez 30 min w różnych stężeniach (20, 100, 200 µg/ml). Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy analizowanymi próbkami.

1.1.2.2. Porównanie próbek zawierających rodaminę i PMA oraz inkubowanych przez 60 minut z nanocząstkami srebra w różnym stężeniu

Analiza średniej intensywności fluorescencji dla krwi z rodaminą inkubowanej z nanocząstkami srebra przez 60 min w różnych stężeniach (20, 100, 200 µg/ml). Wartość średniej intensywności fluorescencji prób zawierających rodaminę i inkubowanych przez 60 minut z nanocząstkami srebra wyniosła $1,54 \pm 0,26$ przy stężeniu 20 µg/ml oraz $1,63 \pm 0,36$ przy stężeniu 100 µg/ml. Natomiast najwyższą wartość $1,92 \pm 0,48$ zanotowano przy stężeniu 200 µg/ml. Wynik testu wskazał na zależność wartości średniej intensywności fluorescencji od stężenia nanocząstek. Kolejno, zbadano, które pary wśród

trzech próbek odpowiadają za istotność statystyczną analizowanej zależności. Wynikiem tego kroku było potwierdzenie, że zależność od stężenia nanocząstek jest determinowana przez różnicę w średniej intensywności fluorescencji między stężeniem 20 µg/ml a 200 µg/ml oraz 100 µg/ml a 200 µg/ml, przy czym w obu przypadkach wyższą wartość osiągnęto przy stężeniu 200 µg/ml, **tabela 27**. Nie wykazano różnicy istotnej statystycznie pomiędzy zmierzoną wartością średniej intensywności fluorescencji dla krwi z rodaminą inkubowanej z nanocząstkami srebra przez 30 min w różnych stężeniach (20, 100, 200 µg/ml).

Tabela 27. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych przez 60 min z nanocząstkami srebra oraz ich analiza względem stężenia nanocząstek.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	F	df	p
Ag / 20 / 30 ^a	22	1,54	0,26	1,46	1,11	2,05	4,46	2/17	0,028
Ag / 100 / 30 ^b	22	1,63	0,36	1,62	1,02	2,45			
Ag / 200 / 30 ^{ab}	22	1,92	0,48	1,84	1,23	3,08			

F – wartość statystyki testowej testu Wilksa, df – liczba stopni swobody dla efektu/błędu, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$). a, b - różnice istotne statystycznie zbadane za pomocą testu post-hoc HDS Tukeya. a: $p = 0,008$, b: $p = 0,050$.

1.1.3. Porównanie próbek zawierających rodaminę oraz Ag w stężeniu 20, 100 lub 200 µg/ml przy różnym czasie inkubacji

Porównanie średniej intensywności fluorescencji prób z rodaminą inkubowanych z nanocząstkami srebra w stężeniu nanocząstek 20, 100 lub 200 µg/ml w różnym czasie inkubacji (30 i 60 minut), nie wykazało istotnej statystycznie różnicy pomiędzy analizowanymi próbkami.

1.2. Wartość średniej intensywności fluorescencji próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i buforem względem próbek inkubowanych z rodaminą, PMA i Ag

W każdej z prób była użyta rodamina i PMA, elementem różnicującym było dodanie buforu, w którym zawieszone są nanocząstki do próby kontrolnej lub nanocząstek srebra do prób badanych.

1.2.1. Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA i bufor względem próbek z rodaminą, PMA i Ag

Porównano wartość średniej intensywności fluorescencji w próbkach monocytów zawierających rodaminę oraz PMA oraz bufor (próba kontrolna), z próbami badanymi inkubowanymi z nanocząstkami srebra. Zastosowano czas inkubacji (30 min lub 60 min) oraz stężenie (20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) nanocząstek srebra. Wartość średniej intensywności fluorescencji dla próby kontrolnej wyniosła $23,69 \pm 2,80$. Natomiast po inkubacji z nanocząstkami srebra (Ag), wartość średniej intensywności fluorescencji wahała się między $21,32 \pm 3,21$ przy stężeniu nanocząstek 200 $\mu\text{g/ml}$ oraz czasie inkubacji 30 min do $24,07 \pm 2,81$ przy stężeniu nanocząstek 20 $\mu\text{g/ml}$ oraz czasie inkubacji 30 min. Różnica pomiędzy krwią z rodaminą i PMA po inkubacji z nanocząstkami srebra a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie w przypadku stężenia 200 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 30 min. Dla stężenia 200 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 30 min analizowana wartość była istotnie niższa niż w próbie kontrolnej i wyniosła $21,32 \pm 3,21$ (vs. $23,69 \pm 2,80$ w próbie kontrolnej). Ponadto, przy stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$ i czasie inkubacji 60 min różnica w wartościach średniej intensywności fluorescencji była również statystycznie istotna a wartość średniej intensywności fluorescencji wyniosła $21,52 \pm 3,63$ (vs. $23,69 \pm 2,80$ w próbie kontrolnej). Wśród pozostałych próbek inkubowanych z nanocząstkami srebra, żadna nie była istotnie różna od próby kontrolnej, **tabela 28**.

Tabela 28. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z nanocząstkami srebra oraz ich analiza vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Bufor do Ag	22	23,69	2,80	23,44	19,13	28,71	-0,37	18	0,713
Ag / 20 / 30	22	24,07	2,81	24,59	17,68	27,56			
Bufor do Ag	22	23,69	2,80	23,44	19,13	28,71	0,48	18	0,640
Ag / 100 / 30	22	23,20	3,59	23,44	16,50	28,96			
Bufor do Ag	22	23,69	2,80	23,44	19,13	28,71	2,13	18	0,048
Ag / 200 / 30	22	21,32	3,21	21,70	12,79	25,23			
Bufor do Ag	22	23,69	2,80	23,44	19,13	28,71	-0,19	18	0,851
Ag / 20 / 60	22	23,87	3,35	24,64	17,86	28,24			
Bufor do Ag	22	23,69	2,80	23,44	19,13	28,71	1,02	18	0,322
Ag / 100 / 60	22	22,59	3,29	22,77	14,13	28,51			
Bufor do Ag	22	23,69	2,80	23,44	19,13	28,71	2,24	18	0,038
Ag / 200 / 60	22	21,52	3,63	21,54	15,54	28,35			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2.2. Porównanie próbek zawierających rodaminę i PMA oraz inkubowanych z nanocząstkami srebra w różnym stężeniu

Wartość średniej intensywności fluorescencji monocytów zawierających rodaminę i PMA inkubowanych z nanocząstkami srebra (Ag) wyniosła $21,32 \pm 3,21$ przy stężeniu 200 µg/ml, $23,20 \pm 3,59$, przy stężeniu 100 µg/ml, a najwyższą wartość $24,07 \pm 2,81$ zanotowano przy stężeniu 20 µg/ml. Przeprowadzono ocenę istotności statystycznej zależności średniej intensywności fluorescencji omawianych próbek od stężenia nanocząstek, przy tym samym czasie inkubacji 30 min. Wnioskowanie potwierdziło istotność statystyczną badanej różnicy. Kolejno, przeanalizowano, które pary wśród trzech próbek odpowiadają za wykazaną istotność statystyczną. Testem post-hoc, potwierdzono, że odpowiedzialną za istotność zależności była para próbek o stężeniach 20 µg/ml i 200 µg/ml, **tabela 29**.

Tabela 29. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych przez 30 min z nanocząstkami srebra oraz ich analiza względem różnych poziomów stężenia.

Próbka (nanocząstka / stężenie, $\mu\text{g/ml}$ / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	F	df	p
Ag / 20 / 30 ^a	22	24,07	2,81	24,59	17,68	27,56	5,75	2/36	0,007
Ag / 100 / 30	22	23,20	3,59	23,44	16,50	28,96			
Ag / 200 / 30 ^a	22	21,32	3,21	21,70	12,79	25,23			

F – wartość statystyki testowej testu ANOVA powtarzanych pomiarów, *df* – liczba stopni swobody dla efektu/błędu, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$). a - różnica istotna statystycznie zbadana za pomocą testu post-hoc HDS Tukeya, $p = 0,006$.

Nie wykazano różnicy istotnej statystycznie dla krwi z rodaminą i PMA inkubowanej z nanocząstkami srebra (Ag) przez 60 min pomiędzy różnymi stężeniami (20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$).

1.2.3. Porównanie próbek zawierających rodaminę, PMA oraz Ag w stężeniu 20, 100 lub 200 $\mu\text{g/ml}$ przy różnym czasie inkubacji

Przeanalizowano wartości średniej intensywności fluorescencji monocytów z rodaminą i PMA inkubowanych z nanocząstkami srebra (Ag) w stężeniu nanocząstek 20, 100 lub 200 $\mu\text{g/ml}$ i różnym czasie inkubacji (30 i 60 minut). Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy analizowanymi próbkami.

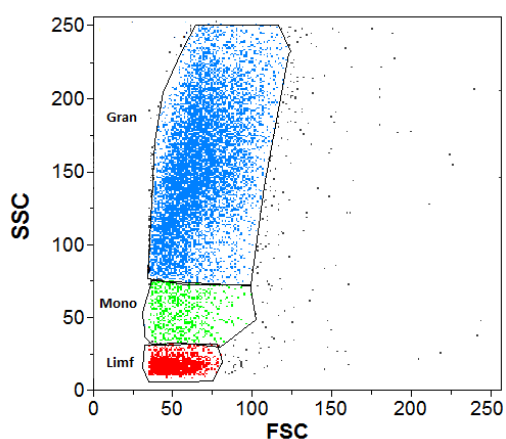
II. Ocena wpływu nanocząstek srebra i złota we krwi na indukcję pyroptozy

Rozdziału subpopulacji granulocytów i monocytów spośród krwinek białych, dokonano dzięki detektorom FSC i SSC (**ryc. 17**).

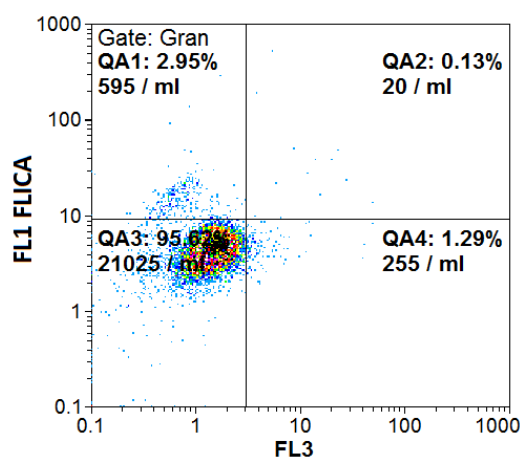
Do analizy wykorzystano cytogram (**ryc. 18 i 19**) z logarytmicznym detektorem FL1 na osi Y oraz detektorem FL3 na osi X. Komórki kaspazo-ujemne (FLICA-) znajdowały się w dolnej ćwiartce utworzonej przez obie współrzędne (QA3). Komórki kaspazo-dodatnie (FLICA+) umiejscowiono w ćwiartce QA1 i QA2. Komórki uszkodzone lub ich fragmenty zobrazowano w ćwiartce QA4.

Wykonano 22 powtórzenia badań, przy użyciu 22 próbek krwi.

Wszystkie próby zawierały FAM-VAD-FMK FLICA i płyn barwiący DNA, elementem różnicującym było dodanie nanocząstek złota i srebra lub buforu.

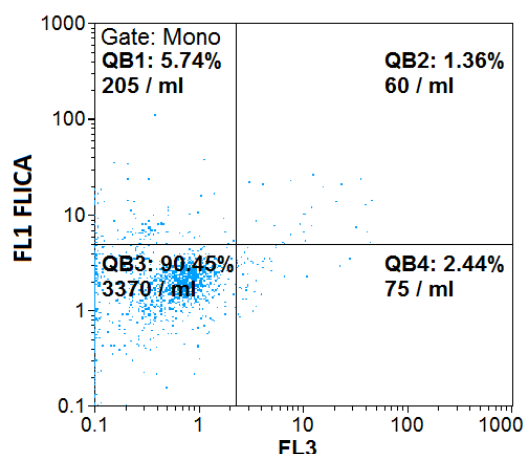


Ryc. 17. Przykładowy cytogram przedstawiający wyodrębnione bramkami populacje leukocytów w obrazie cytometrycznym. Gran – granulocyty, Mono – monocyty, Limf – limfocyty, źródło własne.



Ryc. 18. Przykładowy cytogram przedstawiający rozkład odsetkowy granulocytów. Wykorzystano fluorescencję sondy FAM-VAD-FMK FLICA wywołaną aktywacją

prozapalnej kaspazy-1. QA1 i QA2 - komórki wykazujące pyroptozę; QA3 - komórki prawidłowe; QA4 – komórki uszkodzone lub ich fragmenty, źródło własne.



Ryc. 19. Przykładowy cytogram przedstawiający rozkład odsetkowy monocytów. Wykorzystano fluorescencję sondy FAM-VAD-FMK FLICA wywołaną aktywacją prozapalnej kaspazy-1. QA1 i QA2 - komórki wykazujące pyroptozę; QA3 - komórki prawidłowe; QA4 – komórki uszkodzone lub ich fragmenty, źródło własne.

A. Komórki inkubowane z nanocząstkami złota

1. Granulocyty

1.1. Porównanie komórek prawidłowych względem komórek wykazujących pyroptozę

Analizowano próbki granulocytów inkubowane przez 30 i 60 minut z różnymi typami nanocząstek złota (Au3 i Au6) w różnych stężeniach (20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) lub buforem. Dla wszystkich prób zastosowano podział na komórki prawidłowe oraz wykazujące pyroptozę. Komórki inkubowane z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) wykazały średni odsetek komórek pyroptotycznych pomiędzy $4,48 \pm 2,04$ dla stężenia 20 $\mu\text{g/ml}$ i inkubacji przez 60 minut do $3,10 \pm 1,29$ w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ i inkubacji przez 30 minut. Wśród komórek inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) średni odsetek komórek pyroptotycznych wahał się od $3,09 \pm 1,09$ w przypadku prób inkubowanych przez 30 min w stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$ do $6,62 \pm 13,12$ prób inkubowanych przez 30 min w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$. W próbkach z buforem dla kulistych nanocząstek złota średni odsetek komórek pyroptotycznych wyniósł $3,00 \pm 1,41$. Natomiast w przypadku buforu dla prętopodobnych nanocząstek złota $4,32 \pm 4,57$. Dokonano porównywań parami, w każdej z par obecne były komórki prawidłowe oraz wykazujące pyroptozę. We wszystkich analizowanych parach, różnica między odsetkiem komórek prawidłowych

a wykazujących pyroptozę była statystycznie istotna. Również dla każdej z par istotnie wyższy poziom wskaźnika był osiągany dla komórek prawidłowych, **tabela 30**. Na podstawie poziomu istotności p odpowiedniego testu post-hoc dla wszystkich prób (testu Tukeya) można wyróżnić dwie jednorodne grupy: jedna obejmująca komórki prawidłowe, druga zawierająca komórki wykazujące pyroptozę.

Wykonano 22 powtórzenia badań, przy użyciu 22 próbek krwi.

Do dalszej analizy wybrano komórki wykazujące pyroptozę.

Tabela 30. Próbkki inkubowane z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au3 i Au6) oraz próby z buforem, w podziale na komórki prawidłowe (P) oraz wykazujące pyroptozę (PYR) - statystyki opisowe dla odsetka komórek prawidłowych (P) / wykazujących pyroptozę (PYR).

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Au3 / 20 / 60 / P	22	95,52	2,04	96,28	90,49	98,62	94,72	17	<0,001
Au3 / 20 / 60 / PYR	22	4,48	2,04	3,72	1,39	9,51			
Au3 / 100 / 60 / P	22	96,39	1,20	96,42	92,82	98,20	165,06	17	<0,001
Au3 / 100 / 60 / PYR	22	3,62	1,19	3,59	1,79	7,17			
Au3 / 200 / 60 / P	22	95,86	1,42	95,94	93,48	97,74	136,69	17	<0,001
Au3 / 200 / 60 / PYR	22	4,19	1,44	4,08	2,25	6,51			
Au6 / 20 / 60 / P	22	96,31	1,03	96,19	94,05	97,97	197,23	17	<0,001
Au6 / 20 / 60 / PYR	22	3,74	0,97	3,82	2,34	5,96			
Au6 / 100 / 60 / P	22	95,97	1,48	96,54	92,71	98,20	132,09	17	<0,001
Au6 / 100 / 60 / PYR	22	4,03	1,48	3,46	1,80	7,29			
Au6 / 200 / 60 / P	22	95,24	2,44	95,49	87,80	98,54	112,43	17	<0,001
Au6 / 200 / 60 / PYR	22	4,21	1,66	4,30	1,46	8,84			
Au3 / 20 / 30 P	22	96,80	1,01	96,94	95,14	98,50	188,97	17	<0,001
Au3 / 20 / 30 / PYR	22	3,26	1,10	3,07	1,50	5,46			
Au3 / 100 / 30 / P	22	96,90	1,29	97,25	94,19	98,52	154,08	17	<0,001
Au3 / 100 / 30 / PYR	22	3,10	1,29	2,76	1,42	5,81			
Au3 / 200 / 30 / P	22	96,80	1,01	96,83	95,46	98,47	196,58	17	<0,001
Au3 / 200 / 30 / PYR	22	3,20	1,01	3,17	1,53	4,55			
Au6 / 20 / 30 / P	22	96,56	1,42	96,31	93,82	98,91	29,68	17	<0,001
Au6 / 20 / 30 / PYR	22	6,62	13,12	4,00	1,09	58,93			
Au6 / 100 / 30 / P	22	96,61	1,22	96,65	94,55	99,31	162,21	17	<0,001
Au6 / 100 / 30 / PYR	22	3,40	1,22	3,35	0,69	5,45			
Au6 / 200 / 30 / P	22	96,91	1,09	96,89	95,39	98,63	182,43	17	<0,001

Au6 / 200 / 30 / PYR	22	3,09	1,09	3,11	1,37	4,61			
Au3 bufor P	22	97,05	1,41	97,33	94,36	99,84	141,96	17	<0,001
Au3 bufor PYR	22	3,00	1,41	2,77	0,17	5,64			
Au6 bufor P	22	96,58	1,56	96,80	93,08	99,87	68,39	17	<0,001
Au6 bufor PYR	22	4,32	4,57	3,20	0,23	21,70			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, *df* – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2. Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę zawierających bufor z komórkami zawierającymi nanocząstki złota Au3 lub Au6

1.2.1. Próbką zawierająca bufor vs. próbka zawierająca Au3

Porównano odsetki komórek wykazujących pyroptozę w próbkach granulocytów inkubowanych przez 30 i 60 minut z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) w stężeniu 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ z próbą kontrolną. Średni udział komórek pyroptotycznych w próbie kontrolnej wyniósł $3,00 \pm 1,41$. Natomiast po inkubacji z kulistymi nanocząstkami złota, odsetek ten wahał się między $3,10 \pm 1,29$ przy stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ oraz czasie inkubacji 30 min do $4,48 \pm 2,04$ przy stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ oraz czasie inkubacji 60 min. Różnica pomiędzy krwią po inkubacji z kulistymi nanocząstkami złota a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie w przypadku stężenia 20 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 60 min oraz stężenia 200 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 60 min. W obu przypadkach wyższą wartość odsetkową komórek wykazujących pyroptozę zanotowano w przypadku próbek po inkubacji z nanocząstkami ($4,48 \pm 2,04$ vs. $3,00 \pm 1,41$ w próbie kontrolnej dla stężenia 20 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 60 min oraz $4,19 \pm 1,44$ vs. $3,00 \pm 1,41$ w próbie kontrolnej dla stężenia 200 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 60 min). W przypadku pozostałych porównań, próba kontrolna nie okazała się być istotnie różna od próbek po inkubacji z nanocząstkami, **tabela 31**.

Tabela 31. Statystyki opisowe dla odsetków komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 oraz ich porównanie vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Au3 / 20 / 30	22	3,26	1,10	3,07	1,50	5,46	0,72	17	0,479
Bufor do Au3	22	3,00	1,41	2,77	0,17	5,64			
Au3 / 100 / 30	22	3,10	1,29	2,76	1,42	5,81	0,23	17	0,819
Bufor do Au3	22	3,00	1,41	2,77	0,17	5,64			
Au3 / 200 / 30	22	3,20	1,01	3,17	1,53	4,55	0,60	17	0,556
Bufor do Au3	22	3,00	1,41	2,77	0,17	5,64			
Au3 / 20 / 60	22	4,48	2,04	3,72	1,39	9,51	3,06	17	0,007
Bufor do Au3	22	3,00	1,41	2,77	0,17	5,64			
Au3 / 100 / 60	22	3,62	1,19	3,59	1,79	7,17	1,78	17	0,093
Bufor do Au3	22	3,00	1,41	2,77	0,17	5,64			
Au3 / 200 / 60	22	4,19	1,44	4,08	2,25	6,51	3,51	17	0,003
Bufor do Au3	22	3,00	1,41	2,77	0,17	5,64			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2.2. Próbką zawierająca bufor vs. próbka zawierająca Au6

Porównano odsetki komórek wykazujących pyroptozę w próbkach granulocytów inkubowanych przez 30 i 60 minut z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) w stężeniu 20, 100, 200 µg/ml z próbą kontrolną. Średni udział komórek pyroptotycznych w próbie kontrolnej wyniósł $4,32 \pm 4,57$. Natomiast po inkubacji z prętopodobnymi nanocząstkami złota, odsetek ten wahał się między $3,09 \pm 1,09$ przy stężeniu nanocząstek 200 µg/ml oraz czasie inkubacji 30 min do $6,62 \pm 13,12$ przy stężeniu nanocząstek 20 µg/ml oraz czasie inkubacji 30 min. Różnica pomiędzy krwią po inkubacji z prętopodobnymi nanocząstkami złota a próbą kontrolną okazała się być nieistotna statystycznie we wszystkich przypadkach, **tabela 32**.

Tabela 32. Statystyki opisowe dla odsetków komórek pyroptotycznych w próbkach inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 oraz ich porównanie vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, $\mu\text{g/ml}$ / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Au6 / 20 / 30	22	6,62	13,12	4,00	1,09	58,93	0,68	17	0,503
Bufor do Au6	22	4,32	4,57	3,20	0,23	21,70			
Au6 / 100 / 30	22	3,40	1,22	3,35	0,69	5,45	-0,84	17	0,415
Bufor do Au6	22	4,32	4,57	3,20	0,23	21,70			
Au6 / 200 / 30	22	3,09	1,09	3,11	1,37	4,61	-1,19	17	0,249
Bufor do Au6	22	4,32	4,57	3,20	0,23	21,70			
Au6 / 20 / 60	22	3,74	0,97	3,82	2,34	5,96	-0,58	17	0,568
Bufor do Au6	22	4,32	4,57	3,20	0,23	21,70			
Au6 / 100 / 60	22	4,03	1,48	3,46	1,80	7,29	-0,27	17	0,787
Bufor do Au6	22	4,32	4,57	3,20	0,23	21,70			
Au6 / 200 / 60	22	4,21	1,66	4,30	1,46	8,84	-0,10	17	0,923
Bufor do Au6	22	4,32	4,57	3,20	0,23	21,70			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa.

1.2.3. Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę inkubowanych przez 30 lub 60 minut z Au3 lub Au6 w różnym stężeniu

Zmierzono odsetek komórek wykazujących pyroptozę dla krwi inkubowanej z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) lub prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) przez 30 lub 60 min w stężeniach 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy analizowanymi próbkami.

1.2.4. Porównanie w obrębie komórek pyroptotycznych inkubowanych w różnym czasie z Au3 lub Au6 w stężeniu 20, 100 lub 200 $\mu\text{g/ml}$

1.2.4.1. Próbka zawierająca Au3 w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$

Udział procentowy komórek wykazujących pyroptozę w próbkach z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ i różnym czasie inkubacji (30 i 60 minut). Wynik wskazał na istotną różnicę pomiędzy tymi próbkami. Analizowany wskaźnik był wyższy dla czasu inkubacji 30 min ($4,48 \pm 2,04$) vs. czas inkubacji 60 min ($3,26 \pm 1,10$), **tabela 33**.

Tabela 33. Statystyki opisowe dla odsetków komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ i ich analiza względem czasu inkubacji.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Au3 / 20 / 30	22	4,48	2,04	3,72	1,39	9,51	2,29	17	0,035
Au3 / 20 / 60	22	3,26	1,10	3,07	1,50	5,46			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2.4.2. Próbką zawierająca Au3 w stężeniu 100 µg/ml

Zmierzony odsetek komórek pyroptotycznych inkubowanych przez 30 i 60 minut z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) w stężeniu 100 µg/ml. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy czasem inkubacji 30 min a 60 min.

1.2.4.3. Próbką zawierająca Au3 w stężeniu 200 µg/ml

Przeanalizowano udział procentowy komórek wykazujących pyroptozę po inkubacji z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) w stężeniu 200 µg/ml, w czasie 30 i 60 minut. Wynik wskazał na istotną różnicę pomiędzy tymi próbkami. Analizowany wskaźnik był wyższy dla czasu inkubacji 30 min ($4,19 \pm 1,44$) vs. czas inkubacji 60 min ($3,20 \pm 1,01$), **tabela 34**.

Tabela 34. Statystyki opisowe dla odsetków komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o stężeniu 200 µg/ml i ich analiza względem czasu inkubacji.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Au3 / 200 / 30	22	4,19	1,44	4,08	2,25	6,51	3,68	17	0,002
Au3 / 200 / 60	22	3,20	1,01	3,17	1,53	4,55			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2.4.4. Próbką zawierająca Au6 w stężeniu 20, 100 lub 200 µg/ml

Udział procentowy komórek wykazujących pyroptozę inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota z (Au6) w stężeniu nanocząstek 200 µg/ml, przez 30 i 60 minut. Wynik wskazał na istotną różnicę pomiędzy tymi próbkami. Analizowany wskaźnik był wyższy dla czasu inkubacji 30 min ($4,21 \pm 1,66$) vs. czas inkubacji 60 min ($3,09 \pm 1,09$), **tabela 35**.

Tabela 35. Statystyki opisowe dla odsetków komórek pyroptotycznych w próbkach inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 o stężeniu 200 µg/ml i ich analiza względem czasu inkubacji.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Au6 / 200 / 30	22	4,21	1,66	4,30	1,46	8,84	3,46	17	0,030
Au6 / 200 / 60	22	3,09	1,09	3,11	1,37	4,61			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

Dla prób ze stężeniem Au6 20 i 100 µg/ml nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy czasami inkubacji 30 i 60 minut.

1.2.5. Porównanie prób inkubowanych z nanocząstkami złota Au3 vs. Au6 przez 30 lub 60 minut w różnym stężeniu

Analiza porównawcza próbek krwi inkubowanych z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au3 i Au6) przez 30 lub 60 min w różnych stężeniach (20, 100, 200 µg/ml) nie wykazała istotnej różnicy między typami nanocząstek dla żadnego z zastosowanych stężeń.

B. Komórki inkubowane z nanocząstkami srebra

1. Granulocyty

1.1. Porównanie komórek prawidłowych względem komórek wykazujących pyroptozę

Analizowano próbki granulocytów inkubowane z nanocząstkami srebra (Ag) przez 30 min i 60 min w różnych stężeniach 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ lub buforem. Do wszystkich prób zastosowano podział na komórki prawidłowe oraz wykazujące pyroptozę. Wśród komórek inkubowanych z nanocząstkami srebra średni odsetek komórek pyroptotycznych wahał się od $2,95 \pm 1,36$ w przypadku granulocytów inkubowanych przez 30 min z Ag o stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ do $8,85 \pm 20,53$ inkubowanych przez 60 min z nanocząstkami srebra o stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$. Z kolei w próbkach z buforem średni odsetek komórek pyroptotycznych wyniósł $4,31 \pm 1,68$. Dokonano porównywań parami, w każdej z par obecne były komórki prawidłowe oraz wykazujące pyroptozę tego samego typu. We wszystkich analizowanych parach różnica między odsetkiem komórek prawidłowych a wykazujących pyroptozę była statystycznie istotna ($p < 0,001$ w każdym przypadku). Przy czym również dla każdej z par istotnie wyższy poziom wskaźnika był osiągnięty dla komórek prawidłowych, **tabela 36**.

Wykonano 22 powtórzenia badań, przy użyciu 22 próbek krwi.

Do dalszej analizy wybrano komórki wykazujące pyroptozę.

Tabela 36. Próbki inkubowane z nanocząstkami srebra oraz próby z buforem, w podziale na komórki prawidłowe (P) oraz wykazujące pyroptozę (PYR) - statystyki opisowe oraz odsetek komórek prawidłowych (P) / wykazujących pyroptozę (PYR).

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Ag / 20 / 60 / P	22	96,04	1,71	96,26	91,69	98,40	18,24	17	<0,001
Ag / 20 / 60 / PYR	22	8,85	20,53	3,80	1,60	90,84			
Ag / 100 / 60 / P	22	96,54	1,29	96,63	93,61	98,48	140,79	17	<0,001
Ag / 100 / 60 / PYR	22	3,99	1,79	3,44	1,52	7,72			
Ag / 200 / 60 / P	22	96,56	1,25	97,17	94,22	98,17	157,76	17	<0,001
Ag / 200 / 60 / PYR	22	3,44	1,25	2,84	1,83	5,78			
Ag / 20 / 30 P	22	97,06	1,37	97,21	93,66	98,95	146,32	17	<0,001
Ag / 20 / 30 / PYR	22	2,95	1,36	2,79	1,15	6,34			
Ag / 100 / 30 / P	22	96,93	1,15	97,08	94,24	98,44	172,95	17	<0,001
Ag / 100 / 30 / PYR	22	3,08	1,15	2,92	1,57	5,76			
Ag / 200 / 30 / P	22	95,91	3,20	96,31	83,86	98,48	92,34	17	<0,001
Ag / 200 / 30 / PYR	22	3,53	1,25	3,69	1,52	6,14			
Ag bufor P	22	99,95	0,07	99,97	99,78	100,00	3242,86	17	<0,001
Ag bufor PYR	22	4,31	1,68	3,96	0,10	7,34			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2. Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę zawierających bufor z komórkami zawierającymi nanocząstki srebra

Porównano odsetki komórek pyroptotycznych w próbkach granulocytów inkubowanych z nanocząstkami srebra (Ag) z próbą kontrolną zawierającą bufor. Wykorzystano dwa czasy inkubacji (30 min lub 60 min) oraz stężenie nanocząstek: 20, 100, 200 µg/ml. Średni udział komórek pyroptotycznych w próbie kontrolnej wyniósł $4,31 \pm 1,68$. Natomiast po inkubacji z nanocząstkami srebra, odsetek próbek wahał się między $2,95 \pm 1,36$ w stężeniu nanocząstek 20 µg/ml oraz czasie inkubacji 30 min do $8,85 \pm 20,53$ o stężeniu nanocząstek 20 µg/ml oraz czasie inkubacji 60 min. Różnica pomiędzy krwią po inkubacji z nanocząstkami srebra a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie w przypadku stężenia 20 µg/ml i czasu inkubacji 30 min oraz stężenia 100 µg/ml i czasu inkubacji 30 min. W obu przypadkach niższą wartość odsetkową komórek wykazujących pyroptozę zanotowano w przypadku próbek po inkubacji z nanocząstkami ($2,95 \pm 1,36$ vs. $4,31 \pm 1,68$ w próbie kontrolnej vs. w stężeniu 20 µg/ml i czasie inkubacji 30 min oraz $3,08 \pm 1,15$ vs. $4,31 \pm 1,68$ w próbie kontrolnej vs. o stężenia 100 µg/ml i czasie inkubacji 30 min). W przypadku pozostałych porównań, próba kontrolna nie okazała się być istotnie różna od próbek po inkubacji, **tabela 37**.

Tabela 37. Statystyki opisowe dla odsetka komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z nanocząstkami srebra oraz ich porównanie vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Ag / 20 / 30	22	2,95	1,36	2,79	1,15	6,34	-2,82	17	0,012
Bufor do Ag	22	4,31	1,68	3,96	0,10	7,34			
Ag / 100 / 30	22	3,08	1,15	2,92	1,57	5,76	-2,31	17	0,034
Bufor do Ag	22	4,31	1,68	3,96	0,10	7,34			
Ag / 200 / 30	22	3,53	1,25	3,69	1,52	6,14	-1,62	17	0,124
Bufor do Ag	22	4,31	1,68	3,96	0,10	7,34			
Ag / 20 / 60	22	8,85	20,53	3,80	1,60	90,84	0,97	17	0,344
Bufor do Ag	22	4,31	1,68	3,96	0,10	7,34			
Ag / 100 / 60	22	3,99	1,79	3,44	1,52	7,72	-0,54	17	0,597
Bufor do Ag	22	4,31	1,68	3,96	0,10	7,34			
Ag / 200 / 60	22	3,44	1,25	2,84	1,83	5,78	-1,87	17	0,079
Bufor do Ag	22	4,31	1,68	3,96	0,10	7,34			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2.1. Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę inkubowanych z nanocząstkami srebra przez 30 lub 60 minut

Zmierzono odsetek komórek pyroptotycznych dla krwi inkubowanej z nanocząstkami srebra (Ag) w czasie inkubacji 30 lub 60 min oraz różnych stężeniach 20, 100, 200 µg/ml. Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy pomiędzy analizowanymi próbkami.

1.2.2. Porównanie w obrębie komórek pyroptotycznych z wykorzystaniem tego samego stężenia nanocząstek srebra

Udział procentowy komórek wykazujących pyroptozę inkubowanych z nanocząstkami srebra (Ag) o stężeniu nanocząstek 100 µg/ml przez 30 i 60 minut. Wynik wskazał na istotną różnicę pomiędzy tymi próbkami. Analizowany wskaźnik był wyższy dla czasu inkubacji 60 min ($3,99 \pm 1,79$) vs. czas inkubacji 30 min ($3,08 \pm 1,15$), **tabela 38.**

Tabela 38. Statystyki opisowe dla odsetka komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z nanocząstkami srebra o stężeniu 100 µg/ml i ich analiza względem czasu inkubacji.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Ag / 100 / 60	22	3,99	1,79	3,44	1,52	7,72	2,19	17	0,043
Ag / 100 / 30	22	3,08	1,15	2,92	1,57	5,76			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

Dla nanocząstek w stężeniu 20 i 200 µg/ml nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy czasem inkubacji 30 i 60 minut.

C. Komórki inkubowane z nanocząstkami złota

2. Monocyty

2.1. Porównanie komórek prawidłowych względem komórek wykazujących pyroptozę

Analizowano próbki granulocytów inkubowane przez 30 i 60 minut z różnymi typami nanocząstek złota (Au3 i Au6) w różnych stężeniach (20, 100, 200 µg/ml) lub buforem. Wśród komórek inkubowanych z nanocząstkami średni odsetek komórek pyroptotycznych wahał się od $5,58 \pm 2,40$ w przypadku monocytów inkubowanych przez 30 min z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) o stężeniu 200 µg/ml do $7,38 \pm 3,00$ o stężeniu 20 µg/ml i inkubacji przez 60 minut. W przypadku monocytów inkubowanych przez 30 minut z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) w stężeniu 30 µg/ml średni odsetek komórek pyroptotycznych wynosił od $5,90 \pm 2,54$ do $9,41 \pm 11,25$ w przypadku monocytów inkubowanych przez 60 min w stężeniu 100 µg/ml. Z kolei w próbkach z buforem średni odsetek komórek pyroptotycznych wyniósł $4,31 \pm 3,03$ w przypadku komórek z buforem do kulistych nanocząstek złota oraz $6,44 \pm 2,72$ dla buforu do prętopodobnych nanocząstek złota. Dokonano porównywań parami, w każdej z par obecne były komórki prawidłowe oraz wykazujące pyroptozę. We wszystkich analizowanych parach różnica między średnim odsetkiem komórek prawidłowych a wykazujących pyroptozę była statystycznie istotna. Również dla każdej z par istotnie wyższy poziom wskaźnika był osiągnięty komórek prawidłowych, **tabela 39**.

Wykonano 22 powtórzenia badań, przy użyciu 22 próbek krwi.

Do dalszej analizy wybrano komórki wykazujące pyroptozę.

Tabela 39. Próbki inkubowane z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au3 i Au6) oraz próby z buforem, w podziale na komórki prawidłowe (P) oraz wykazujące pyroptozę (PYR) - statystyki opisowe dla odsetka komórek prawidłowych (P) / wykazujących pyroptozę (PYR).

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Au3 / 20 / 60 / P	22	92,68	3,02	93,36	82,42	96,03	60,2	17	<0,001
Au3 / 20 / 60 / PYR	22	7,38	3,00	6,92	3,96	17,58			
Au3 / 100 / 60 / P	22	92,91	3,89	92,62	83,99	100,00	46,8	17	<0,001
Au3 / 100 / 60 / PYR	22	7,09	3,89	7,38	0,00	16,01			
Au3 / 200 / 60 / P	22	92,81	2,57	92,94	86,83	98,09	70,6	17	<0,001
Au3 / 200 / 60 / PYR	22	7,19	2,57	7,07	1,91	13,17			

Au6 / 20 / 60 / P	22	92,98	2,05	92,86	89,32	96,64	91,0	17	<0,001
Au6 / 20 / 60 / PYR	22	7,02	1,97	7,07	4,36	10,67			
Au6 / 100 / 60 / P	22	93,34	2,25	93,14	89,66	98,17	32,3	17	<0,001
Au6 / 100 / 60 / PYR	22	9,41	11,25	7,02	1,83	53,69			
Au6 / 200 / 60 / P	22	93,54	2,84	94,01	86,21	97,99	65,1	17	<0,001
Au6 / 200 / 60 / PYR	22	6,48	2,84	6,20	2,01	13,79			
Au3 / 20 / 30 P	22	93,42	2,53	93,58	88,15	97,00	72,7	17	<0,001
Au3 / 20 / 30 / PYR	22	6,61	2,54	6,42	2,99	11,84			
Au3 / 100 / 30 / P	22	94,31	2,51	95,31	87,58	97,00	74,9	17	<0,001
Au3 / 100 / 30 / PYR	22	5,69	2,51	4,70	3,01	12,42			
Au3 / 200 / 30 / P	22	94,37	2,36	94,54	87,95	98,02	79,1	17	<0,001
Au3 / 200 / 30 / PYR	22	5,58	2,40	5,51	1,98	12,04			
Au6 / 20 / 30 / P	22	93,09	2,62	93,23	88,17	97,09	69,3	17	<0,001
Au6 / 20 / 30 / PYR	22	6,79	2,69	6,39	2,92	11,84			
Au6 / 100 / 30 / P	22	93,28	3,11	93,86	88,36	98,60	57,4	17	<0,001
Au6 / 100 / 30 / PYR	22	6,72	3,11	6,13	1,40	11,64			
Au6 / 200 / 30 / P	22	94,10	2,54	93,65	88,19	100,00	73,5	17	<0,001
Au6 / 200 / 30 / PYR	22	5,90	2,54	6,35	0,00	11,81			
Au3 bufor P	22	95,81	3,00	95,16	90,36	100,00	64,5	17	<0,001
Au3 bufor PYR	22	4,31	3,03	5,15	0,00	9,63			
Au6 bufor P	22	93,63	2,73	93,65	87,70	100,00	67,9	17	<0,001
Au6 bufor PYR	22	6,44	2,72	6,38	0,00	12,29			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, *df* – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

2.2. Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę zawierających bufor z komórkami zawierającymi nanocząstki złota

2.2.1. Porównanie próbek zawierających bufor względem próbek z Au3 lub Au6

2.2.1.1. Próbką zawierająca bufor vs. Au3

Porównano odsetki komórek wykazujących pyroptozę w próbkach monocytów inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) z próbą kontrolną. Zastosowano dwa czasy inkubacji (30 min lub 60 min) oraz trzy stężenia (20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) dodawanych kulistych nanocząstek złota. Średni udział komórek pyroptotycznych w próbce kontrolnej wyniósł $4,31 \pm 3,03$. Natomiast po inkubacji z kulistymi nanocząstkami złota, odsetek ten wahał się między $5,58 \pm 2,40$ w stężeniu nanocząstek 200 $\mu\text{g/ml}$ oraz czasie inkubacji 30 min do $7,38 \pm 3,00$ w stężeniu nanocząstek 20 $\mu\text{g/ml}$ oraz

czasie inkubacji 60 min. Różnica pomiędzy krwią po inkubacji z kulistymi nanocząstkami złota a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie w przypadku stężenia 20 µg/ml i czasu inkubacji 30 min, stężenia 20 µg/ml i czasu inkubacji 60 min, stężenia 100 µg/ml i czasu inkubacji 60 min oraz stężenia 200 µg/ml i czasu inkubacji 60 min. We wszystkich tych przypadkach wyższą wartość odsetkową komórek pyroptotycznych zanotowano w próbkach po inkubacji z nanocząstkami ($6,61 \pm 2,54$ vs. $4,31 \pm 3,03$ w próbie kontrolnej vs. w stężeniu 20 µg/ml i czasie inkubacji 30 min, $7,38 \pm 3,00$ vs. $4,31 \pm 3,03$ w próbie kontrolnej vs. o stężeniu 20 µg/ml i czasie inkubacji 60 min, $7,09 \pm 3,89$ vs. $4,31 \pm 3,03$ w próbie kontrolnej vs. w stężeniu 100 µg/ml i czasie inkubacji 60 min oraz $7,19 \pm 2,57$ vs. $4,31 \pm 3,03$ w próbie kontrolnej vs. o stężeniu 200 µg/ml i czasie inkubacji 60 min). W przypadku pozostałych porównań, próba kontrolna nie okazała się być istotnie różna od próbek po inkubacji, **tabela 40**.

Tabela 40. Statystyki opisowe dla odsetka komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Au3 / 20 / 30	22	6,61	2,54	6,42	2,99	11,84	2,70	17	0,015
Bufor do Au3	22	4,31	3,03	5,15	0,00	9,63			
Au3 / 100 / 30	22	5,69	2,51	4,70	3,01	12,42	1,35	17	0,194
Bufor do Au3	22	4,31	3,03	5,15	0,00	9,63			
Au3 / 200 / 30	22	5,58	2,40	5,51	1,98	12,04	1,51	17	0,151
Bufor do Au3	22	4,31	3,03	5,15	0,00	9,63			
Au3 / 20 / 60	22	7,38	3,00	6,92	3,96	17,58	3,13	17	0,006
Bufor do Au3	22	4,31	3,03	5,15	0,00	9,63			
Au3 / 100 / 60	22	7,09	3,89	7,38	0,00	16,01	2,66	17	0,017
Bufor do Au3	22	4,31	3,03	5,15	0,00	9,63			
Au3 / 200 / 60	22	7,19	2,57	7,07	1,91	13,17	3,18	17	0,006
Bufor do Au3	22	4,31	3,03	5,15	0,00	9,63			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

2.2.1.2. Próbką zawierająca bufor vs. Au6

Porównano odsetki komórek wykazujących pyroptozę w próbkach monocytów inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) z próbą kontrolną. Zastosowano dwa czasy inkubacji (30 min lub 60 min) oraz trzy stężenia (20, 100, 200

µg/ml) dodawanych prętopodobnych nanocząstek złota. Średni udział komórek pyroptotycznych w próbie kontrolnej wyniósł $6,44 \pm 2,72$. Natomiast po inkubacji z prętopodobnymi nanocząstkami złota, odsetek ten wahał się między $5,90 \pm 2,54$ przy stężeniu nanocząstek 200 µg/ml oraz czasie inkubacji 30 min do $7,02 \pm 1,97$ przy stężeniu nanocząstek 20 µg/ml oraz czasie inkubacji 60 min. Różnica pomiędzy krwią po inkubacji z kulistymi nanocząstkami złota a próbą kontrolną okazała się być nieistotna statystycznie we wszystkich analizowanych przypadkach, **tabela 41**.

Tabela 41. Statystyki opisowe dla odsetka komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 i ich porównanie vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Au6 / 20 / 30	22	6,79	2,69	6,39	2,92	11,84	0,36	17	0,720
Bufor do Au6	22	6,44	2,72	6,38	0,00	12,29			
Au6 / 100 / 30	22	6,62	3,05	5,94	1,40	11,64	0,17	17	0,867
Bufor do Au6	22	6,44	2,72	6,38	0,00	12,29			
Au6 / 200 / 30	22	5,90	2,54	6,35	0,00	11,81	-0,63	17	0,535
Bufor do Au6	22	6,44	2,72	6,38	0,00	12,29			
Au6 / 20 / 60	22	7,02	1,97	7,07	4,36	10,67	0,77	17	0,450
Bufor do Au6	22	6,44	2,72	6,38	0,00	12,29			
Au6 / 100 / 60	22	9,41	11,25	7,02	1,83	53,69	1,12	17	0,278
Bufor do Au6	22	6,44	2,72	6,38	0,00	12,29			
Au6 / 200 / 60	22	6,48	2,84	6,20	2,01	13,79	0,05	17	0,961
Bufor do Au6	22	6,44	2,72	6,38	0,00	12,29			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa.

2.2.2. Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę z zastosowaniem różnych zmiennych, tj. typu nanocząstek złota Au3 lub Au6 w różnych stężeniach i czasie inkubacji

Nie wykazano różnicy istotnej statystycznie pomiędzy komórkami wykazującymi pyroptozę z uwzględnieniem wykorzystanego typu nanocząstek złota (Au3 lub Au6), stężenia (20, 100, 200 µg/ml), czasu inkubacji (30 lub 60 minut).

D. Komórki inkubowane z nanocząstkami srebra

1. Monocyty

1.1. Porównanie komórek prawidłowych względem komórek wykazujących pyroptozę

Analizowano próbki monocytów inkubowane z nanocząstkami srebra (Ag), przez 30 min i 60 min w różnych stężeniach 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ oraz ich buforem. Wszystkie próby zostały podzielone na komórki prawidłowe oraz wykazujące pyroptozę. Wśród komórek inkubowanych z nanocząstkami srebra średni odsetek komórek pyroptotycznych wahał się od $4,64 \pm 1,47$ w przypadku monocytów inkubowanych przez 30 min w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ do $6,37 \pm 2,99$ inkubowanych przez 60 min w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$. Z kolei w próbce z buforem średni odsetek komórek pyroptotycznych wyniósł $7,15 \pm 4,00$. Dokonano porównywań parami, w każdej z par obecne były komórki prawidłowe oraz wykazujące pyroptozę tego samego typu. We wszystkich analizowanych parach, różnica między odsetkiem komórek prawidłowych a wykazujących pyroptozę była statystycznie istotna. Również dla każdej z par istotnie wyższy poziom wskaźnika był osiągany komórek prawidłowych, **tabela 42**.

Wykonano 22 powtórzenia badań, przy użyciu 22 próbek krwi.

Do dalszej analizy wybrano komórki wykazujące pyroptozę.

Tabela 42. Próbki inkubowane z nanocząstkami srebra oraz próba z buforem, w podziale na komórki prawidłowe (P) oraz wykazujące pyroptozę (PYR) - odsetek komórek prawidłowych (P) / wykazujących pyroptozę (PYR).

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Ag / 20 / 60 / P	22	94,63	2,48	94,58	89,65	99,67	76,5	17	<0,001
Ag / 20 / 60 / PYR	22	5,37	2,48	5,42	0,33	10,35			
Ag / 100 / 60 / P	22	93,63	2,99	94,07	87,34	99,36	61,9	17	<0,001
Ag / 100 / 60 / PYR	22	6,37	2,99	5,94	0,64	12,66			
Ag / 200 / 60 / P	22	95,01	1,34	95,38	91,86	96,70	142,0	17	<0,001
Ag / 200 / 60 / PYR	22	4,98	1,35	4,62	3,30	8,14			
Ag / 20 / 30 P	22	95,36	1,47	95,28	91,27	98,18	131,2	17	<0,001
Ag / 20 / 30 / PYR	22	4,64	1,47	4,72	1,82	8,73			
Ag / 100 / 30 / P	22	94,39	2,38	94,77	90,27	97,87	79,0	17	<0,001
Ag / 100 / 30 / PYR	22	5,61	2,38	5,24	2,13	9,73			
Ag / 200 / 30 / P	22	94,35	2,57	95,44	87,90	97,77	73,2	17	<0,001
Ag / 200 / 30 / PYR	22	5,65	2,57	4,56	2,23	12,09			
Ag bufor P	22	92,85	4,00	91,18	87,88	100,00	45,4	17	<0,001
Ag bufor PYR	22	7,15	4,00	8,82	0,00	12,13			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.2. Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę zawierających bufor z komórkami zawierającymi nanocząstki srebra

Porównano odsetki komórek wykazujących pyroptozę w próbkach granulocytów inkubowanych z nanocząstkami srebra z próbą kontrolną zawierającą bufor. Wykorzystano dwa czasy inkubacji (30 min lub 60 min) oraz stężenie nanocząstek: 20, 100, 200 µg/ml. Średni udział komórek pyroptotycznych w próbie kontrolnej wyniósł $7,15 \pm 4,00$. Natomiast po inkubacji z nanocząstkami srebra, odsetek ten wahał się między $4,64 \pm 1,47$ w stężeniu 20 µg/ml oraz czasie inkubacji 30 min do $6,37 \pm 2,99$ w stężeniu 100 µg/ml oraz czasie inkubacji 60 min. Różnica pomiędzy krwią po inkubacji z nanocząstkami srebra a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie w przypadku stężenia 20 µg/ml i czasu inkubacji 30 min oraz stężenia 200 µg/ml i czasu inkubacji 60 min. W obu przypadkach niższą wartość odsetkową komórek wykazujących pyroptozę zanotowano w przypadku próbek po inkubacji z nanocząstkami ($4,64 \pm 1,47$ vs. $7,15 \pm 4,00$ w próbie kontrolnej vs. w stężeniu 20 µg/ml i czasie inkubacji 30 min oraz $4,98 \pm 1,35$ vs. $7,15 \pm 4,00$ w próbie kontrolnej vs. o stężeniu 200 µg/ml i czasie inkubacji 60 min). W przypadku pozostałych porównań, próba kontrolna nie okazała się być istotnie różna od próbek po inkubacji, **tabela 43**.

Tabela 43. Statystyki opisowe dla odsetka komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z nanocząstkami srebra i ich analiza względem próby kontrolnej.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml / czas inkubacji, min)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	t	df	p
Ag / 20 / 30	22	4,64	1,47	4,72	1,82	8,73	-2,93	17	0,009
Bufor do Ag	22	7,15	4,00	8,82	0,00	12,13			
Ag / 100 / 30	22	5,61	2,38	5,24	2,13	9,73	-1,49	17	0,154
Bufor do Ag	22	7,15	4,00	8,82	0,00	12,13			
Ag / 200 / 30	22	5,65	2,57	4,56	2,23	12,09	-1,63	17	0,123
Bufor do Ag	22	7,15	4,00	8,82	0,00	12,13			
Ag / 20 / 60	22	5,37	2,48	5,42	0,33	10,35	-1,70	17	0,106
Bufor do Ag	22	7,15	4,00	8,82	0,00	12,13			
Ag / 100 / 60	22	6,37	2,99	5,94	0,64	12,66	-0,78	17	0,444
Bufor do Ag	22	7,15	4,00	8,82	0,00	12,13			
Ag / 200 / 60	22	4,98	1,35	4,62	3,30	8,14	-2,76	17	0,013
Bufor do Ag	22	7,15	4,00	8,82	0,00	12,13			

t – wartość statystyki testowej testu t dla prób zależnych, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

1.3. Porównanie w obrębie komórek wykazujących pyroptozę inkubowanych z nanocząstkami srebra z zastosowaniem różnych zmiennych, tj. stężenia i czasu inkubacji

Nie wykazano różnicy istotnej statystycznie pomiędzy komórkami wykazującymi pyroptozę z uwzględnieniem wykorzystanego typu nanocząstek srebra, stężenia (20, 100, 200 µg/ml), czasu inkubacji (30 lub 60 minut).

III. Określenie stężenia interleukiny-1 β

Celem kolejnej części analizy była weryfikacja zróżnicowania stężenia interleukiny-1 beta (IL-1 β) w próbkach krwi inkubowanych przez 24 godziny pomiędzy zastosowanymi stężeniami nanocząstek dodanych do krwi przy inkubacji, jak również pomiędzy typami nanocząstek oraz między badanymi próbkami a ich buforami. Stężenie interleukiny-1 beta było mierzone w pikogramach/mililitr (pg/ml).

Wykonano 12 powtórzeń badań, przy użyciu 12 próbek krwi.

A. Komórki inkubowane z nanocząstkami złota

1. Porównanie w obrębie komórek zawierających bufor z komórkami zawierającymi nanocząstki złota

1.1. Porównanie stężenia IL-1 β w próbkach krwi inkubowanych przez 24 godziny z Au3 vs. próba kontrolna

Porównano stężenie interleukiny-1 β w próbkach krwi inkubowanych przez 24 godziny z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) z próbą kontrolną zawierającą bufor. Użyto trzy stężenia dodawanych kulistych nanocząstek złota 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$. Średnie stężenie interleukiny-1 beta w próbce kontrolnej wyniosło $22,55 \pm 1,73$ pg/ml. Natomiast po inkubacji z nanocząstkami wartość ta wyniosła $21,79 \pm 1,57$ pg/ml w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, $22,90 \pm 1,24$ pg/ml w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ oraz $23,38 \pm 1,05$ pg/ml w stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$. Różnica pomiędzy krwią po inkubacji z nanocząstkami a próbą kontrolną okazała się być nieistotna statystycznie w każdym z trzech badanych przypadków, **tabela 44**.

Tabela 44. Statystyki opisowe dla stężenia interleukiny-1 beta (pg/ml) w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 i ich porównanie do próby kontrolnej.

Próbka (nanocząstka / stężenie, $\mu\text{g/ml}$)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Au3 / 20	12	22,90	1,24	22,80	21,40	24,90	0,59	0,556
Bufor do Au3	12	22,55	1,73	22,20	20,10	25,00		
Au3 / 100	12	21,79	1,57	21,30	18,80	24,40	0,90	0,367
Bufor do Au3	12	22,55	1,73	22,20	20,10	25,00		
Au3 / 200	12	23,38	1,05	23,65	21,10	24,50	1,41	0,158
Bufor do Au3	12	22,55	1,73	22,20	20,10	25,00		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa.

1.2. Porównanie stężenia IL-1 β w próbkach krwi inkubowanych przez 24 godziny z Au6 vs. próba kontrolna

Porównano stężenie interleukiny-1 β w próbkach krwi inkubowanych przez 24 godziny z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) z próbą kontrolną zawierającą bufor. Użyto trzy stężenia dodawanych prętopodobnych nanocząstek złota (Au6) 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$. Średnie stężenie interleukiny-1 beta w próbce kontrolnej wyniosło $22,43 \pm 1,21$ pg/ml. Natomiast po inkubacji z nanocząstkami wartość ta wyniosła $23,17 \pm 1,16$ pg/ml w stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$, $23,36 \pm 1,57$ pg/ml w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ oraz $22,58 \pm 1,84$ pg/ml w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$. Różnica pomiędzy krwią po inkubacji z nanocząstkami a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie dla próbki o stężeniu nanocząstek 100 $\mu\text{g/ml}$, w tym przypadku poziom stężenia interleukiny był wyższy w próbce inkubowanej z nanocząstkami złota. W pozostałych dwóch przypadkach badane próbki nie były statystycznie różne od buforu, **tabela 45**.

Tabela 45. Statystyki opisowe dla stężenia interleukiny-1 β (pg/ml) w próbkach inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 i ich porównanie do próby kontrolnej.

Próbka (nanocząstka / stężenie, $\mu\text{g/ml}$)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Au6 / 20	12	22,58	1,84	22,75	20,10	25,80	0,55	0,583
Bufor do Au6	12	22,43	1,21	22,65	20,70	24,10		
Au6 / 100	12	23,36	1,57	23,05	20,80	25,70	2,00	0,045
Bufor do Au6	12	22,43	1,21	22,65	20,70	24,10		
Au6 / 200	12	23,17	1,16	23,15	21,30	25,10	1,73	0,084
Bufor do Au6	12	22,43	1,21	22,65	20,70	24,10		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$)

2. Porównanie w obrębie komórek z zastosowaniem różnych stężeń nanocząstek złota i inkubacji 24-godzinnej

Porównano stężenie interleukiny-1 β w próbkach krwi inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota (Au3) w zależności od stężenia 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$. Średnie stężenie interleukiny-1 beta wyniosło $21,79 \pm 1,57$ pg/ml w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, $22,90 \pm 1,24$ pg/ml w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ oraz $23,38 \pm 1,05$ pg/ml w stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$. Różnica pomiędzy krwią po inkubacji z nanocząstkami względem stężenia nanocząstek okazała się być istotna statystycznie, przy czym najwyższy poziom stężenia interleukiny-1 beta miał miejsce w próbce ze stężeniem 200 $\mu\text{g/ml}$, **tabela 46**.

Tabela 46. Statystyki opisowe dla stężenia interleukiny-1 β (pg/ml) w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 i ich analiza względem stężenia nanocząstek.

Próbka (nanocząstka / stężenie, $\mu\text{g/ml}$)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	χ^2	df	p
Au3 / 20	12	22,90	1,24	22,80	21,40	24,90	8,17	2	0,017
Au3 / 100	12	21,79	1,57	21,30	18,80	24,40			
Au3 / 200	12	23,38	1,05	23,65	21,10	24,50			

χ^2 – wartość statystyki testowej testu ANOVA Friedmana, df – liczba stopni swobody, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

Różnica pomiędzy stężeniami (20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) prętopodobnych nanocząstek złota inkubowanych z krwią przez 24 godziny okazała się być nieistotna statystycznie.

3. Porównanie prób ze względu na typ nanocząstek złota w różnym stężeniu i 24-godzinnej inkubacji

3.1. Próbka Au3 vs. Au6 w stężeniu 20 lub 200 $\mu\text{g/ml}$ i 24-godzinnej inkubacji

Porównano stężenie interleukiny-1 β w próbkach krwi inkubowanych z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au3 i Au6) w stężeniu 20 lub 200 $\mu\text{g/ml}$. Średnie stężenie interleukiny-1 beta wyniosło $22,58 \pm 1,84$ pg/ml dla prętopodobnych nanocząstek złota (Au6) oraz $22,90 \pm 1,24$ pg/ml dla kulistych nanocząstek złota (Au3). Różnica pomiędzy analizowanymi próbkami okazała się być nieistotna statystycznie.

3.2. Próbka Au3 vs. Au6 w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ i 24-godzinnej inkubacji

Porównano stężenie interleukiny-1 β w próbkach krwi inkubowanych z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au3 i Au6) w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$. Średnie stężenie interleukiny-1 beta wyniosło $21,79 \pm 1,57$ pg/ml dla kulistych nanocząstek złota (Au3) oraz $23,36 \pm 1,57$ pg/ml dla prętopodobnych nanocząstek złota (Au6). Różnica pomiędzy analizowanymi próbkami okazała się być istotna statystycznie a wyższe stężenie interleukiny-1 β zanotowano w przypadku próbki z dodatkiem prętopodobnych nanocząstek złota (Au6), **tabela 47**.

Tabela 47. Statystyki opisowe dla stężenia interleukiny-1 β (pg/ml) w próbkach inkubowanych z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota Au3 i Au6, przy stężeniu nanocząstek 100 $\mu\text{g/ml}$.

Próbka (nanocząstka / stężenie, µg/ml)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Au3 / 100	12	21,79	1,57	21,30	18,80	24,40	2,75	0,006
Au6 / 100	12	23,36	1,57	23,05	20,80	25,70		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

B. Komórki inkubowane z nanocząstkami srebra

1. Porównanie próbek zawierających bufor z zawierającymi nanocząstkami srebra

Porównano stężenie interleukiny-1 β w próbkach krwi inkubowanych przez 24 godziny z nanocząstkami srebra (Ag) z próbą kontrolną zawierającą bufor. Użyto trzy stężenia dodawanych nanocząstek srebra 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$. Średnie stężenie interleukiny-1 beta w próbce kontrolnej wyniosło $24,41 \pm 2,86$ pg/ml. Natomiast po inkubacji z nanocząstkami srebra wartość wyniosła $20,54 \pm 3,56$ pg/ml w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, $21,18 \pm 4,05$ pg/ml w stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$ oraz $21,77 \pm 2,89$ pg/ml w stężeniu nanocząstek 20 $\mu\text{g/ml}$. Różnica pomiędzy krwią po inkubacji z nanocząstkami a próbą kontrolną okazała się być istotna statystycznie w każdym z trzech badanych przypadków w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 200 $\mu\text{g/ml}$). Również we wszystkich przypadkach próba kontrolna wykazała wyższe stężenie interleukiny-1 β niż próbka inkubowana z nanocząstkami srebra, **tabela 48**.

Tabela 48. Statystyki opisowe dla stężenia interleukiny-1 β (pg/ml) w próbkach inkubowanych z nanocząstkami srebra Ag i ich analiza vs. próba kontrolna.

Próbka (nanocząstka / stężenie, $\mu\text{g/ml}$)	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	Z	p
Ag / 20	12	21,77	2,89	22,65	16,20	24,80	2,35	0,019
Bufor do Ag	12	24,41	2,86	24,80	19,00	31,00		
Ag / 100	12	20,54	3,56	21,70	15,30	24,20	2,27	0,023
Bufor do Ag	12	24,41	2,86	24,80	19,00	31,00		
Ag / 200	12	21,18	4,05	22,95	15,70	25,40	2,16	0,031
Bufor do Ag	12	24,41	2,86	24,80	19,00	31,00		

Z – wartość statystyki testowej testu kolejności par Wilcoxona, p - poziom prawdopodobieństwa. Na zielono zaznaczono istotny statystycznie wynik ($p < 0,05$).

2. Porównanie próbek inkubowanych przez 24 godziny z nanocząstkami srebra w różnych stężeniach

Porównano stężenie interleukiny-1 β w próbkach krwi inkubowanych przez 24 godziny z nanocząstkami srebra (Ag) w zależności od stężenia 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$. Średnie stężenie interleukiny-1 beta w próbkach po inkubacji z nanocząstkami srebra wyniosło $20,54 \pm 3,56$ pg/ml w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$, $21,18 \pm 4,05$ pg/ml w stężeniu 200 $\mu\text{g/ml}$ oraz $21,77 \pm 2,89$ pg/ml w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$. Różnica pomiędzy krwią po inkubacji z nanocząstkami względem stężenia nanocząstek okazała się być nieistotna statystycznie.

Dyskusja

1. Funkcjonalizacja powierzchni nanocząstek

Powlekanie nanocząstek materiałami polimerowymi spowalnia rozpuszczanie jonów z powierzchni nanocząstek, a także wpływa na ich właściwości interakcji z komórką [75,111–113].

PEG (tiomonometylowy glikol polietylenowy) jest substancją bardzo słabo immunogenną, dzięki czemu nadaje się do opracowywania koniugatów PEG-białko jako leków. Nanocząstki można pokryć warstwą samego PEG lub PEG w połączeniu z innymi cząsteczkami, takimi jak biotyna, peptydy lub oligonukleotydy, aby pomóc we wnikięciu AuNP do komórek docelowych. Ze względu na ich zdolność do wiązania błon komórkowych sfunkcjonalizowane AuNP mogą służyć, jako dobre nośniki leków [111].

Tego typu AuNP używane są, jako nośniki nanoleków, ze względu na ich biogodność uzyskaną poprzez stabilizację nanocząstek i bezpieczeństwo biologiczne [114].

W badaniach własnych zastosowano kuliste i prętopodobne nanocząstki złota stabilizowane przez PEG.

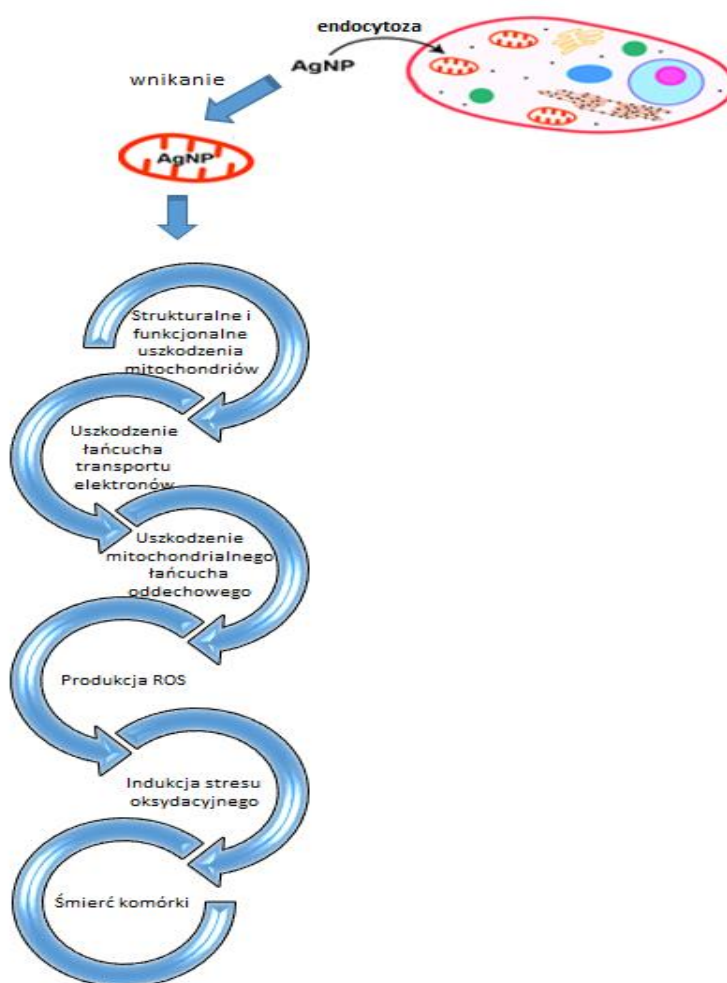
W kilku badaniach stwierdzono, że funkcjonalizacja powierzchni AuNP glikolem polietylenowym zmniejsza stres oksydacyjny. Następuje to dzięki unikalnym właściwościom, np. wyższej biogodności i dłuższemu czasowi krążenia we krwi, wpływającemu na poprawę okresu półtrwania nanobiomateriałów we krwi [78,112,113,115,116].

2. Produkcja ROS

Utleniacze i wolne rodniki znajdujące się na powierzchni cząstek mogą bezpośrednio wytwarzać reaktywne formy tlenu. Dodatkowo adsorpcja otaczających cząstek stałych, takich jak ozon i tlenek azotu, na powierzchni nanocząstek wpływa na indukcję stresu oksydacyjnego [2,117]. Przy niskim stężeniu nanocząstek, komórki przez działanie przeciwutleniaczy są zdolne do obrony przed stresem oksydacyjnym i przywrócenia równowagi redoks. Natomiast przy wyższym stężeniu nie jest to możliwe, co prowadzi do cytotoksyczności komórek oraz wywołania stanu zapalnego [2,12,57,118–125]. Zaobserwowano także wzrost cytotoksyczności nanocząstek związany z wytwarzaniem reaktywnych form tlenu [57,59,118,122,126,127].

2.1. Nanocząstki srebra

Po wnikięciu do wnętrza komórki AgNP ulegają wewnątrzkomórkowej degradacji, uwalniając jony Ag^+ , które upośledzają funkcje mitochondriów. ROS gromadząc się jako produkty uboczne łańcucha transportu elektronów powodują jego uszkodzenie, a w dalszej kolejności upośledzenie funkcji mitochondriów, depolaryzację błony mitochondrialnej, uszkodzenie mtDNA (DNA mitochondrialny), peroksydację lipidów i elementów białek, co prowadzi do śmierci komórki (**ryc. 20**) [57,59,118,120,122–126,128].



Ryc. 20. Możliwy mechanizm śmierci komórki indukowany przez nanocząstki srebra, źródło własne.

Nagromadzenie AgNP na błonie komórkowej powoduje naruszenie integralności dwuwarstwy i pojawienie się pęknięć. Penetracja AgNP bezpośrednio do komórki i interakcja ze składnikami komórki ostatecznie prowadzi do śmierci komórki. W licznych publikacjach opisano wpływ nanocząstek srebra na tworzenie wiązań dwusiarczkowych w reakcji pomiędzy tlenem w komórkach i atomami wodoru grup

tiolowych. Wiązania dwusiarczkowe są odpowiedzialne za zmianę kształtu i struktury enzymów komórkowych, wpływając na ich funkcję. Prowadzi to dezaktywacji enzymów oddechowych, generowania reaktywnych form tlenu i wywołania komórkowego stresu oksydacyjnego u drobnoustrojów. ROS utleniają podwójne wiązania kwasów tłuszczowych w błonie, co pozwala na generowanie innych wolnych rodników uszkadzających błonę komórkową [129].

Metodami używanymi do oceny indukcji ROS są m.in. metody fluorescencyjne, chemiluminescencyjne i chromatograficzne. Najczęściej stosowane są techniki z użyciem barwników fluorescencyjnych, potwierdza to wykorzystanie m.in. 2'7'-dichlorofluoresceiny w badaniach nad wieloma rodzajami komórek, m.in. fibroblastów płucnych, trzustki, makrofagów, wątroby, jajnika, raka skóry czy glejaka [57,59,64,118–121,126,127,130–134]. Przy użyciu dihydrorodaminy 123 w teście Phagoburst oceniano produkcję H₂O₂ przez fagocyty [66,135,136]. Stosuje się także dihydroetydynę (DHE, ang. dihydroethidium) w badaniach fibroblastów płucnych, komórek śródbłonna czy komórek nerwowych [57,60,137].

W badaniach własnych zaobserwowano bardzo małe różnice w wartościach średniej intensywności fluorescencji rodaminy, zarówno granulocytów, jak i monocytów, między wszystkimi próbami inkubowanymi z nanocząstkami srebra, w porównaniu do próby kontrolnej. Wśród analizowanych prób wyniki badań własnych nie wykazały różnic istotnych statystycznie w porównaniu z próbą kontrolną.

Wyniki badań własnych nie potwierdziły wzrostu produkcji reaktywnych form tlenu po inkubacji z nanocząstkami srebra, jaki opisano w literaturze.

W licznych badaniach obserwowano wpływ wzrostu stężenia AgNP na różnego rodzaju komórki (**tabela 49**).

Tabela 49 Zestawienie oddziaływania nanocząstek srebra na różnego typu linie komórkowe.

Badany parametr nanocząstek	Typ komórek			Efekt
	Ludzkie komórki prawidłowe	Ludzkie komórki nowotworowe	Zwierzęce	
Wzrost stężenia AgNP	IMR-90 [57]; human Chang liver cells	U251 [57]; Hep G2 [122,126]; HT-1080, A431	CHO [118]; J774.1 [122]; RAW264.7	Spadek żywotności komórek

	[120]; CRL-4023 [59]	[123]; A549 [119]; CRL-1469 [59]; A498 [122]	[122,124]; BREC [125]; Neuro-2A [122]	i wzrost apoptozy, zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu
--	-------------------------	---	--	---

linia komórkowa ludzkich fibroblastów płucnych (IMR-90, ang. normal human lung fibroblast cells; ludzka linia komórkowa niedrobnokomórkowego raka płuca (A549, ang. human lung carcinoma epithelial cells); ludzka linia komórkowa raka nerki (A498, ang. human renal cell carcinoma cells); komórki mysiej linii neuroblastoma (Neuro-2A, ang. mouse neuroblastoma cell line); ludzka linia komórek wątroby Chang (ang. human Chang liver cells); ludzka linia komórkowa glejaka (U251, ang. human glioblastoma cells); komórki ludzkiego nowotworu wątroby (HepG2, ang. human hepatocellular carcinoma cells); ludzka linia komórkowa włókniakomięsa (HT-1080, ang. human fibrosarcoma); ludzka linia komórkowa nowotworu skóry (A431, ang. human skin carcinoma); ludzka linia komórkowa niedrobnokomórkowego raka płuca (A549, ang. human lung carcinoma epithelial cells); linia komórkowa uniesmiertnionych komórek jajnika chomika chińskiego (CHO, ang. Chinese hamster ovary cells); linia komórkowa mysich makrofagów monocytowych (RAW264.7, ang. mouse macrophage cell line); linia komórkowa mysich makrofagów (J774.1, ang. mouse macrophage cell line); pierwotne komórki śródbłónki siatkówki bydła (BREC, ang. primary bovine retinal endothelial cells); uniesmiertniona ludzka linia komórek nabłonka przewodu trzustkowego (CRL-4023, ang. immortalized human pancreas duct epithelial cell line hTERT-HPNE); linia komórek ludzkiego nowotworu trzustki (CRL-1469, ang. human pancreatic ductal carcinoma PANC-1).

W badaniach na monocytach krwi obwodowej potwierdzono wzrost produkcji nadtlenu wodoru pod wpływem 40-minutowej inkubacji z 5 i 28 nm nanocząstkami srebra, w stężeniach 0.9 i 1.15 $\mu\text{g/ml}$ [81].

Również w badaniach na ludzkiej linii embrionalnych komórek nabłonkowych wykazano wzrost produkcji ROS po inkubacji z AgNP o średnicy 20 nm, w stężeniu 1, 5 i 25 $\mu\text{g/ml}$ przez 30 minut [138].

W badaniach na ludzkich neutrofilach wykazano wzrost średniej intensywności fluorescencji rodaminy 123 dla próbek inkubowanych przez 2 godziny z nanocząstkami srebra powleczonych cytrynianem, o wielkości 5 i 10 nm, w sposób zależny od stężenia (12.5, 25 i 50 $\mu\text{g/ml}$). Wyższą reaktywność wykazały najmniejsze nanocząstki srebra. Z kolei 50 nm AgNP nie spowodowały wzrostu produkcji ROS [135].

Po inkubacji z niepowleczonymi AgNP o wielkości 20 i 40 nm w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$, z linią komórkową mysich makrofagów (J774.1, ang. mouse macrophage cell line) obserwowano niewielkie zwiększenie intensywności fluorescencji wynikającej

z utlenienia DHE w porównaniu z kontrolami. Wskazuje to na niewielkie wytwarzanie ROS pod wpływem inkubacji komórek z AgNP [137].

Zespół Shrivastava i wsp. do eksperymentu wykorzystał krew oraz tkanki pochodzące z mózgu, wątroby, nerek i śledziony samców myszy albinosów szwajcarskich (ang. Swiss albino mice), inkubowane z nanocząstkami srebra i złota, o wielkości 20 nm, w stężeniu 1 i 2 $\mu\text{M/kg}$. AgNP i AuNP były podawane myszom dożołądkowo przez 14 dni. Ilość reaktywnych form tlenu została zbadana poprzez analizę poziomu fluorescencji diocetanu 2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny (DCF-DA, ang. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate), we krwi i tkankach mysich. Wartość średniej intensywności fluorescencji wzrosła po inkubacji krwi oraz tkanek miękkich z nanocząstkami w obu dawkach w porównaniu z kontrolą. Największą różnicę odnotowano po zastosowaniu AgNP w dawce 2 μM , co wskazuje na zwiększoną generację ROS. Zastosowanie nanocząstek wpłynęło toksycznie na komórki, poprzez indukcję stanu zapalnego i zwiększone uwalnianie ROS wynikające ze stresu oksydacyjnego. Wykazano także bardziej wyraźne negatywne skutki przy zastosowaniu nanocząstek srebra, zwłaszcza w większej dawce [121].

2.2. Nanocząstki złota

W badania własnych stwierdzono bardzo małe różnice w wartościach średniej intensywności fluorescencji rodaminie zarówno granulocytów, jak i monocytów, między wszystkimi próbami inkubowanymi z nanocząstkami złota, w porównaniu do próby kontrolnej. Dla kulistych nanocząstek złota obserwowano wprost proporcjonalną zależność wyniku od stężenia tj. najwyższe wartości średniej intensywności fluorescencji występowały dla najwyższego stężenia. Przy prętopodobnych nanocząstkach złota nie obserwowano takiej zależności.

Wśród analizowanych prób, wyniki badań własnych wykazały różnice istotne statystycznie dla prób inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota przez 30 minut w stężeniu 20 i 200 $\mu\text{g/ml}$ w porównaniu z próbą kontrolną. Wśród analizowanych prób z prętopodobnymi nanocząstkami złota wyniki badań własnych nie wykazały różnic istotnych statystycznie w porównaniu z próbą kontrolną. W badaniach własnych, w przeciwieństwie do doniesień literaturowych nie wykazano znaczącego wzrostu fluorescencji rodaminie i związanego z tym zwiększonej produkcji ROS w próbach inkubowanych z nanocząstkami złota.

Zespół Zhang i wsp. w badaniach wykorzystał nanocząstki sfunkcjonalizowane przy użyciu PEG. Badania były prowadzone na komórkach ludzkiej linii neuroblastoma SH-

SY5Y (ang. human neuroblastoma), poddawanej inkubacji z nanocząstkami złota o wielkości: 4.5, 13, 30 nm i stężeniu 25 µg/ml przez 24 godziny. Wykazano, że nanocząstki złota o wielkości 4.5 nm uzyskały większą toksyczność niż nanocząstki o innych rozmiarach. Obserwowano także u nich 6-krotnie większy poziom generowania ROS w porównaniu do kontroli. Poprzez zwiększony sygnał zielonej fluorescencji DCFH-DA, potwierdzono uszkodzenie mitochondriów w komórkach inkubowanych z nanocząstkami złota [114].

24 godzinna inkubacja makrofagów z linii komórek RAW264.7 z AuNP powleczonych cytrynianem o wielkości 5 i 50 nm nie wykazała zwiększonej produkcji ROS [139].

3. Wybuch oddechowy stymulowany PMA

Wybuch oddechowy został zbadany poprzez zmierzenie fluorescencji rodaminy po dodaniu do komórek 12-myristynian, 13-octan forbolu (PMA) [103,140].

Do aktywacji granulocytów i monocytów wykorzystano PMA, który stymuluje wytwarzanie ROS poprzez bezpośrednią aktywację kinazy białkowej C (PKC, ang. protein kinase C) i systemu zespołu oksydazy fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH, ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) odpowiedzialnego za wybuch oksydacyjny w neutrofilach [141,142]. PMA jest także wyzwalaczem powstawania zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych (NET, ang. neutrophil extracellular traps), których powstanie można zmierzyć przez wykrywanie zewnątrzkomórkowego DNA za pomocą płynu barwiącego DNA [141].

Po aktywacji neutrofili integralność błon ziarnistych zostaje utracona. W konsekwencji elastaza neutrofili (NE, ang. neutrophil elastase) i mieloperoksydaza (MPO, ang. myeloperoxidase) przemieszczają się do jądra, gdzie przyczyniają się odpowiednio do degradacji histonów i dekondensacji chromatyny. Reaktywne formy tlenu przyczyniają się do uwalniania NE i MPO z ziarnistości i ich przemieszczania się do jądra, a następnie prawdopodobnie do rozerwania błony komórkowej. Uwolnione DNA jest następnie otaczane przez NE i MPO. Potwierdzono, że poza patogenami, inne bodźce m.in. cytokiny oraz PMA mogą wywoływać powstawanie zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych [143].

Zespół oksydazy NADPH, będący wielobiałkowym kompleksem oksydazy pozostaje w komórkach w stanie spoczynku, gdzie jego składniki są segregowane do cytozolu. W odpowiedzi na stymulację składniki te szybko gromadzą się w błonach

komórkowych, a enzym zostaje aktywowany. Dzięki temu może katalizować zależną od NADPH redukcję O_2 z wytworzeniem reaktywnych form tlenu np. anionów ponadtlenkowych ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenku wodoru (H_2O_2), rodnika hydroksylowego ($OH^{\cdot}$), a także kwasu podchlorawego ($HClO$). Proces ten zwany wybuchem oddechowym (oksydacyjnym) odgrywa ważną rolę w odporności na atakujące drobnoustroje [144,145].

Stymulacja komórek z wykorzystaniem PMA powodowała zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu przez granulocyty i monocyty i wyższą fluorescencję barwnika fluorescencyjnego. Efekt ten uzyskany podczas badań własnych został potwierdzony również w licznych publikacjach i jest zgodny z instrukcją producenta testu Phagoburst [103,109,140,145,146].

3.1. Nanocząstki srebra

W badaniach własnych wystąpiły duże wzrosty w wartościach średniej intensywności fluorescencji rodaminu po dodaniu PMA, głównie w granulocytach. Jest to zgodne z danymi literaturowymi. Obserwowano także różnice między wszystkimi próbami granulocytów, w porównaniu do próby kontrolnej. Wszystkie próby granulocytów inkubowanych z nanocząstkami srebra wykazały niewielką tendencję spadkową. Największy spadek średniej intensywności fluorescencji granulocytów w porównaniu z próbą kontrolną występował w próbach inkubowanych przez 60 minut z nanocząstkami srebra w stężeniu $20 \mu g/ml$.

Wśród analizowanych prób granulocytów wyniki badań własnych wykazały różnice istotne statystycznie jedynie dla prób inkubowanych przez 60 min z nanocząstkami srebra o stężeniu $20 \mu g/ml$ w porównaniu z próbą kontrolną. W monocytach wystąpiły niewielkie różnice w porównaniu z próbą kontrolną. Wśród monocytów inkubowanych przez 30 i 60 minut z AgNP obserwowano niewielki spadek średniej intensywności fluorescencji dla prób w stężeniu 100 i $200 \mu g/ml$ w porównaniu z próbą kontrolną. Nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie.

Wystąpienie niewielkich różnic w wartościach średniej intensywności fluorescencji prób inkubowanych z nanocząstkami srebra jest zgodne z wynikami dostępnymi w przeglądzie literatury.

W badaniach Poirier i wsp. na ludzkich neutrofilach inkubowanych przez 60 minut z nanocząstkami srebra o średnicy 20 i 70 nm w stężeniu 10 i $100 \mu g/ml$ nie wykazali zwiększenia wytwarzania ROS pod wpływem AgNP. Ponadto potwierdzono, że PMA szybko indukuje wytwarzanie ROS przez komórki [147].

Zespół Soares i wsp. inkubował neutrofile z AgNP w stężeniu 50, 75, 100 µg/ml, o wielkości 10 i 50 nm przez 4 godziny wraz z PMA. Większe nanocząstki nie indukowały wytwarzania ROS. Natomiast inkubacja komórek z AgNP w rozmiarze 10 nm skutkowała utlenieniem DHR w sposób zależny od stężenia. Obserwowane wytwarzanie reaktywnych form było zależne od oksydazy NADPH [136].

Zespół Haase i wsp. badał granulocyty i monocyty wyizolowane z heparynizowanej krwi pełnej zdrowych dawców poddane 15 minutowej inkubacji AgNP w stężeniu 10 µM, o wielkości 2.0, 3.4, 5.7, 15.4, 34.7 nm z dodaniem PMA. Nie zaobserwowano wpływu AgNP na wybuch oddechowy. Potwierdzono natomiast skuteczność w indukowaniu tworzenia zewnątrzkomórkowych pułapek neutrofilowych przez AgNP [141].

3.2. Nanocząstki złota

W badaniach własnych obserwowano duży wzrost średniej intensywności fluorescencji rodaminy po dodaniu PMA, głównie w granulocytach. Wystąpiły także tendencje wzrostowe wybuchu oddechowego między wszystkimi próbami inkubowanymi z Au³, w porównaniu do próby kontrolnej.

Największy wzrost średniej intensywności fluorescencji granulocytów w porównaniu z próbą kontrolną występował w próbach inkubowanych przez 30 minut z kulistymi nanocząstkami złota w stężeniu 100 i 200 µg/ml, a także przy stężeniu 200 µg/ml i czasie inkubacji 60 min.

Wśród analizowanych prób wyniki badań własnych wykazały różnice istotne statystycznie dla prób inkubowanych z Au³ przez 30 minut w stężeniu 100 i 200 µg/ml, a także 100 i 200 µg/ml, przy inkubacji 60-minutowej w porównaniu z próbą kontrolną. Wśród monocytów również obserwowano mniejszy wzrost średniej intensywności fluorescencji w próbach inkubowanych z Au³, w porównaniu z próbami kontrolnymi. Najwyższa różnica wystąpiła dla stężenia 100 µg/ml i czasu inkubacji 60 min. Nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie.

Obserwowano także wzrost średniej intensywności fluorescencji granulocytów w próbach inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota. Największy wzrost w porównaniu z próbą kontrolną występował przy stężeniu 100 µg/ml i czasie inkubacji 60 min.

Spośród analizowanych prób wyniki badań własnych wykazały różnice istotne statystycznie w porównaniu z próbą kontrolną tylko dla stężenia 100 µg/ml i czasu inkubacji 60 min. W monocytach obserwowano niewielki wpływ inkubacji

z prętopodobnymi nanocząstkami złota. Nie wykazano również różnic istotnych statystycznie.

W przeciwieństwie do danych literaturowych, nie zaobserwowano hamowania wybuchu oddechowego przez nanocząstki złota.

Ludzkie komórki śródbłónka żyły pępowinowej (ang. human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) i linia komórkowa mysich makrofagów monocytowych (RAW264.7) była inkubowana przez 6 godzin z AuNP powleczonymi PEG w stężeniach 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$, o wielkości 8.9 nm. Wytwarzanie ROS obserwowano dopiero po traktowaniu HUVEC przez PMA we wszystkich stężeniach AuNP. Traktowanie AuNP linii makrofagów RAW264.7 nie wywołało wzrostu produkcji ROS [112].

Podczas badań na ludzkich granulocytach obojętnochłonnych inkubowanych przez 2 godziny z AuNP o wielkości 20 nm, ustalono, że wytwarzanie ROS indukowane przez PMA było hamowane przez AuNP [113].

Komórki linii komórkowej RAW264.7 inkubowane przez 5 godzin z AuNP powleczonymi cytrynianem, w stężeniu 1 mg/ml, o wielkości 5 nm, wykazały mniejszą fluorescencję DCF w porównaniu z próbą bez nanocząstek. Po stymulacji PMA nastąpiło znaczące wzmocnienie fluorescencji przy obu typach AuNP. Wywołane było to przez powstanie nadtlenku wodoru w wyniku wybuchu oddechowego. Nanocząstki złota mogą katalizować powstawanie nadtlenku wodoru w warunkach fizjologicznych, dzięki czemu wykazują właściwości przeciwutleniające. Badania na linii komórkowej RAW264.7 potwierdziły możliwość zapobiegania powstawaniu fluorescencji DCF przez inkubację komórek z AuNP. Wskazuje to na możliwość tłumienia przez nanocząstki wybuchu oddechowego stymulowanego przez PMA [53].

4. Ocena indukcji pyroptozy wywołanej inkubacją krwi z nanocząstkami srebra i złota

Stres oksydacyjny może powodować rozerwanie lizosomów i uwolnienie proteaz do cytozolu, prowadząc do proteolizy białek cytozolowych, która indukuje śmierć [148,149].

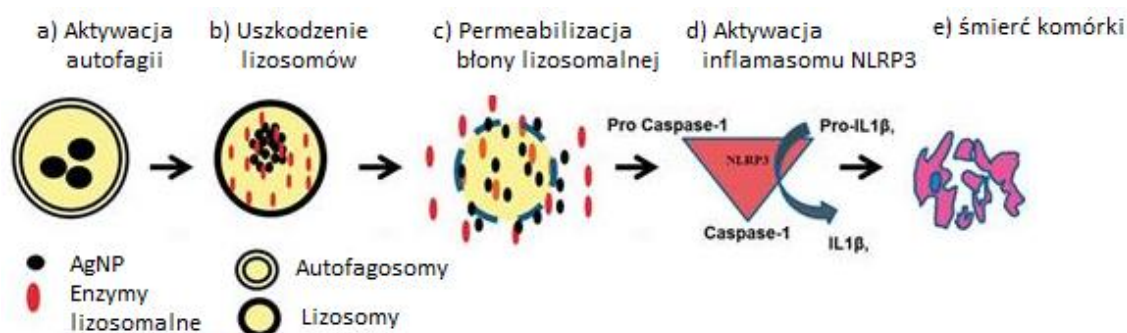
Zapalenie jest reakcją tkankową, w której mediatory są uwalniane w krótkim czasie do miejsca uszkodzenia tkanek. Mediatory prozapalne, takie jak cytokiny i chemokiny, są wytwarzane przez komórki układu immunologicznego w odpowiedzi na rozwijający się proces zapalny [102].

Kaspaza-1 jest najlepiej opisaną kaspazą zapalną. Indukuje dojrzewanie IL-1 β i IL-18 oraz pyroptotyczną śmierć komórek [148]. Pyroptoza prowadzi do uwolnienia zawartości cytozolowej poprzez tworzenie porów w błonie komórkowej, tym samym nasilając proces zapalny. Aktywacja kompleksu inflamasomu NLRP3 pośredniczy w aktywacji zapalnej kaspazy-1, która ma kluczowe znaczenie dla wydzielania dojrzałej IL-1 β i tworzenia porów w błonie komórkowej [70]. Reaktywne formy tlenu wytwarzane przez mitochondria również aktywują inflamasom NLRP3 [150].

4.1. Nanocząstki srebra

Nanocząstki srebra wywołują stres oksydacyjny poprzez hamowanie różnych procesów metabolicznych w komórce, zmianę ekspresji genów, wpływają także na produkcję ATP i blokowanie łańcucha oddechowego drobnoustrojów na poziomie oksydazy cytochromowej i dehydrogenazy NADH-bursztynianowej [129].

Nanocząstki srebra mogą wywołać stan aktywny immunologicznie. Indukują powstawanie inflamasomu i następnie aktywują kaspazę-1 (**ryc. 21**) [81].



Ryc. 21. Schemat potencjalnego mechanizmu śmierci komórkowej indukowanej AgNP, zmodyfikowany za: Mishra i wsp. (2016) [75].

a, b) AgNP są sekwestrowane w pęcherzykach dwubłonowych znanych jako autofagosomy, które przenoszą swoją zawartość do lizosomów. c) Niskie pH w pęcherzykach lizosomalnych ułatwia dysocjację i uwalnianie jonów Ag, co skutkuje permeabilizacją błony lizosomalnej. d) Uwalnianie enzymów lizosomalnych powoduje aktywację inflamasomu NLRP3, uwalnianie dehydrogenazy mleczanowej (LDH, ang. lactate dehydrogenase) i śmierć komórki. za: Mishra i wsp. (2016) [75].

Permeabilizacja błony lizosomalnej (LMP, ang. lysosomal membrane permeabilization) i aktywacja kaspazy-1 zależna od inflamasomu NLRP3 zostały zidentyfikowane jako mechanizm toksyczności indukowanej przez AgNP [74]. W miarę zmniejszania się wielkości cząstek, stosunek powierzchni do objętości i reaktywność powierzchni znacznie wzrastają [151].

Większość pochłoniętych przez komórki nanocząstek srebra została zinternalizowana w pęcherzykach cytozolowych i przetransportowana do lizosomów.

Ułatwia to uwolnienie jonów Ag^+ z AgNP [75]. Permeabilizacja błony lizosomalnej spowodowała zakwaszenie i uwalnianie enzymów litycznych do cytozolu, które jak wykazano indukują śmierć komórek poprzez aktywację kaspazy i sygnalizację prozapalną [152]. Wyniki te wskazują, że AgNP zwiększają aktywność lizosomów, stając się bardziej kwaśne po ekspozycji na nanocząstki srebra i sugerują, że AgNP są aktywnie transportowane do lizosomów przez autofagosomy [75].

W badaniach własnych we wszystkich próbach granulocytów oprócz stężenia 20 $\mu\text{g/ml}$ i czasie inkubacji 60 minut występował niewielki spadek odsetka komórek pyroptotycznych. Wskazuje to na hamowanie produkcji kaspazy-1 w porównaniu z próbą kontrolną. Obserwowano różnice istotne statystycznie dla prób inkubowanych przez 30 minut z Ag w stężeniu 20 i 100 $\mu\text{g/ml}$ w porównaniu z próbą kontrolną. W monocytach także obserwowano spadek odsetka komórek pyroptotycznych, w porównaniu z próbą kontrolną. Wykazano różnice istotne statystycznie w próbach inkubowanych przez 30 minut z Ag w stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ oraz 200 $\mu\text{g/ml}$ przez 60 min w porównaniu z próbą kontrolną.

Potwierdzono korelację pomiędzy spadkami aktywności kaspazy-1 i IL-1 β . Obserwowano spadek stężenia interleukiny-1 beta w porównaniu z próbą kontrolną przy 24-godzinnej inkubacji z nanocząstkami srebra. Największy spadek stężenia IL-1 β występował w próbkach, do których dodano AgNP w stężeniu 100 i 200 $\mu\text{g/ml}$. Wykazano różnice istotne statystycznie dla wszystkich użytych stężeń w porównaniu z próbą kontrolną.

Obserwowany w badaniach brak wzrostu w aktywności kaspazy-1 i stężenia interleukiny-1 β odbiegają od danych literaturowych. Brak użycia LPS (lipopolisacharydu) będącego bodźcem prozapalnym i prowadzącym do wytwarzania IL-1 β , może tłumaczyć, dlaczego w badaniach własnych nie zaobserwowano wzrostu stężenia IL-1 β .

Z uwagi na porównywanie wyników badań we krwi z badaniami na liniach komórkowych, otrzymane różnice mogą wynikać także z charakteru eksperymentu.

Komórki HepG2 traktowane przez 24 godziny 10 nm AgNP mają znacząco wyższe poziomy aktywowanej kaspazy-1 w porównaniu z próbami kontrolnymi. Sugeruje to, że AgNP indukują aktywację kaspazy-1. Zależna od inflamasomu kaspaza-1 jest odpowiedzialna za dojrzewanie zapalnych IL-1 β i IL-18. AgNP indukują wydzielanie IL-1 β . Mniejsze nanocząstki o wielkości 10 nm AgNP, w stężeniach 1, 10, 25 $\mu\text{g/ml}$ inkubowane przez 24 godziny z komórkami HepG2 wykazywały wyższą toksyczność

i silniejszą aktywację szlaków sygnałowych związanych ze stresem, stanem zapalnym i śmiercią komórkową w porównaniu z większymi nanocząstkami srebra – 50 i 100 nm. AgNP są transportowane do lizosomów przez autofagosomy, następnie zwiększają aktywność lizosomów, które stają się bardziej kwaśne. Wiązanie się AgNP z pęcherzykiem w cytoplazmie sugeruje indukcję cytotoksyczności poprzez przerwanie ciągłości błony lizosomalnej. AgNP indukują autofagię, permeabilizację błony lizosomalnej, powodując aktywację kaspazy-1 zależną od inflamasomu NLRP3. A tym samym powodując stan zapalny, stres oksydacyjny i cytotoksyczność [75].

W badaniach na ludzkich monocytach pochodzących z linii komórkowej białaczki monocytowej (THP-1) potwierdzono aktywację inflamasomu spowodowaną ekspozycją na AgNP z LPS o stężeniach 50 i 100 µg/ml. Nastąpił wzrost stężenia IL-1β przy obu dawkach nanocząstek w porównaniu z próbą kontrolną. Szczyt wzrostu następował po 8 godzinach ekspozycji [77].

W badaniach na liniach komórkowych mysich makrofagów (J774.1, ang. mouse macrophage cell line) i ludzkiej linii komórek raka okrężnicy (HT29, ang. human colonic epithelial cell line) wykazano, że 24-godzinna inkubacja z niepowlekanymi AgNP o wielkości 20 i 40 nm w stężeniu 1 µg/ml zmniejszała produkcję cytokiny zapalnej IL-1β. Natomiast komórki inkubowane z powlekanymi AgNP cytrynianem i PVP wykazywały podwyższone poziomy tych cytokin [137].

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej przy 6-godzinnej inkubacji z 5 nm AgNP wykazały wzrost IL-1β. Monocyty, jako główna populacja komórek odpowiedzialnych za wytwarzanie IL-1β, produkowały większe ilości IL-1β, w porównaniu z jednojądrzastymi komórkami krwi obwodowej (PBMC, ang. peripheral blood mononuclear cells), głównie przy stężeniu AgNP 0.6 i 0.9 µg/ml i wielkości 5 nm. Również przy tych stężeniach nastąpił niewielki wzrost produkcji IL-1β przy inkubacji z 28 nm AgNP. 100 nm AgNP nie indukowały wytwarzania IL-1β. Chociaż poziomy wytwarzanej IL-1β były niskie, ma to znaczenie na funkcjonowanie układu odpornościowego. Po ekspozycji na 5 nm i 28 nm AgNP nastąpiło rozszczepienie pro-kaspazy-1. Dojrzała kaspaza-1 jest wydzielana do komórek, co umożliwia jej zmierzenie w supernatantach z hodowli komórkowych. Aby aktywować kaspazę-1 najpierw musi nastąpić tworzenie inflamasomu. Podczas powstawania inflamasomu oligomeryzacja NLRP3 zachodzi jednocześnie z oligomeryzacją kaspazy-1. Wyniki wskazują, że oligomeryzacje te zachodzą już po 15 minutach od ekspozycji na AgNP. Zwiększone

wydzielanie dojrzałej IL-1 β wymagało dodania LPS, ponieważ niestymulowane komórki nie wydzielały cytokin w sposób znaczący [81].

Niskie stężenia (1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$) nanocząstek srebra o długości 15 nm po godzinnej inkubacji indukowały w monocytach pochodzących z linii komórkowej białaczki monocytowej (THP-1 ang. human monocytic leukemia cell line) stres oksydacyjny, ale nie prowadziły do śmierci komórki. Wyższe stężenie (25 $\mu\text{g/ml}$) skutkowało nietypową odpowiedzią na stres związany z pyroptotyczną śmiercią komórek poprzez aktywację inflamasomu NLRP3. Obserwowano wówczas cechy pyroptotycznej śmierci komórki, takie jak: zwiększenie aktywności kaspazy-1, tworzenie piroptosomów, utratę integralności błony i wydzielanie IL-1 β . Warto zauważyć, że wydzielanie dojrzałej IL-1 β wymagało dodania LPS, ponieważ niestymulowane komórki nie wydzielały tej cytokiny [70].

Wykazano, że AgNP mają zarówno stymulujący, jak i hamujący wpływ na produkcję cytokin, zależny od stężenia nanocząstek i typu komórek [137].

4.2. Nanocząstki złota

W badaniach własnych we wszystkich próbach granulocytów inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota występował niewielki wzrost odsetka komórek wykazujących pyroptozę, w porównaniu z próbą kontrolną. Obserwowano różnice istotne statystycznie dla prób inkubowanych przez 60 minut z Au $_3$ w stężeniu 20 i 200 $\mu\text{g/ml}$ w porównaniu z próbą kontrolną. W monocytach także obserwowano wzrost komórek wykazujących pyroptozę, wskazujących na zwiększoną produkcję kaspazy-1 w porównaniu z próbą kontrolną. Największy wzrost występował dla prób inkubowanych z Au $_3$ przez 60 minut. Wykazano różnice istotne statystycznie prób zawierających Au $_3$ o stężeniu 20 $\mu\text{g/ml}$ i czasie inkubacji 30 min, a także dla stężeń 20, 100 i 200 $\mu\text{g/ml}$ inkubowanych przez 60 minut w porównaniu z próbami kontrolnymi.

Dla prób granulocytów inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota wykazano niewielkie różnice w odsetku komórek wykazujących pyroptozę, za wyjątkiem tendencji wzrostowej dla stężenia 20 $\mu\text{g/ml}$ i czasie inkubacji 30 minut. Nie obserwowano zmian istotnych statystycznie w próbach granulocytów w porównaniu z próbą kontrolną. W przypadku monocytów obserwowano niewielki wzrost odsetka komórek wykazujących pyroptozę, zwłaszcza dla stężenia 100 $\mu\text{g/ml}$ i czasu inkubacji 60 minut. Z kolei dla użytego najwyższego stężenia obserwowano niewielki spadek odsetka

komórek wykazujących pyroptozę. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w porównaniu prób monocytów z próbą kontrolną.

Analogicznie do występowania małych różnic w produkcji kaspazy-1, wykazano również niewielkie zmiany w stężeniu interleukiny-1 β w porównaniu z próbą kontrolną przy 24-godzinnej inkubacji z nanocząstkami złota. Nie wykazano także różnic istotnych statystycznie pomiędzy próbami inkubowanymi z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota w porównaniu z próbą kontrolną.

Wyniki przeglądu literaturowego są zgodne z wynikami pracy własnej.

Zespół Sumbayev i wsp. inkubował ludzką linię komórkową białaczki monocytowej (THP-1) przez 4 godziny z nanocząstkami złota w stężeniu 20 μ M o rozmiarach 5, 15 i 35 nm. Wykazano wzrost ilości interleukiny na powierzchni komórki w obecności AuNP, w połączeniu z osłabieniem odpowiedzi zapalnych indukowanych przez IL-1 β . Sugeruje to, że cząstki IL-1 β agregują wokół AuNP. Zmniejszając przez to liczbę dostępnych cząsteczek IL-1 β , które mogą oddziaływać z komórkowym receptorem interleukiny.

W wyniku, czego znacząco hamują aktywność biologiczną IL-1 β . AuNP nie aktywują szlaku inflamasomu w komórkach THP-1 i zmniejszają proces zapalny przez selektywne ukierunkowanie na szlak zależny od IL-1 β . Również w badaniach na myszach w wyniku 4-tygodniowych wstrzyknięć nanocząstek złota potwierdzono, że AuNP zmniejszają odpowiedź indukowaną przez IL-1 β *in vivo* [84].

Badania na ludzkiej krwi obwodowej inkubowanej przez 16 godzin z AuNP o średnicy 13 nm nie wykazały wzrostu ilości IL-1 β w białych krwinkach (WBC, ang. white blood cells), przy żadnym z użytych stężeń: 25, 50, 75, 100 μ g/ml [78].

5. Podsumowanie

Cytotoksyczne efekty nanocząstek zależą od ich wielkości, stężenia, rozmieszczenia w tkankach, zdolności do infiltracji i absorpcji komórkowej [102].

Głównym mechanizmem odpowiedzialnym za cytotoksyczność związaną z nanocząstkami jest stres oksydacyjny wywołany nadmierną produkcją ROS, który może powodować strukturalne i funkcjonalne zaburzenia białek, lipidów i DNA, powodując zmiany komórkowe, a nawet śmierć komórki [29].

W badaniach własnych nie wykazano znaczącego wpływu nanocząstek srebra i złota na zwiększenie produkcji reaktywnych form tlenu, bez stymulacji PMA. Po dodaniu stymulatora wybuchu oddechowego obserwowano wzrost produkcji reaktywnych form tlenu we wszystkich próbach. Wykazano ponadto spadek wybuchu oddechowego w komórkach inkubowanych z nanocząstkami srebra i wzrost przy inkubacji z nanocząstkami złota w porównaniu z próbami kontrolnymi, po dodaniu PMA.

Wystąpiła korelacja związana z produkcją reaktywnych form tlenu i wpływem na aktywność kaspazy-1 oraz stężenie interleukiny-1 β . Nanocząstki srebra zmniejszały produkcję ROS po stymulacji PMA i wpływały hamująco na aktywność kaspazy-1 i stężenie interleukiny-1 β .

Natomiast nanocząstki złota po dodaniu PMA powodowały stymulację w produkcji reaktywnych form tlenu i aktywności kaspazy-1 oraz stężenia interleukiny-1 β . Uzyskane wyniki badań w tym aspekcie wykazują małe zróżnicowanie.

Ze względu na ograniczone odniesienia literaturowe badające wpływ nanocząstek srebra i złota na reaktywność leukocytów we krwi, praca doktorska będzie znaczącym punktem odniesienia. Zastosowanie trzech stężeń nanocząstek i dwóch czasów inkubacji jest również mocną stroną wykonanych badań.

Badania toksykologiczne nanocząsteczek wykazały, że właściwości fizykochemiczne nanocząsteczek takie jak rozmiar, kształt, powłoka powierzchni, ładunek powierzchniowy, rozpuszczalność i skład chemiczny, mogą wpływać na zachowanie nanocząsteczek w układach biologicznych, a tym samym wpływają na toksyczność nanocząsteczek [137,153]. Wpływ na wywołaną toksyczność mają także typ komórek wykorzystanych w badaniach oraz czas inkubacji z nanocząstkami [153].

Krew pełna lepiej odzwierciedla fizjologiczny skład komórek występujący w ludzkim organizmie, w porównaniu z preparatami izolowanych i oczyszczonych subpopulacji komórek. Stwarza również środowisko najbardziej zbliżone do fizjologicznego. Należy jednak uwzględnić występowanie cech osobniczych związanych

z liczbą komórek układu immunologicznego u poszczególnych osób [154,155]. Dlatego należy się spodziewać nieco innych wyników modulacji działania komórek w porównaniu z badaniami *in vivo*.

Uzasadnia to częściową niezgodność wyników badań z danymi literaturowymi, a wynika głównie z różnic w zastosowanym modelu badawczym, gdyż większość prac badawczych była prowadzona na liniach komórkowych. Występują również bardzo duże rozbieżności w metodzie syntezy, ale także wielkości i stężenia nanocząstek użytych przez naukowców, co dodatkowo ogranicza możliwość odniesienia własnych wyników badań do innych.

Wnioski

1. Użyte w badaniach własnych nanocząstki złota i srebra nie wpłynęły znacząco na produkcję reaktywnych form tlenu przez granulocyty i monocyty niestymulowane PMA.
2. Inkubacja z nanocząstkami srebra może hamować wybuch oddechowy stymulowany przez PMA.
3. Użyte w badaniach nanocząstki złota wzmacniały stymulację wybuchu oddechowego po dodaniu PMA.
4. Nanocząstki srebra powodowały spadek odsetka komórek wykazujących pyroptozę.
5. Inkubacja z kulistymi nanocząstkami złota spowodowała wzmożoną indukcję występowania komórek pyroptotycznych.
6. Inkubacja z prętopodobnymi nanocząstkami złota spowodowała niewielki wzrost indukcji pyroptozy.

Streszczenie

Powszechne wykorzystanie nanocząstek srebra i złota w przemyśle technologicznym i biomedycznym, a także środkach codziennego użytku, istotnie przyczyniło się do podjęcia badań w rozprawie doktorskiej, z wykorzystaniem tych nanocząstek.

Głównym założeniem podjętych badań w rozprawie doktorskiej było określenie wpływu nanocząstek srebra i złota na reaktywność ludzkich leukocytów krwi obwodowej.

W przeprowadzonych doświadczeniach przy użyciu cytometru przepływowego, analizowano aktywność wybuchu oddechowego oraz pyroptozy monocytów i granulocytów, inkubowanych przez 30 i 60 minut z nanocząstkami srebra i złota w stężeniach 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$. Oceniono także z wykorzystaniem testu ELISA stężenie interleukiny-1 β we krwi inkubowanej przez 24 godziny próbek z nanocząstkami srebra i złota w stężeniach 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$.

Użyte w badaniach nanocząstki złota i srebra nie wpłynęły znacząco na produkcję reaktywnych form tlenu w granulocytach i monocytach, bez stymulacji PMA. Po dodaniu do prób stymulatora wybuchu oddechowego – PMA wykazano, że nanocząstki srebra mogą hamować wybuch oddechowy w porównaniu z próbą kontrolną. Natomiast nanocząstki złota wzmacniały stymulację wybuchu oddechowego po dodaniu PMA w porównaniu z próbą kontrolną.

Wykazano, że nanocząstki srebra powodowały spadek odsetka komórek pyroptotycznych mierzony zmniejszeniem aktywności kaspazy-1. Z kolei inkubacja z kulistymi nanocząstkami złota spowodowała wzmożoną indukcję występowania komórek pyroptotycznych. Inkubacja z prętopodobnymi nanocząstkami złota spowodowała niewielki wzrost indukcji pyroptozy.

W nawiązaniu do analizy aktywności kaspazy-1 oceniono rolę interleukiny-1 β w indukcji pyroptozy. Nanocząstki srebra powodowały spadek stężenia interleukiny-1 β we krwi. Inkubacja z kulistymi nanocząstkami złota wykazała wzrost stężenia interleukiny-1 β w porównaniu z próbą kontrolną. W krwi inkubowanej z prętopodobnymi nanocząstkami złota nie wykazano znaczących zmian w stężeniu interleukiny-1 β . Uzyskane wyniki badań w tym aspekcie wykazują małe zróżnicowanie.

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej stanowią znaczące poszerzenie wiedzy na temat wpływu nanocząstek srebra i złota na reaktywność ludzkich leukocytów krwi obwodowej.

Summary

The widespread use of silver and gold nanoparticles in the technological and biomedical industries and everyday use products significantly contributed to the undertaking of research in this doctoral dissertation.

The study's primary objective was to determine the influence of silver and gold nanoparticles on the reactivity of the human peripheral blood leukocytes.

In the experiments performed on a flow cytometer, the respiratory burst activity and the pyroptosis of the monocytes and granulocytes were analyzed by incubating them for 30 and 60 minutes with silver and gold nanoparticles at the concentrations of 20, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$. The concentration of interleukin-1 β in the blood samples, incubated for 24-hours with silver and gold nanoparticles at concentrations of 20, 100, and 200 $\mu\text{g/ml}$, was assessed using an ELISA test.

The gold and silver nanoparticles used in this research have not significantly increased the production of reactive oxygen species in granulocytes and monocytes without PMA stimulation. When the respiratory burst stimulator PMA was added to the samples, the experiments showed that silver nanoparticles inhibit the respiratory burst. On the other hand, gold nanoparticles increased the stimulation of the respiratory burst after the addition of PMA.

It has been shown that the silver nanoparticles caused a decrease in the percentage of pyroptotic cells as measured by a reduction in caspase-1 activity. In contrast, spherical gold nanoparticles increased the induction of pyroptotic cells. Incubation with rod-like gold nanoparticles caused a slight increase in the induction of pyroptosis.

As for the analysis of caspase-1 activity, the role of interleukin-1 β in the induction of pyroptosis has been assessed. While the silver nanoparticles decreased the concentration of interleukin-1 β in the blood, the incubation with spherical gold nanoparticles yielded an increase in the interleukin-1 beta concentration compared to the control sample. It found no significant changes in the concentration of interleukin-1 β in blood incubated with rod-like gold nanoparticles. In this aspect, the results showed no significant differences between the activity of the nanoparticles analyzed.

This doctoral dissertation provides a significant expansion of the knowledge about the influence of silver and gold nanoparticles on the reactivity of human peripheral blood leukocytes.

Spis rycin i tabel

Ryc. 1. Sygnały odbierane przez komórkę prowadzące do aktywacji komórki lub jej śmierci, zmodyfikowany za: Bergsbaken i wsp. (2009) [71].

Ryc. 2. Schemat budowy inflamasomu, na podstawie: Świerczyński i wsp. (2021) [74].

Ryc. 3. Widmo UV-Vis kulistych nanocząstek złota (Au₃), max absorpcji przy długości fali $\lambda = 526$ nm, źródło: Wielkopolskie Centrum Zaawansowanych Technologii.

Ryc. 4. Zdjęcie kulistych nanocząstek złota wykonane za pomocą wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego (HRTEM ang. High Resolution Transmission Electron Microscopy) Jeol ARM 200F, wielkość $13,24 \pm 1,80$ nm. źródło: Centrum NanoBiomedyczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Ryc. 5. Widmo UV-Vis prętopodobnych nanocząstek złota (Au₆), max absorpcji przy długości fali $\lambda = 685$ nm, źródło: Wielkopolskie Centrum Zaawansowanych Technologii.

Ryc. 6. Zdjęcie prętopodobnych nanocząstek złota wykonane za pomocą wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego (HRTEM ang. High Resolution Transmission Electron Microscopy) Jeol ARM 200F, wielkość $31,92 \pm 4,47 \times 11,85 \pm 3,13$ nm. źródło: Centrum NanoBiomedyczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Ryc. 7. Widmo UV-Vis nanocząstek srebra, max absorpcji przy długości fali $\lambda = 397$ nm, źródło: Wielkopolskie Centrum Zaawansowanych Technologii.

Ryc. 8. Zdjęcie kulistych nanocząstek srebra wykonane za pomocą wysokorozdzielczego mikroskopu transmisyjnego (HRTEM ang. High Resolution Transmission Electron Microscopy) Jeol ARM 200F, wielkość $8,50 \pm 2,50$ nm. źródło: Centrum NanoBiomedyczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

Ryc. 9. Schemat rozłożenia prób na płytce wielodołkowej, źródło grafiki: <https://www.bionovo.pl/p/plytki-wielodolkowe-neoculture/>

Ryc. 10. Schemat rozkładu prób na płytce 96-dołkowej, źródło grafiki: <http://www.izibb.binoz.uj.edu.pl/documents/4416519/ae289514-3b71-4052-bcfb-be4715e97ddb>

Ryc. 11. Przykładowy cytogram przedstawiający wyodrębnione bramkami populacje leukocytów w obrazie cytometrycznym, bez stymulacji PMA. Gran – granulocyty, Mono – monocyty, Limf – limfocyty, źródło własne.

Ryc. 12. Przykładowy histogram przedstawiający wartość intensywności fluorescencji granulocytów wykazujących fluorescencję rodamin 123, bez stymulacji PMA, źródło własne.

Ryc. 13. Przykładowy histogram przedstawiający wartość intensywności fluorescencji monocytów wykazujących fluorescencję rodamin 123, bez stymulacji PMA, źródło własne.

Ryc. 14. Przykładowy cytogram przedstawiający wyodrębnione bramkami populacje leukocytów w obrazie cytometrycznym, stymulowanych PMA. Gran – granulocyty, Mono – monocyty, Limf – limfocyty, źródło własne.

Ryc. 15. Przykładowy histogram przedstawiający wartość intensywności fluorescencji granulocytów wykazujących fluorescencję rodamin 123 i stymulowanych PMA, źródło własne.

Ryc. 16. Przykładowy histogram przedstawiający wartość intensywności fluorescencji monocytów wykazujących fluorescencję rodamin 123 i stymulowanych PMA, źródło własne.

Ryc. 17. Przykładowy cytogram przedstawiający wyodrębnione bramkami populacje leukocytów w obrazie cytometrycznym. Gran – granulocyty, Mono – monocyty, Limf – limfocyty, źródło własne.

Ryc. 18. Przykładowy cytogram przedstawiający rozkład odsetkowy granulocytów. Wykorzystano fluorescencję sondy FAM-VAD-FMK FLICA wywołaną aktywacją prozapalnej kaspazy-1. QA1 i QA2 – komórki wykazujące pyroptozę; QA3 – komórki prawidłowe; QA4 – komórki uszkodzone lub ich fragmenty, źródło własne.

Ryc. 19. Przykładowy cytogram przedstawiający rozkład odsetkowy monocytów. Wykorzystano fluorescencję sondy FAM-VAD-FMK FLICA wywołaną aktywacją prozapalnej kaspazy-1. QA1 i QA2 – komórki wykazujące pyroptozę; QA3 – komórki prawidłowe; QA4 – komórki uszkodzone lub ich fragmenty, źródło własne.

Ryc. 20. Możliwy mechanizm śmierci komórki indukowany przez nanocząstki srebra, źródło własne.

Ryc. 21. Schemat potencjalnego mechanizmu śmierci komórkowej indukowanej AgNP, zmodyfikowany: Mishra i wsp. (2016) [75].

Tabela 1. Charakterystyka oznaczanych prób inkubowanych z DHR i z nanocząstkami złota z uwzględnieniem kolejności wykonywanych czynności laboratoryjnych.

Tabela 2. Charakterystyka oznaczanych prób inkubowanych z DHR i z nanocząstkami srebra z uwzględnieniem kolejności wykonywanych czynności laboratoryjnych.

Tabela 3. Charakterystyka oznaczanych prób inkubowanych z FAM i z nanocząstkami złota z uwzględnieniem kolejności wykonywanych czynności laboratoryjnych.

Tabela 4. Charakterystyka oznaczanych prób inkubowanych z FAM i z nanocząstkami srebra z uwzględnieniem kolejności wykonywanych czynności laboratoryjnych.

Tabela 5. Statystyki opisowe oraz ocena różnic w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach zawierających rodaminę, inkubowanych przez 60 min z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota Au1-Au6 o stężeniu 100 µg/ml.

Tabela 6. Statystyki opisowe oraz ocena różnic w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą oraz PMA inkubowanych przez 60 min z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota Au1-Au6.

Tabela 7. Statystyki opisowe dla średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o różnym stężeniu vs. próba kontrolna.

Tabela 8. Statystyki opisowe dla średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota o różnym stężeniu vs. próba kontrolna.

Tabela 9. Statystyki opisowe oraz różnice w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o różnym stężeniu i czasie inkubacji 30 min.

Tabela 10. Statystyki opisowe oraz różnice w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o stężeniu 20 µg/ml i różnym czasie inkubacji (30 i 60 minut).

Tabela 11. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 o stężeniu 200 µg/ml i ich analiza względem czasu inkubacji (30 i 60 minut).

Tabela 12. Statystyki opisowe oraz różnice w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych przez 30 min z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota o różnym stężeniu (20, 100, 200 µg/ml).

Tabela 13. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 oraz ocena różnicy vs. próba kontrolna.

Tabela 14. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 o różnym stężeniu oraz analiza próbek vs. próba kontrolna.

Tabela 15. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych przez 30 min z kulistymi nanocząstkami złota Au3 oraz ich analiza względem stężenia (20, 100, 200 µg/ml).

Tabela 16. Statystyki opisowe dla średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z nanocząstkami srebra o różnym stężeniu vs. próba kontrolna.

Tabela 17. Statystyki opisowe oraz różnice w wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z nanocząstkami srebra o stężeniu 20 µg/ml i różnym czasie inkubacji (30 i 60 minut).

Tabela 18. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z nanocząstkami srebra oraz porównanie vs. próba kontrolna.

Tabela 19. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z nanocząstkami srebra o stężeniu 20 µg/ml oraz ich analiza względem czasu inkubacji.

Tabela 20. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z nanocząstkami srebra o stężeniu 200 µg/ml i ich analiza względem czasu inkubacji.

Tabela 21. Statystyki opisowe dla średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o różnym stężeniu vs. próba kontrolna.

Tabela 22. Statystyki opisowe dla średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) o różnym stężeniu vs. próba kontrolna.

Tabela 23. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 i ich analiza vs. próba kontrolna.

Tabela 24. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au6) i ich analiza vs. próba kontrolna.

Tabela 25. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 o stężeniu 20 µg/ml oraz ich analiza względem czasu inkubacji.

Tabela 26. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych z nanocząstkami srebra i ich analiza vs. próba kontrolna.

Tabela 27. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą inkubowanych przez 60 min z nanocząstkami srebra oraz ich analiza względem stężenia nanocząstek.

Tabela 28. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych z nanocząstkami srebra oraz ich analiza vs. próba kontrolna.

Tabela 29. Statystyki opisowe dla wartości średniej intensywności fluorescencji w próbkach z rodaminą i PMA inkubowanych przez 30 min z nanocząstkami srebra oraz ich analiza względem różnych poziomów stężenia.

Tabela 30. Próbkki inkubowane z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au3 i Au6) oraz próby z buforem, w podziale na komórki prawidłowe (P) oraz wykazujące pyroptozę (PYR) - statystyki opisowe dla odsetka komórek prawidłowych (P) / wykazujących pyroptozę (PYR).

Tabela 31. Statystyki opisowe dla odsetków komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 oraz ich porównanie vs. próba kontrolna.

Tabela 32. Statystyki opisowe dla odsetków komórek pyroptotycznych w próbkach inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 oraz ich porównanie vs. próba kontrolna.

Tabela 33. Statystyki opisowe dla odsetków komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o stężeniu 20 µg/ml i ich analiza względem czasu inkubacji.

Tabela 34. Statystyki opisowe dla odsetków komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 o stężeniu 200 µg/ml i ich analiza względem czasu inkubacji.

Tabela 35. Statystyki opisowe dla odsetków komórek pyroptotycznych w próbkach inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 o stężeniu 200 µg/ml i ich analiza względem czasu inkubacji.

Tabela 36. Próbkki inkubowane z nanocząstkami srebra oraz próby z buforem, w podziale na komórki prawidłowe (P) oraz wykazujące pyroptozę (PYR) - statystyki opisowe oraz odsetek komórek prawidłowych (P) / wykazujących pyroptozę (PYR).

Tabela 37. Statystyki opisowe dla odsetka komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z nanocząstkami srebra oraz ich porównanie vs. próba kontrolna.

Tabela 38. Statystyki opisowe dla odsetka komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z nanocząstkami srebra o stężeniu 100 µg/ml i ich analiza względem czasu inkubacji.

Tabela 39. Próbkki inkubowane z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota (Au3 i Au6) oraz próby z buforem, w podziale na komórki prawidłowe (P) oraz wykazujące pyroptozę (PYR) - statystyki opisowe dla odsetka komórek prawidłowych (P) / wykazujących pyroptozę (PYR).

Tabela 40. Statystyki opisowe dla odsetka komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 vs. próba kontrolna

Tabela 41. Statystyki opisowe dla odsetka komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 i ich porównanie vs. próba kontrolna.

Tabela 42. Próbki inkubowane z nanocząstkami srebra oraz próba z buforem, w podziale na komórki prawidłowe (P) oraz wykazujące pyroptozę (PYR) - odsetek komórek prawidłowych (P) / wykazujących pyroptozę (PYR).

Tabela 43. Statystyki opisowe dla odsetka komórek wykazujących pyroptozę w próbkach inkubowanych z nanocząstkami srebra i ich analiza względem próby kontrolnej.

Tabela 44. Statystyki opisowe dla stężenia interleukiny-1 beta (pg/ml) w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 i ich porównanie do próby kontrolnej.

Tabela 45. Statystyki opisowe dla stężenia interleukiny-1 β (pg/ml) w próbkach inkubowanych z prętopodobnymi nanocząstkami złota Au6 i ich porównanie do próby kontrolnej.

Tabela 46. Statystyki opisowe dla stężenia interleukiny-1 β (pg/ml) w próbkach inkubowanych z kulistymi nanocząstkami złota Au3 i ich analiza względem stężenia nanocząstek.

Tabela 47. Statystyki opisowe dla stężenia interleukiny-1 β (pg/ml) w próbkach inkubowanych z kulistymi i prętopodobnymi nanocząstkami złota Au3 i Au6, przy stężeniu nanocząstek 100 μ g/ml.

Tabela 48. Statystyki opisowe dla stężenia interleukiny-1 β (pg/ml) w próbkach inkubowanych z nanocząstkami srebra Ag i ich analiza vs. próba kontrolna.

Tabela 49 Zestawienie oddziaływania nanocząstek srebra na różnego typu linie komórkowe.

Lista załączników

Załącznik 1. Zgoda Komisji Bioetycznej

Patrycja Talarska
Imię i nazwisko

Poznań, 19.03.2018r.

Katedra Biologii i Ochrony Środowiska
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
miejsce realizowania pracy naukowej

Sz. Pan
Prof. dr hab. Paweł Chęciński
Przewodniczący Komisji Bioetycznej
przy Uniwersytecie Medycznym
w Poznaniu

Szanowny Panie Profesorze,

Przygotowuję się do realizacji pracy doktorskiej, pt.: „Wpływ nanocząstek na reaktywność ludzkich leukocytów krwi obwodowej”, która będzie przeprowadzana w oparciu o badania z wykorzystaniem krwi zakupionej w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Poznaniu.

Proszę o potwierdzenie, że prowadzone przeze mnie badanie nie jest eksperymentem medycznym i nie wymaga opinii Komisji Bioetycznej.

**BADANIE NIE NOSI CECH
EKSPERYMENTU
MEDYCZNEGO**

PRZEWODNICZĄCY
KOMISJI BIOETYCZNEJ
prof. dr hab. med. Piotr Chęciński

podpis

2018-03-19

Załącznik 2 Opis syntezy kulistych nanocząstek złota

Kuliste nanocząstki złota przygotowano w laboratorium Zakładu Fizyki Molekularnej na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej na podstawie artykułów: Błaszkievicz i wsp. [95] oraz Rahme i wsp. [96].

Kuliste nanocząstki złota zostały otrzymane w jednoetapowej reakcji *in situ bottom-up*, gdzie prekursorem był kwas tetrachlorozłotowy (HAuCl_4 , Sigma-Aldrich, nr kat. 520918), a reduktorem cytrynian sodu (Sigma-Aldrich, nr kat. S4641) [96]. 100 ml wodnego roztworu HAuCl_4 o stężeniu 1 mmol/l ogrzano do 95°C . Następnie dodano intensywnie mieszając 2,82 ml roztworu cytrynianu sodu o stężeniu 170 mmol/l. Mieszaninę ogrzewano przez 35 minut w temperaturze 95°C . W tym czasie kolor roztworu zmienił się z jasnożółtego do ciemno-czerwonego. Następnie roztwór

pozostawiono do osiągnięcia temperatury pokojowej [95,96]. W ten sposób otrzymano roztwór Au1.

Po ostygnięciu roztwór został przefiltrowany przez filtr strzykawkowy (0,22 μm). Tak przygotowane nanocząstki zostały poddane procesowi funkcjonalizacji przy użyciu tiomonometyloвого glikolu polietylenowego o masie molowej około 2000 (PEG 2000, Sigma-Aldrich, nr kat. 743127). Zabieg ten uniemożliwia tworzenie się agregatów i poprawia stabilność nanocząstek [95]. Zgodnie z procedurą Rahme i wsp. użyto 1/3 część molową glikolu w stosunku do wykorzystanej ilości kwasu tetrachlorozłotowego. Do roztworu PEG, który wcześniej został poddany sonikacji przez 30 minut w temperaturze 40°C, dodano poreakcyjny roztwór nanocząstek złota. Całość mieszano przez 24 godziny, pozwalając na wymianę ligandów cytrynianowych obecnych w nanocząstkach złota z PEG. Nadmiar PEG usunięto wirując przy obrotach 6 000 rpm, przez 30 minut (MPW model 260R). Otrzymany osad przemyto wodą lub roztworem soli fizjologicznej. Powtórzono wirowanie. Osad zawieszono ponownie w wodzie lub 0,9% chlorku sodu [96]. Otrzymując nanocząstki złota Au2 i Au3.

Załącznik 3. Opis syntezy prętopodobnych nanocząstek złota

Prętopodobne nanocząstki złota przygotowano w laboratorium Zakładu Fizyki Molekularnej na Wydziale Inżynierii Materiałowej i Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej zgodnie z artykułami: Błaszkieicz i wsp. (2020) [97], Błaszkieicz i wsp. (2019) [98], Nikoobakht i wsp. [99], Rahme i wsp. [96].

Otrzymywanie prętopodobnych nanocząstek wykonano syntezą dwuetapową. Nanocząstki były syntezowane przy pomocy metody hodowania na zarodkach (ang. *seed-mediated growth*), gdzie ziarna złota koloidalnego były przyłączane do wcześniej otrzymanych kulistych rdzeni złota. Następnie dookoła rdzeni tworzyła się z ziaren złota powłoka powodująca wzrost prętopodobnych nanocząstek złota. Metoda ta polega na redukcji chemicznej prekursora - kwasu tetrachlorozłotowego (HAuCl_4 , Sigma-Aldrich, nr kat. 520918) przez użycie reduktorów - borowodorku sodu (Sigma-Aldrich, nr kat. 452882) i kwasu askorbinowego (Sigma-Aldrich, nr kat. 255564) [98–100]. Zgodnie z metodą opisaną przez Błaszkieicz i wsp. w celu przygotowania zarodków złota 5 ml 0,5 mmol/l roztworu kwasu tetrachlorozłotowego dodano do 5 ml 200 mmol/l bromku heksadecyloamoniowego (CTAB, Sigma-Aldrich, nr kat. H6269). Następnie dodano 0,6 ml 10 mmol/l świeżo przygotowanego i schłodzonego środka redukującego borowodorku sodu. Energicznie mieszano w stałej temperaturze i wilgotności przez 2 minuty. Roztwór

zmienił barwę na brązowo-żółtą. Otrzymany roztwór zarodków złota do dalszych syntez przechowywano w temperaturze 25-28°C.

Następnie przygotowano roztwór wzrostowy i w tym celu w kolbie stożkowej zmieszano 5 ml 200 mmol/l roztworu bromku heksadecyloamoniowego (CTAB, Sigma-Aldrich, nr kat. H6269) z 5 ml 1 mmol/l kwasu tetrachlorozłotowego oraz 0,1 ml 4 mmol/l azotanu(V) srebra(I) (Sigma-Aldrich, nr kat. 204390). Mieszaninę ogrzano do temperatury 30°C. Następnie wolno mieszając dodano 70 µl 79 mmol/l wodnego roztworu kwasu askorbinowego (Sigma Aldrich, nr kat. 255564). Na koniec dodano 12 µl zarodków złota, przygotowanych w pierwszym etapie. Po wymieszaniu roztwór wzrostowy zmienił kolor, co wskazywało na powstawanie prętopodobnych nanocząstek złota. Roztwór mieszano w temperaturze 30°C przez 30 minut. Mieszaninę poreakcyjną odwirowano przez 30 min (6000 rpm, MPW model 260R). Osad przemyto wodą i ponownie odwirowano. Otrzymano prętopodobne nanocząstki złota o średnicy około 21 nm i długości około 48 nm (ryc. 6) [98,99]. W ten sposób otrzymano roztwór Au4.

Ostatnim etapem jest dodanie wcześniej przygotowanego roztworu zarodków złota (ang. *seed solution*), aby zakończyć proces wzrostu. Roztwór pozostawiono na mieszadle na ok. 2 h. Następnie nanocząstki były dwukrotnie odwirowane z nadmiaru środka stabilizującego i przemywane wodą MiliQ. Tak przygotowane nanocząstki zostały poddane procesowi funkcjonalizacji przy użyciu tiomonometylowego glikolu polietylenowego o masie molowej około 2000 (PEG 2000, Sigma-Aldrich, nr kat. 743127). Zgodnie z opisaną procedurą Rahme i wsp. użyto 1/4 część molową glikolu w stosunku do wykorzystanej ilości kwasu tetrachlorozłotowego. Ilość PEG jest obliczona w oparciu o powierzchnię właściwą nanocząstek, w taki sposób, aby pokryć całą powierzchnię nanocząstek. Roztwór PEG poddany sonikacji przez 30 minut w temp. 40°C dodano do roztworu prętopodobnych nanocząstek złota. Roztwór pozostawiono na mieszadle przez 24 godziny, pozwalając na wymianę ligandów z PEG. Następnie całość została oczyszczona z nadmiaru nieprzereagowanych reagentów w dwukrotnym procesie wirowania (6000 rpm, MPW model 260R) przez 30 minut i przemywania wodą lub 0,9% chlorkiem sodu. [97–99]. Z otrzymanych roztworów utworzono w wodzie Au5 i soli fizjologicznej Au6.

Załącznik 4. Opis syntezy nanocząstek srebra

Nanocząstki srebra przygotowano w Wielkopolskim Centrum Zaawansowanych Technologii zgodnie z artykułem: Bigall i wsp. [100].

Do kolby stożkowej o pojemności 1 l, wlewo 500 ml wody Milli-Q. Umieszczono ją na mieszadle magnetycznym i doprowadzono do wrzenia. Następnie we wrzącej wodzie rozpuszczono 46 mg azotanu(V) srebra(I) (Sigma-Aldrich, nr. kat. 204390). Niezwłocznie po rozpuszczeniu się soli (około 1 minuty) intensywnie mieszając dodano 11 ml roztworu zawierającego: 1% cytrynian trisodu (Sigma-Aldrich, nr kat. 71402), 0,05% kwasu cytrynowego (Sigma-Aldrich, nr kat. 27487). Roztwór ten przygotowano w większej objętości (50 ml) – biorąc odpowiednio 500 mg cytrynianu trisodu oraz 25 mg kwasu cytrynowego, uzupełniając całość wodą do objętości 50 ml. Następnie dodano świeżo przygotowanego 5,5 ml roztworu zawierającego 0,08% borowodorku sodu (Sigma-Aldrich, nr kat. 213462), we wcześniej otrzymanym roztworze tj. zawierającym 1% cytrynian trisodu i 0,05% kwas cytrynowy. Cały czas intensywnie mieszając ogrzewano mieszaninę do wrzenia przez 10 minut. Następnie pozostawiono, do osiągnięcia temperatury pokojowej. Mieszaninę odwirowano (20 min, 3000 rpm, Hermle model Z400K). Po usunięciu supernatantu osad wymieszano z wodą Milli-Q. Mieszaninę poreakcyjną przefiltrowano przez hydrofilowy filtr strzykawkowy (0,22 μm) [100].

Piśmiennictwo

1. McShan, D.; Ray, P.C.; Yu, H. Molecular Toxicity Mechanism of Nanosilver. *J. Food Drug Anal.* **2014**, *22*, 116–127, doi:10.1016/j.jfda.2014.01.010.
2. Abdal Dayem, A.; Hossain, M.K.; Lee, S.B.; Kim, K.; Saha, S.K.; Yang, G.-M.; Choi, H.Y.; Cho, S.-G. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Biological Activities of Metallic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, doi:10.3390/ijms18010120.
3. Murugan, K.; Choonara, Y.E.; Kumar, P.; Bijukumar, D.; du Toit, L.C.; Pillay, V. Parameters and Characteristics Governing Cellular Internalization and Trans-Barrier Trafficking of Nanostructures. *Int. J. Nanomedicine* **2015**, *10*, 2191–2206, doi:10.2147/IJN.S75615.
4. Sundos, S.I.A.; Haliza, K.; Fazren, A.; Mohd, F.M.B. Antibacterial and Anti-Biofilm Biosynthesised Silver and Gold Nanoparticles for Medical Applications: Mechanism of Action, Toxicity and Current Status. *Curr. Drug Deliv.* **2020**, *17*, 88–100.
5. Huang, W.; Tao, F.; Li, F.; Mortimer, M.; Guo, L.-H. Antibacterial Nanomaterials for Environmental and Consumer Product Applications. *NanoImpact* **2020**, *20*, 100268, doi:10.1016/j.impact.2020.100268.
6. Furtos, G.; Naghiu, M.-A.; Declercq, H.; Gorea, M.; Prejmerean, C.; Pana, O.; Tomoaia-Cotisel, M. Nano Forsterite Biocomposites for Medical Applications: Mechanical Properties and Bioactivity. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2016**, *104*, 1290–1301, doi:https://doi.org/10.1002/jbm.b.33396.
7. Coty, J.-B.; Vauthier, C. Characterization of Nanomedicines: A Reflection on a Field under Construction Needed for Clinical Translation Success. *J. Controlled Release* **2018**, *275*, 254–268, doi:10.1016/j.jconrel.2018.02.013.
8. Sanches, P.L.; Souza, W.; Gemini-Piperni, S.; Rossi, A.L.; Scapin, S.; Midlej, V.; Sade, Y.; Leme, A.F.P.; Benchimol, M.; Rocha, L.A.; et al. Rutile Nano–Bio-Interactions Mediate Dissimilar Intracellular Destiny in Human Skin Cells. *Nanoscale Adv.* **2019**, *1*, 2216–2228, doi:10.1039/C9NA00078J.
9. Tehri, N.; Vashishth, A.; Gahlaut, A.; Hooda, V. Biosynthesis, Antimicrobial Spectra and Applications of Silver Nanoparticles: Current Progress and Future Prospects. *Inorg. Nano-Met. Chem.* **2020**, *0*, 1–19, doi:10.1080/24701556.2020.1862212.
10. Mythili, R.; Selvankumar, T.; Srinivasan, P.; Sengottaiyan, A.; Sabastinraj, J.; Ameen, F.; Al-Sabri, A.; Kamala-Kannan, S.; Govarthanan, M.; Kim, H. Biogenic Synthesis, Characterization and Antibacterial Activity of Gold Nanoparticles Synthesised from Vegetable Waste. *J. Mol. Liq.* **2018**, *262*, 318–321, doi:10.1016/j.molliq.2018.04.087.
11. Ahmad, T.; Bustam, M.A.; Irfan, M.; Moniruzzaman, M.; Samsudin, M.F.R.; Asghar, H.M.A.; Muhammad, N.; Iqbal, J.; Bhattacharjee, S. Effect of Gold and Iron Nanoparticles on Photocatalytic Behaviour of Titanium Dioxide towards 1-Butyl-3-Methylimidazolium Chloride Ionic Liquid. *J. Mol. Liq.* **2019**, *291*, 111277, doi:10.1016/j.molliq.2019.111277.
12. Akter, M.; Sikder, Md.T.; Rahman, Md.M.; Ullah, A.K.M.A.; Hossain, K.F.B.; Banik, S.; Hosokawa, T.; Saito, T.; Kurasaki, M. A Systematic Review on Silver Nanoparticles-Induced Cytotoxicity: Physicochemical Properties and Perspectives. *J. Adv. Res.* **2018**, *9*, 1–16, doi:10.1016/j.jare.2017.10.008.
13. Keller, A.A.; Lazareva, A. Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2014**, *1*, 65–70, doi:10.1021/ez400106t.
14. Batley, G.E.; Kirby, J.K.; McLaughlin, M.J. Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 854–862, doi:10.1021/ar2003368.
15. Slavin, Y.N.; Asnis, J.; Häfeli, U.O.; Bach, H. Metal Nanoparticles: Understanding the Mechanisms behind Antibacterial Activity. *J. Nanobiotechnology* **2017**, *15*, 65, doi:10.1186/s12951-017-0308-z.
16. Panáček, A.; Kvítek, L.; Smékalová, M.; Večeřová, R.; Kolář, M.; Röderová, M.; Dyčka, F.; Šebela, M.; Pucek, R.; Tomanec, O.; et al. Bacterial Resistance to Silver Nanoparticles and How to Overcome It. *Nat. Nanotechnol.* **2018**, *13*, 65–71, doi:10.1038/s41565-017-0013-y.

17. Ujica, M.A.; Paltinean, G.A.; Mocanu, A.; Tomoaia-Cotisel, M. Silver and Gold Nanoparticles: Challenges and Perspectives. *Acad. Romanian Sci. Ann. - Ser. Biol. Sci.* **2020**, *9*, 97–139.
18. Syafiuddin, A.; Salmiati; Salim, M.R.; Kueh, A.B.H.; Hadibarata, T.; Nur, H. A Review of Silver Nanoparticles: Research Trends, Global Consumption, Synthesis, Properties, and Future Challenges. *J. Chin. Chem. Soc.* **2017**, *64*, 732–756, doi:https://doi.org/10.1002/jccs.201700067.
19. Yang, W.; Wang, L.; Mettenbrink, E.M.; DeAngelis, P.L.; Wilhelm, S. Nanoparticle Toxicology. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2021**, *61*, 269–289, doi:10.1146/annurev-pharmtox-032320-110338.
20. Reidy, B.; Haase, A.; Luch, A.; Dawson, K.; Lynch, I.; Reidy, B.; Haase, A.; Luch, A.; Dawson, K.A.; Lynch, I. Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications. *Materials* **2013**, *6*, 2295–2350, doi:10.3390/ma6062295.
21. Grumezescu, A.M.; Stoica, A.E.; Dima-Bălcescu, M.-Ștefan; Chircov, C.; Gharbia, S.; Baltă, C.; Roșu, M.; Herman, H.; Holban, A.M.; Fica, A.; et al. Electrospun Polyethylene Terephthalate Nanofibers Loaded with Silver Nanoparticles: Novel Approach in Anti-Infective Therapy. *J. Clin. Med.* **2019**, *8*, 1039, doi:10.3390/jcm8071039.
22. Ballottin, D.; Fulaz, S.; Cabrini, F.; Tsukamoto, J.; Durán, N.; Alves, O.L.; Tasic, L. Antimicrobial Textiles: Biogenic Silver Nanoparticles against *Candida* and *Xanthomonas*. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *75*, 582–589, doi:10.1016/j.msec.2017.02.110.
23. Pilaquinga, F.; Morey, J.; Torres, M.; Seqqat, R.; Piña, M. de las N. Silver Nanoparticles as a Potential Treatment against SARS-CoV-2: A Review. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology* **2021**, *13*, e1707, doi:10.1002/wnan.1707.
24. Yin, I.X.; Zhang, J.; Zhao, I.S.; Mei, M.L.; Li, Q.; Chu, C.H. The Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles and Its Application in Dentistry. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 2555–2562, doi:10.2147/IJN.S246764.
25. Krishnan, P.D.; Banas, D.; Durai, R.D.; Kabanov, D.; Hosnedlova, B.; Kepinska, M.; Fernandez, C.; Ruttkay-Nedecky, B.; Nguyen, H.V.; Farid, A.; et al. Silver Nanomaterials for Wound Dressing Applications. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 821, doi:10.3390/pharmaceutics12090821.
26. Bansal, S.A.; Kumar, V.; Karimi, J.; Singh, A.P.; Kumar, S. Role of Gold Nanoparticles in Advanced Biomedical Applications. *Nanoscale Adv.* **2020**, *2*, 3764–3787, doi:10.1039/D0NA00472C.
27. Chandrasekaran, R.; Madheswaran, T.; Tharmalingam, N.; Bose, R.J.; Park, H.; Ha, D.-H. Labeling and Tracking Cells with Gold Nanoparticles. *Drug Discov. Today* **2021**, *26*, 94–105, doi:10.1016/j.drudis.2020.10.020.
28. Lee, S.H.; Jun, B.-H. Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 865, doi:10.3390/ijms20040865.
29. Gherasim, O.; Puiu, R.A.; Bîrcă, A.C.; Burdușel, A.-C.; Grumezescu, A.M. An Updated Review on Silver Nanoparticles in Biomedicine. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 2318, doi:10.3390/nano10112318.
30. Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M.A.; Alkawareek, M.Y.; Dreaden, E.C.; Brown, D.; Alkilany, A.M.; Farokhzad, O.C.; Mahmoudi, M. Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey inside the Cell. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4218–4244, doi:10.1039/C6CS00636A.
31. Farjadian, F.; Ghasemi, A.; Gohari, O.; Roointan, A.; Karimi, M.; Hamblin, M.R. Nanopharmaceuticals and Nanomedicines Currently on the Market: Challenges and Opportunities. *Nanomed.* **2018**, *14*, 93–126, doi:10.2217/nnm-2018-0120.
32. Azharuddin, M.; Zhu, G.H.; Das, D.; Ozgur, E.; Uzun, L.; Turner, A.P.F.; Patra, H.K. A Repertoire of Biomedical Applications of Noble Metal Nanoparticles. *Chem. Commun.* **2019**, *55*, 6964–6996, doi:10.1039/C9CC01741K.
33. Kadhim, R.J.; Karsh, E.H.; Taqi, Z.J.; Jabir, M.S. Biocompatibility of Gold Nanoparticles: In-Vitro and In-Vivo Study. *Mater. Today Proc.* **2021**, doi:10.1016/j.matpr.2020.12.826.

34. Liu, X.-Y.; Wang, J.-Q.; Ashby, C.R.; Zeng, L.; Fan, Y.-F.; Chen, Z.-S. Gold Nanoparticles: Synthesis, Physiochemical Properties and Therapeutic Applications in Cancer. *Drug Discov. Today* **2021**, doi:10.1016/j.drudis.2021.01.030.
35. Kovacevic, M.; Balaz, I.; Marson, D.; Laurini, E.; Jovic, B. Mixed-Monolayer Functionalized Gold Nanoparticles for Cancer Treatment: Atomistic Molecular Dynamics Simulations Study. *Biosystems* **2021**, *202*, 104354, doi:10.1016/j.biosystems.2021.104354.
36. Mourdikoudis, S.; Pallares, R.M.; Thanh, N.T.K. Characterization Techniques for Nanoparticles: Comparison and Complementarity upon Studying Nanoparticle Properties. *Nanoscale* **2018**, *10*, 12871–12934, doi:10.1039/C8NR02278J.
37. Sukhanova, A.; Bozrova, S.; Sokolov, P.; Berestovoy, M.; Karaulov, A.; Nabiev, I. Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Res. Lett.* **2018**, *13*, 44, doi:10.1186/s11671-018-2457-x.
38. Singh, P.; Pandit, S.; Mokkapati, V.R.S.S.; Garg, A.; Ravikumar, V.; Mijakovic, I. Gold Nanoparticles in Diagnostics and Therapeutics for Human Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1979, doi:10.3390/ijms19071979.
39. Connor, E.E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C.J.; Wyatt, M.D. Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small* **2005**, *1*, 325–327, doi:https://doi.org/10.1002/sml.200400093.
40. Goddard, Z.R.; Marín, M.J.; Russell, D.A.; Searcey, M. Active Targeting of Gold Nanoparticles as Cancer Therapeutics. *Chem. Soc. Rev.* **2020**, *49*, 8774–8789, doi:10.1039/D0CS01121E.
41. Sung, J.H.; Ji, J.H.; Park, J.D.; Yoon, J.U.; Kim, D.S.; Jeon, K.S.; Song, M.Y.; Jeong, J.; Han, B.S.; Han, J.H.; et al. Subchronic Inhalation Toxicity of Silver Nanoparticles. *Toxicol. Sci.* **2009**, *108*, 452–461, doi:10.1093/toxsci/kfn246.
42. Jo, M.S.; Kim, J.K.; Kim, Y.; Kim, H.P.; Kim, H.S.; Ahn, K.; Lee, J.H.; Faustman, E.M.; Gulumian, M.; Kelman, B.; et al. Mode of Silver Clearance Following 28-Day Inhalation Exposure to Silver Nanoparticles Determined from Lung Burden Assessment Including Post-Exposure Observation Periods. *Arch. Toxicol.* **2020**, *94*, 773–784, doi:10.1007/s00204-020-02660-2.
43. Narciso, L.; Coppola, L.; Lori, G.; Andreoli, C.; Zjino, A.; Bocca, B.; Petrucci, F.; Di Virgilio, A.; Martinelli, A.; Tinari, A.; et al. Genotoxicity, Biodistribution and Toxic Effects of Silver Nanoparticles after in Vivo Acute Oral Administration. *NanoImpact* **2020**, *18*, 100221, doi:10.1016/j.impact.2020.100221.
44. Park, E.-J.; Bae, E.; Yi, J.; Kim, Y.; Choi, K.; Lee, S.H.; Yoon, J.; Lee, B.C.; Park, K. Repeated-Dose Toxicity and Inflammatory Responses in Mice by Oral Administration of Silver Nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2010**, *30*, 162–168, doi:10.1016/j.etap.2010.05.004.
45. Maneewattanapinyo, P.; Banlunara, W.; Thammacharoen, C.; Ekgasit, S.; Kaewamatawong, T. An Evaluation of Acute Toxicity of Colloidal Silver Nanoparticles. *J. Vet. Med. Sci.* **2011**, *73*, 1417–1423, doi:10.1292/jvms.11-0038.
46. Bianco, C.; Visser, M.J.; Pluut, O.A.; Svetličić, V.; Pletikapić, G.; Jakasa, I.; Riethmuller, C.; Adami, G.; Filon, F.L.; Schwegler-Berry, D.; et al. Characterization of Silver Particles in the Stratum Corneum of Healthy Subjects and Atopic Dermatitis Patients Dermally Exposed to a Silver-Containing Garment. *Nanotoxicology* **2016**, *10*, 1480–1491, doi:10.1080/17435390.2016.1235739.
47. George, R.; Merten, S.; Wang, T.T.; Kennedy, P.; Maitz, P. In Vivo Analysis of Dermal and Systemic Absorption of Silver Nanoparticles through Healthy Human Skin. *Australas. J. Dermatol.* **2014**, *55*, 185–190, doi:10.1111/ajd.12101.
48. Sung, J.H.; Ji, J.H.; Park, J.D.; Song, M.Y.; Song, K.S.; Ryu, H.R.; Yoon, J.U.; Jeon, K.S.; Jeong, J.; Han, B.S.; et al. Subchronic Inhalation Toxicity of Gold Nanoparticles. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*, 16, doi:10.1186/1743-8977-8-16.
49. Yang, P.; Huang, S.; Xu, A. Chapter 8 - The Oxidative Burst System in *Amphioxus*. In *Amphioxus Immunity*; Xu, A., Ed.; Academic Press, 2016; pp. 153–165 ISBN 978-0-12-849903-0.

50. Kreyling, W.G.; Möller, W.; Holzwarth, U.; Hirn, S.; Wenk, A.; Schleh, C.; Schäffler, M.; Haberl, N.; Gibson, N.; Schittny, J.C. Age-Dependent Rat Lung Deposition Patterns of Inhaled 20 Nanometer Gold Nanoparticles and Their Quantitative Biokinetics in Adult Rats. *ACS Nano* **2018**, *12*, 7771–7790, doi:10.1021/acsnano.8b01826.
51. Miller, M.R.; Raftis, J.B.; Langrish, J.P.; McLean, S.G.; Samutrtai, P.; Connell, S.P.; Wilson, S.; Vesey, A.T.; Fokkens, P.H.B.; Boere, A.J.F.; et al. Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease. *ACS Nano* **2017**, *11*, 4542–4552, doi:10.1021/acsnano.6b08551.
52. Bednarski, M.; Dudek, M.; Knutelska, J.; Nowiński, L.; Sapa, J.; Zygmunt, M.; Nowak, G.; Luty-Błocho, M.; Wojnicki, M.; Fitzner, K.; et al. The Influence of the Route of Administration of Gold Nanoparticles on Their Tissue Distribution and Basic Biochemical Parameters: In Vivo Studies. *Pharmacol. Rep. PR* **2015**, *67*, 405–409, doi:10.1016/j.pharep.2014.10.019.
53. Zhu, S.; Jiang, X.; Boudreau, M.D.; Feng, G.; Miao, Y.; Dong, S.; Wu, H.; Zeng, M.; Yin, J.-J. Orally Administered Gold Nanoparticles Protect against Colitis by Attenuating Toll-like Receptor 4- and Reactive Oxygen/Nitrogen Species-Mediated Inflammatory Responses but Could Induce Gut Dysbiosis in Mice. *J. Nanobiotechnology* **2018**, *16*, 86, doi:10.1186/s12951-018-0415-5.
54. Fernandes, R.; Smyth, N.R.; Muskens, O.L.; Nitti, S.; Heuer-Jungemann, A.; Arderm-Jones, M.R.; Kanaras, A.G. Interactions of Skin with Gold Nanoparticles of Different Surface Charge, Shape, and Functionality. *Small* **2015**, *11*, 713–721, doi:https://doi.org/10.1002/sml.201401913.
55. Raju, G.; Katiyar, N.; Vadukumpully, S.; Shankarappa, S.A. Penetration of Gold Nanoparticles across the Stratum Corneum Layer of Thick-Skin. *J. Dermatol. Sci.* **2018**, *89*, 146–154, doi:10.1016/j.jdermsci.2017.11.001.
56. Witter, A.R.; Okunnu, B.M.; Berg, R.E. The Essential Role of Neutrophils During Infection with the Intracellular Bacterial Pathogen *Listeria Monocytogenes*. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **2016**, *197*, 1557–1565, doi:10.4049/jimmunol.1600599.
57. AshaRani, P.V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M.P.; Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009**, *3*, 279–290, doi:10.1021/nn800596w.
58. Bai, X.; Ng, K.K.-H.; Hu, J.J.; Ye, S.; Yang, D. Small-Molecule-Based Fluorescent Sensors for Selective Detection of Reactive Oxygen Species in Biological Systems. *Annu. Rev. Biochem.* **2019**, *88*, 605–633, doi:10.1146/annurev-biochem-013118-111754.
59. Barcińska, E.; Wierzbicka, J.; Zauszkiewicz-Pawlak, A.; Jacewicz, D.; Dabrowska, A.; Inkielewicz-Stepniak, I. Role of Oxidative and Nitro-Oxidative Damage in Silver Nanoparticles Cytotoxic Effect against Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, *2018*, 8251961, doi:10.1155/2018/8251961.
60. Haase, A.; Rott, S.; Manton, A.; Graf, P.; Plendl, J.; Thünemann, A.F.; Meier, W.P.; Taubert, A.; Luch, A.; Reiser, G. Effects of Silver Nanoparticles on Primary Mixed Neural Cell Cultures: Uptake, Oxidative Stress and Acute Calcium Responses. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* **2012**, *126*, 457–468, doi:10.1093/toxsci/kfs003.
61. Koss-Mikołajczyk, I.; Baranowska, M.; Namieśnik, J.; Bartoszek, A. Metody Oznaczania Właściwości Przeciwtleniających Fitozwiązków w Systemach Komórkowych z Wykorzystaniem Zjawiska Fluorescencji/Luminescencji. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **2017**, *71*, 602–617, doi:10.5604/01.3001.0010.3841.
62. Ma, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 401–426, doi:10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320.
63. Małaczewska, J. Cytotoksyczność Nanocząstek Srebra. *Med. Weter.* **2010**, *66*, 833–838.
64. Xia, T.; Kovochich, M.; Brant, J.; Hotze, M.; Sempf, J.; Oberley, T.; Sioutas, C.; Yeh, J.I.; Wiesner, M.R.; Nel, A.E. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles to Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 1794–1807, doi:10.1021/nl061025k.
65. Yoshikawa, T.; Naito, Y. What Is Oxidative Stress? *JMAJ* **2002**, *45*, 271–276.

66. Zielińska-Przyjemska, M.; Olejnik, A.; Grajek, W. Wpływ soku z buraka ćwikłowego i aronii in vitro na metabolizm tlenowy i apoptozę ludzkich granulocytów obojętnochłonnych. *ŻYWNOŚĆ Nauka Technol. Jakość* **2007**, *2*, 174–186.
67. Reth, M. Hydrogen Peroxide as Second Messenger in Lymphocyte Activation. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 1129–1134, doi:10.1038/ni1202-1129.
68. He, W.; Zhou, Y.-T.; Wamer, W.G.; Hu, X.; Wu, X.; Zheng, Z.; Boudreau, M.D.; Yin, J.-J. Intrinsic Catalytic Activity of Au Nanoparticles with Respect to Hydrogen Peroxide Decomposition and Superoxide Scavenging. *Biomaterials* **2013**, *34*, 765–773, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.10.010.
69. Wu, Y.; Nie, F. Caspase-1 Assay Based on Peptide and Luminol Labeled Gold Nanoparticle as Chemiluminescence Probe Coupling Magnetic Separation Technology. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, *220*, 481–484, doi:10.1016/j.snb.2015.05.077.
70. Simard, J.-C.; Vallieres, F.; de Liz, R.; Lavastre, V.; Girard, D. Silver Nanoparticles Induce Degradation of the Endoplasmic Reticulum Stress Sensor Activating Transcription Factor-6 Leading to Activation of the NLRP-3 Inflammasome. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 5926–5939, doi:10.1074/jbc.M114.610899.
71. Bergsbaken, T.; Fink, S.L.; Cookson, B.T. Pyroptosis: Host Cell Death and Inflammation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 99–109, doi:10.1038/nrmicro2070.
72. FAM FLICA® Caspase-1 (WEHD) Assay Kit Available online: <http://immunochemistry.com/product/fam-flica-caspase-1-assay/> (accessed on 19 August 2021).
73. Kaneko, N.; Kurata, M.; Yamamoto, T.; Morikawa, S.; Masumoto, J. The Role of Interleukin-1 in General Pathology. *Inflamm. Regen.* **2019**, *39*, 12, doi:10.1186/s41232-019-0101-5.
74. Świerczyński, M.; Fichna, J. Inflammasom NLRP3 jako czynnik sprawczy i ochronny w patogenezie nieswoistych chorób zapalnych jelit. *Postępy Biochem.* **2021**, *67*, 44–53, doi:10.18388/pb.2020_354.
75. Mishra, A.R.; Zheng, J.; Tang, X.; Goering, P.L. Silver Nanoparticle-Induced Autophagic-Lysosomal Disruption and NLRP3-Inflammasome Activation in HepG2 Cells Is Size-Dependent. *Toxicol. Sci.* **2016**, *150*, 473–487, doi:10.1093/toxsci/kfw011.
76. Latz, E.; Xiao, T.S.; Stutz, A. Activation and Regulation of the Inflammasomes. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 397–411, doi:10.1038/nri3452.
77. Murphy, A.; Casey, A.; Byrne, G.; Chambers, G.; Howe, O. Silver Nanoparticles Induce Pro-Inflammatory Gene Expression and Inflammasome Activation in Human Monocytes. *J. Appl. Toxicol.* **2016**, *36*, 1311–1320, doi:10.1002/jat.3315.
78. He, Z.; Li, C.; Zhang, X.; Zhong, R.; Wang, H.; Liu, J.; Du, L. The Effects of Gold Nanoparticles on the Human Blood Functions. *Artif. Cells Nanomedicine Biotechnol.* **2018**, *46*, 720–726, doi:10.1080/21691401.2018.1468769.
79. Wang, Z.; Li, J.; Cho, J.; Malik, A.B. Prevention of Vascular Inflammation by Nanoparticle Targeting of Adherent Neutrophils. *Nat. Nanotechnol.* **2014**, *9*, 204–210, doi:10.1038/nnano.2014.17.
80. Chen, S.; Chen, S.; Zeng, Y.; Lin, L.; Wu, C.; Ke, Y.; Liu, G. Size-Dependent Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Dictate Interleukin-1 β Release from Mouse Bone Marrow-Derived Macrophages. *J. Appl. Toxicol.* **2018**, *38*, 978–986, doi:10.1002/jat.3606.
81. Yang, E.-J.; Kim, S.; Kim, J.S.; Choi, I.-H. Inflammasome Formation and IL-1 β Release by Human Blood Monocytes in Response to Silver Nanoparticles. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6858–6867, doi:10.1016/j.biomaterials.2012.06.016.
82. Dinarello, C.A. Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. *Blood* **1996**, *87*, 2095–2147.
83. Loiarro, M.; Ruggiero, V.; Sette, C. Targeting TLR/IL-1R Signalling in Human Diseases. *Mediators Inflamm.* **2010**, *2010*, 674363, doi:10.1155/2010/674363.
84. Sumbayev, V.V.; Yasinska, I.M.; Garcia, C.P.; Gilliland, D.; Lall, G.S.; Gibbs, B.F.; Bonsall, D.R.; Varani, L.; Rossi, F.; Calzolari, L. Gold Nanoparticles Downregulate Interleukin-1 β -Induced Pro-Inflammatory Responses. *Small* **2013**, *9*, 472–477, doi:10.1002/smll.201201528.

85. Thornberry, N.A.; Bull, H.G.; Calaycay, J.R.; Chapman, K.T.; Howard, A.D.; Kostura, M.J.; Miller, D.K.; Molineaux, S.M.; Weidner, J.R.; Aunins, J. A Novel Heterodimeric Cysteine Protease Is Required for Interleukin-1 Beta Processing in Monocytes. *Nature* **1992**, *356*, 768–774, doi:10.1038/356768a0.
86. Marsich, E.; Bellomo, F.; Turco, G.; Travan, A.; Donati, I.; Paoletti, S. Nano-Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering Containing Silver Nanoparticles: Preparation, Characterization and Biological Properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 1799–1807, doi:10.1007/s10856-013-4923-4.
87. Lankveld, D.P.K.; Oomen, A.G.; Krystek, P.; Neigh, A.; Troost – de Jong, A.; Noorlander, C.W.; Van Eijkeren, J.C.H.; Geertsma, R.E.; De Jong, W.H. The Kinetics of the Tissue Distribution of Silver Nanoparticles of Different Sizes. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8350–8361, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.07.045.
88. Takenaka, S.; Karg, E.; Roth, C.; Schulz, H.; Ziesenis, A.; Heinzmann, U.; Schramel, P.; Heyder, J. Pulmonary and Systemic Distribution of Inhaled Ultrafine Silver Particles in Rats. *Environ. Health Perspect.* **2001**, *109*, 547–551, doi:10.1289/ehp.01109s4547.
89. Austin, C.A.; Umbreit, T.H.; Brown, K.M.; Barber, D.S.; Dair, B.J.; Francke-Carroll, S.; Feswick, A.; Saint-Louis, M.A.; Hikawa, H.; Siebein, K.N.; et al. Distribution of Silver Nanoparticles in Pregnant Mice and Developing Embryos. *Nanotoxicology* **2012**, *6*, 912–922, doi:10.3109/17435390.2011.626539.
90. Austin, C.A.; Hinkley, G.K.; Mishra, A.R.; Zhang, Q.; Umbreit, T.H.; Betz, M.W.; E. Wildt, B.; Casey, B.J.; Francke-Carroll, S.; Hussain, S.M.; et al. Distribution and Accumulation of 10 Nm Silver Nanoparticles in Maternal Tissues and Visceral Yolk Sac of Pregnant Mice, and a Potential Effect on Embryo Growth. *Nanotoxicology* **2016**, *10*, 654–661, doi:10.3109/17435390.2015.1107143.
91. Holbrook, R.D.; Rykaczewski, K.; Staymates, M.E. Dynamics of Silver Nanoparticle Release from Wound Dressings Revealed via in Situ Nanoscale Imaging. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2014**, *25*, 2481–2489, doi:10.1007/s10856-014-5265-6.
92. Rigo, C.; Roman, M.; Munivrana, I.; Vindigni, V.; Azzena, B.; Barbante, C.; Cairns, W.R.L. Characterization and Evaluation of Silver Release from Four Different Dressings Used in Burns Care. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* **2012**, *38*, 1131–1142, doi:10.1016/j.burns.2012.06.013.
93. Sussman, E.M.; Jayanti, P.; Dair, B.J.; Casey, B.J. Assessment of Total Silver and Silver Nanoparticle Extraction from Medical Devices. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, *85*, 10–19, doi:10.1016/j.fct.2015.08.013.
94. Habibullah, G.; Viktorova, J.; Ruml, T. Current Strategies for Noble Metal Nanoparticle Synthesis. *Nanoscale Res. Lett.* **2021**, *16*, 47, doi:10.1186/s11671-021-03480-8.
95. Błaszkiwicz, P.; Kotkowiak, M.; Dudkowiak, A. Fluorescence Quenching and Energy Transfer in a System of Hybrid Laser Dye and Functionalized Gold Nanoparticles. *J. Lumin.* **2017**, *183*, 303–310, doi:10.1016/j.jlumin.2016.11.023.
96. Rahme, K.; Chen, L.; Hobbs, R.G.; Morris, M.A.; O'Driscoll, C.; Holmes, J.D. PEGylated Gold Nanoparticles: Polymer Quantification as a Function of PEG Lengths and Nanoparticle Dimensions. *RSC Adv.* **2013**, *3*, 6085–6094, doi:10.1039/C3RA22739A.
97. Błaszkiwicz, P.; Kotkowiak, M.; Coy, E.; Dudkowiak, A. Tailoring Fluorescence and Singlet Oxygen Generation of a Chlorophyll Derivative and Gold Nanorods via a Silica Shell. *J. Phys. Chem. C* **2020**, *124*, 2088–2095, doi:10.1021/acs.jpcc.9b08204.
98. Błaszkiwicz, P.; Kotkowiak, M.; Coy, E.; Dudkowiak, A. Laser-Induced Optoacoustic Spectroscopy Studies of Inorganic Functionalized Metallic Nanorods. *J. Phys. Chem. C* **2019**, *123*, 27181–27186, doi:10.1021/acs.jpcc.9b09418.
99. Nikoobakht, B.; El-Sayed, M.A. Preparation and Growth Mechanism of Gold Nanorods (NRs) Using Seed-Mediated Growth Method. *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 1957–1962, doi:10.1021/cm020732l.
100. Bigall, N.C.; Reitzig, M.; Naumann, W.; Simon, P.; van Pée, K.-H.; Eychmüller, A. Fungal Templates for Noble-Metal Nanoparticles and Their Application in Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7876–7879, doi:10.1002/anie.200801802.

101. Mahmudin, L.; Suharyadi, E.; Utomo, A.B.S.; Abraha, K. Optical Properties of Silver Nanoparticles for Surface Plasmon Resonance (SPR)-Based Biosensor Applications. *J. Mod. Phys.* **2015**, *06*, 1071, doi:10.4236/jmp.2015.68111.
102. Bamal, D.; Singh, A.; Chaudhary, G.; Kumar, M.; Singh, M.; Rani, N.; Mundlia, P.; Sehrawat, A.R. Silver Nanoparticles Biosynthesis, Characterization, Antimicrobial Activities, Applications, Cytotoxicity and Safety Issues: An Updated Review. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 2086, doi:10.3390/nano11082086.
103. Instruction of Use BURSTEST™,(PHAGOBURST™),CE/IVD - 341058 | BD Biosciences-Europe Available online: <https://www.bdbiosciences.com/eu/reagents/clinical/systems-kits/macrophage-functionality-kits/burtest-phagoburst/p/341058> (accessed on 18 May 2021).
104. Skotny, A.; Pucińska, J. Współczesna cytometria przepływowa. *Acta Bio-Opt. Inform. Medica Inż. Biomed.* **2013**, Vol. 19.
105. Kępska, M.; Futoma-Kołoch, B. Test immunoenzymatyczny ELISA – zasada działania i optymalizacja reakcji. *Lab. Med.* **2018**, 42–49.
106. Tabatabaei, M.S.; Islam, R.; Ahmed, M. Applications of Gold Nanoparticles in ELISA, PCR, and Immuno-PCR Assays: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2021**, *1143*, 250–266, doi:10.1016/j.aca.2020.08.030.
107. Aydin, S. A Short History, Principles, and Types of ELISA, and Our Laboratory Experience with Peptide/Protein Analyses Using ELISA. *Peptides* **2015**, *72*, 4–15, doi:10.1016/j.peptides.2015.04.012.
108. Yazdani, M. Concerns in the Application of Fluorescent Probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to Measure Reactive Oxygen Species in Vitro. *Toxicol. In Vitro* **2015**, *30*, 578–582, doi:10.1016/j.tiv.2015.08.010.
109. Lun, A.; Schmitt, M.; Renz, H. Phagocytosis and Oxidative Burst: Reference Values for Flow Cytometric Assays Independent of Age. *Clin. Chem.* **2000**, *46*, 1836–1839, doi:10.1093/clinchem/46.11.1836.
110. EIAab: The Top Notch Elisa Kit Manufacturers | Find Out the Best Ever Elisa Sets Suppliers at EIAab Available online: http://www.eiaab.com/entries/steps/ELISA%20Kit/IL1B_HUMAN/Human (accessed on 18 August 2021).
111. Fajstavr, D.; Karasová, A.; Michalcová, A.; Ulbrich, P.; Slepícková Kasálková, N.; Siegel, J.; Švorčík, V.; Slepíčka, P. PEGylated Gold Nanoparticles Grafted with N-Acetyl-L-Cysteine for Polymer Modification. *Nanomaterials* **2021**, *11*, 1434, doi:10.3390/nano11061434.
112. Orlando, A.; Colombo, M.; Prosperi, D.; Corsi, F.; Panariti, A.; Rivolta, I.; Masserini, M.; Cazzaniga, E. Evaluation of Gold Nanoparticles Biocompatibility: A Multiparametric Study on Cultured Endothelial Cells and Macrophages. *J. Nanoparticle Res.* **2016**, *18*, 58, doi:10.1007/s11051-016-3359-4.
113. Uchiyama, M.K.; Deda, D.K.; Rodrigues, S.F. de P.; Drewes, C.C.; Bolonheis, S.M.; Kiyohara, P.K.; Toledo, S.P. de; Colli, W.; Araki, K.; Farsky, S.H.P. In Vivo and In Vitro Toxicity and Anti-Inflammatory Properties of Gold Nanoparticle Bioconjugates to the Vascular System. *Toxicol. Sci.* **2014**, *142*, 497–507, doi:10.1093/toxsci/kfu202.
114. Zhang, X.; Guo, X.; Kang, X.; Yang, H.; Guo, W.; Guan, L.; Wu, H.; Du, L. Surface Functionalization of Pegylated Gold Nanoparticles with Antioxidants Suppresses Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Neurotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **2020**, *33*, 1195–1205, doi:10.1021/acs.chemrestox.9b00368.
115. Harris, J.M.; Martin, N.E.; Modi, M. Pegylation: A Novel Process for Modifying Pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **2001**, *40*, 539–551, doi:10.2165/00003088-200140070-00005.
116. Kah, J.C.Y.; Wong, K.Y.; Neoh, K.G.; Song, J.H.; Fu, J.W.P.; Mhaisalkar, S.; Olivo, M.; Sheppard, C.J.R. Critical Parameters in the Pegylation of Gold Nanoshells for Biomedical Applications: An in Vitro Macrophage Study. *J. Drug Target.* **2009**, *17*, 181–193, doi:10.1080/10611860802582442.

117. Buzea, C.; Pacheco, I.I.; Robbie, K. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases* **2007**, *2*, MR17-71, doi:10.1116/1.2815690.
118. Awasthi, K.K.; Awasthi, A.; Kumar, N.; Roy, P.; Awasthi, K.; John, P.J. Silver Nanoparticle Induced Cytotoxicity, Oxidative Stress, and DNA Damage in CHO Cells. *J. Nanoparticle Res.* **2013**, *15*, 1898, doi:10.1007/s11051-013-1898-5.
119. Foldbjerg, R.; Dang, D.A.; Autrup, H. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in the Human Lung Cancer Cell Line, A549. *Arch. Toxicol.* **2011**, *85*, 743–750, doi:10.1007/s00204-010-0545-5.
120. Piao, M.J.; Kang, K.A.; Lee, I.K.; Kim, H.S.; Kim, S.; Choi, J.Y.; Choi, J.; Hyun, J.W. Silver Nanoparticles Induce Oxidative Cell Damage in Human Liver Cells through Inhibition of Reduced Glutathione and Induction of Mitochondria-Involved Apoptosis. *Toxicol. Lett.* **2011**, *201*, 92–100, doi:10.1016/j.toxlet.2010.12.010.
121. Shrivastava, R.; Kushwaha, P.; Bhutia, Y.C.; Flora, S. Oxidative Stress Following Exposure to Silver and Gold Nanoparticles in Mice. *Toxicol. Ind. Health* **2016**, *32*, 1391–1404, doi:10.1177/0748233714562623.
122. Singh, R.P.; Ramarao, P. Cellular Uptake, Intracellular Trafficking and Cytotoxicity of Silver Nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **2012**, *213*, 249–259, doi:10.1016/j.toxlet.2012.07.009.
123. Arora, S.; Jain, J.; Rajwade, J.M.; Paknikar, K.M. Cellular Responses Induced by Silver Nanoparticles: In Vitro Studies. *Toxicol. Lett.* **2008**, *179*, 93–100, doi:10.1016/j.toxlet.2008.04.009.
124. Park, E.-J.; Yi, J.; Kim, Y.; Choi, K.; Park, K. Silver Nanoparticles Induce Cytotoxicity by a Trojan-Horse Type Mechanism. *Toxicol. In Vitro* **2010**, *24*, 872–878, doi:10.1016/j.tiv.2009.12.001.
125. Sriram, M.I.; Kalishwaralal, K.; Barathmanikanth, S.; Gurunathani, S. Size-Based Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Bovine Retinal Endothelial Cells. *Nanosci. Methods* **2012**, *1*, 56–77, doi:10.1080/17458080.2010.547878.
126. Kim, S.; Choi, J.E.; Choi, J.; Chung, K.-H.; Park, K.; Yi, J.; Ryu, D.-Y. Oxidative Stress-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles in Human Hepatoma Cells. *Toxicol. In Vitro* **2009**, *23*, 1076–1084, doi:10.1016/j.tiv.2009.06.001.
127. Lu, S.; Duffin, R.; Poland, C.; Daly, P.; Murphy, F.; Drost, E.; Macnee, W.; Stone, V.; Donaldson, K. Efficacy of Simple Short-Term in Vitro Assays for Predicting the Potential of Metal Oxide Nanoparticles to Cause Pulmonary Inflammation. *Environ. Health Perspect.* **2009**, *117*, 241–247, doi:10.1289/ehp.11811.
128. Mammucari, C.; Rizzuto, R. Signaling Pathways in Mitochondrial Dysfunction and Aging. *Mech. Ageing Dev.* **2010**, *131*, 536–543, doi:10.1016/j.mad.2010.07.003.
129. Mikhailova, E.O. Silver Nanoparticles: Mechanism of Action and Probable Bio-Application. *J. Funct. Biomater.* **2020**, *11*, 84, doi:10.3390/jfb11040084.
130. Carlson, C.; Hussain, S.M.; Schrand, A.M.; Braydich-Stolle, L.K.; Hess, K.L.; Jones, R.L.; Schlager, J.J. Unique Cellular Interaction of Silver Nanoparticles: Size-Dependent Generation of Reactive Oxygen Species. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 13608–13619, doi:10.1021/jp712087m.
131. Kang, K.; Jung, H.; Lim, J.-S. Cell Death by Polyvinylpyrrolidone-Coated Silver Nanoparticles Is Mediated by ROS-Dependent Signaling. *Biomol. Ther.* **2012**, *20*, 399–405, doi:10.4062/biomolther.2012.20.4.399.
132. Li, Y.; Guo, M.; Lin, Z.; Zhao, M.; Xiao, M.; Wang, C.; Xu, T.; Chen, T.; Zhu, B. Polyethylenimine-Functionalized Silver Nanoparticle-Based Co-Delivery of Paclitaxel to Induce HepG2 Cell Apoptosis. *Int. J. Nanomedicine* **2016**, *Volume 11*, 6693–6702, doi:10.2147/IJN.S122666.
133. Liu, W.; Wu, Y.; Wang, C.; Li, H.C.; Wang, T.; Liao, C.Y.; Cui, L.; Zhou, Q.F.; Yan, B.; Jiang, G.B. Impact of Silver Nanoparticles on Human Cells: Effect of Particle Size. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 319–330, doi:10.3109/17435390.2010.483745.
134. Zhornik, A.; Baranova, L.; Volotovskii, I.; Chizhik, S.; Drozd, E.; Sudas, M.; Ngo, Q.B.; Nguyen, H.C.; Huynh, T.H.; Dao, T.H. Interaction of Nanosilver Particles with Human Lymphocyte Cells. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **2015**, *6*, 025003, doi:10.1088/2043-6262/6/2/025003.

135. Freitas, M.; Lucas, M.; Sousa, A.; Soares, T.; Ribeiro, D.; Carvalho, F.; Fernandes, E. Small-Size Silver Nanoparticles Stimulate Neutrophil Oxidative Burst through an Increase of Intracellular Calcium Levels. *World Acad. Sci. J.* **2020**, *2*, 1–1, doi:10.3892/wasj.2020.46.
136. Soares, T.; Ribeiro, D.; Proença, C.; Chisté, R.C.; Fernandes, E.; Freitas, M. Size-Dependent Cytotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Neutrophils Assessed by Multiple Analytical Approaches. *Life Sci.* **2016**, *145*, 247–254, doi:10.1016/j.lfs.2015.12.046.
137. Nguyen, K.C.; Seligy, V.L.; Massarsky, A.; Moon, T.W.; Rippstein, P.; Tan, J.; Tayabali, A.F. Comparison of Toxicity of Uncoated and Coated Silver Nanoparticles. *J. Phys. Conf. Ser.* **2013**, *429*, 012025, doi:10.1088/1742-6596/429/1/012025.
138. Rinna, A.; Magdolenova, Z.; Hudecova, A.; Kruszewski, M.; Refsnes, M.; Dusinska, M. Effect of Silver Nanoparticles on Mitogen-Activated Protein Kinases Activation: Role of Reactive Oxygen Species and Implication in DNA Damage. *Mutagenesis* **2015**, *30*, 59–66, doi:10.1093/mutage/geu057.
139. Carlander, U.; Midander, K.; Hedberg, Y.S.; Johanson, G.; Bottai, M.; Karlsson, H.L. Macrophage-Assisted Dissolution of Gold Nanoparticles. *ACS Appl. Bio Mater.* **2019**, *2*, 1006–1016, doi:10.1021/acsabm.8b00537.
140. Freebern, W.J.; Bigwarfe, T.J.; Price, K.D.; Haggerty, H.G. Methods: Implementation of in Vitro and Ex Vivo Phagocytosis and Respiratory Burst Function Assessments in Safety Testing. *J. Immunotoxicol.* **2013**, *10*, 106–117, doi:10.3109/1547691X.2012.736427.
141. Haase, H.; Fahmi, A.; Mahltig, B. Impact of Silver Nanoparticles and Silver Ions on Innate Immune Cells. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2014**, *10*, 1146–1156, doi:10.1166/jbn.2014.1784.
142. Bigagli, E.; Cinci, L.; Paccosi, S.; Parenti, A.; D'Ambrosio, M.; Luceri, C. Nutritionally Relevant Concentrations of Resveratrol and Hydroxytyrosol Mitigate Oxidative Burst of Human Granulocytes and Monocytes and the Production of Pro-Inflammatory Mediators in LPS-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Int. Immunopharmacol.* **2017**, *43*, 147–155, doi:10.1016/j.intimp.2016.12.012.
143. Biermann, M.H.C.; Podolska, M.J.; Knopf, J.; Reinwald, C.; Weidner, D.; Maueröder, C.; Hahn, J.; Kienhöfer, D.; Barras, A.; Boukherroub, R.; et al. Oxidative Burst-Dependent NETosis Is Implicated in the Resolution of Necrosis-Associated Sterile Inflammation. *Front. Immunol.* **2016**, *7*, 557, doi:10.3389/fimmu.2016.00557.
144. Chen, Y.; Junger, W.G. Measurement of Oxidative Burst in Neutrophils. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2012**, *844*, 115–124, doi:10.1007/978-1-61779-527-5_8.
145. Blüml, S.; Rosc, B.; Lorincz, A.; Seyerl, M.; Kirchberger, S.; Oskolkova, O.; Bochkov, V.N.; Majdic, O.; Ligeti, E.; Stöckl, J. The Oxidation State of Phospholipids Controls the Oxidative Burst in Neutrophil Granulocytes. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 4347–4353, doi:10.4049/jimmunol.181.6.4347.
146. Prietl, B.; Meindl, C.; Roblegg, E.; Pieber, T.R.; Lanzer, G.; Fröhlich, E. Nano-Sized and Micro-Sized Polystyrene Particles Affect Phagocyte Function. *Cell Biol. Toxicol.* **2014**, *30*, 1–16, doi:10.1007/s10565-013-9265-y.
147. Poirier, M.; Simard, J.-C.; Girard, D. Silver Nanoparticles of 70 Nm and 20 Nm Affect Differently the Biology of Human Neutrophils. *J. Immunotoxicol.* **2016**, *13*, 375–385, doi:10.3109/1547691X.2015.1106622.
148. Miao, E.A.; Rajan, J.V.; Aderem, A. Caspase-1 Induced Pyroptotic Cell Death. *Immunol. Rev.* **2011**, *243*, 206–214, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01044.x.
149. Kreuzaler, P.A.; Staniszewska, A.D.; Li, W.; Omidvar, N.; Kedjouar, B.; Turkson, J.; Poli, V.; Flavell, R.A.; Clarkson, R.W.E.; Watson, C.J. Stat3 Controls Lysosomal-Mediated Cell Death in Vivo. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 303–309, doi:10.1038/ncb2171.
150. Mamun, A.A.; Wu, Y.; Nasrin, F.; Akter, A.; Taniya, M.A.; Munir, F.; Jia, C.; Xiao, J. Role of Pyroptosis in Diabetes and Its Therapeutic Implications. *J. Inflamm. Res.* **2021**, *14*, 2187–2206, doi:10.2147/JIR.S291453.
151. Nel, A.; Xia, T.; Mädler, L.; Li, N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* **2006**, *311*, 622–627, doi:10.1126/science.1114397.

152. Boya, P.; Kroemer, G. Lysosomal Membrane Permeabilization in Cell Death. *Oncogene* **2008**, *27*, 6434–6451, doi:10.1038/onc.2008.310.
153. Zhang, T.; Wang, L.; Chen, Q.; Chen, C. Cytotoxic Potential of Silver Nanoparticles. *Yonsei Med. J.* **2014**, *55*, 283–291, doi:10.3349/ymj.2014.55.2.283.
154. Karan, K.R.; Trumpff, C.; McGill, M.A.; Thomas, J.E.; Sturm, G.; Lauriola, V.; Sloan, R.P.; Rohleder, N.; Kaufman, B.A.; Marsland, A.L.; et al. Mitochondrial Respiratory Capacity Modulates LPS-Induced Inflammatory Signatures in Human Blood. *Brain Behav. Immun. - Health* **2020**, *5*, 100080, doi:10.1016/j.bbih.2020.100080.
155. Strahler, J.; Rohleder, N.; Wolf, J.M. Acute Psychosocial Stress Induces Differential Short-Term Changes in Catecholamine Sensitivity of Stimulated Inflammatory Cytokine Production. *Brain. Behav. Immun.* **2015**, *43*, 139–148, doi:10.1016/j.bbi.2014.07.014.