

CHARAKTERIZÁCIA NANOČASTÍC A ICH VPLYV NA EUKARYOTICKÉ BUNKY A VYŠŠIE RASTLINY

VIERA HRIVNÁKOVÁ^a a AGÁTA FARGAŠOVÁ^b

^a Chemický ústav SAV, Analytické oddelenie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava, ^b Katedra environmentálnej ekológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava
hrivnakovaviera@gmail.com

Došlo 10.7.15, prepracované 16.2.16, prijaté 23.2.16.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Kľúčové slová: nanočastice, toxicita, fytotoxicita, oxidačný stres

Obsah

1. Úvod
2. Charakterizácia a klasifikácia nanočastíc
3. Interakcie nanočastíc a ich vstup do eukaryotických buniek
4. Toxicita nanočastíc
5. Fytotoxicita nanočastíc
 - 5.1. Negatívne účinky nanočastíc na rast a vývin vyšších rastlín
 - 5.2. Pozitívne účinky nanočastíc na rast a vývin vyšších rastlín
6. Oxidačný stres vyvolaný nanočasticami a obranné mechanizmy rastlín
7. Záver

1. Úvod

Vývoj nových technológií vedie v posledných rokoch ku zameraniu pozornosti aj na materiály extrémne malých rozmerov, s akými sme sa doteraz nestretávali^{1,2}. Možnosť manipulovať s hmotou na úrovni niekoľkých nanometrov sa pomaly, ale isto stáva bežnou praxou. Množstvo takto vyvinutých materiálov sa neustále zvyšuje. Nanomateriály a nanočastice vykazujú vlastnosti, ktoré ich makroskopické analógy buď nemajú alebo u nich ešte vôbec neboli pozorované. Tieto vlastnosti majú svoj pôvod v takých kvantových efektoch, akými sú Quantum confinement³, kvantový Halloov efekt⁴ alebo supermagnetizmus⁵. Mnoho z týchto efektov a vlastností sa experimentálnymi metódami študuje len ťažko, a preto sa pri ich skúmaní často využívajú počítačové simulácie⁶. Účinky prírodných nanoma-

teriálov na živé organizmy sú viac menej známe⁷. Problémy nastávajú pri synteticky pripravených nanočasticách, ktoré boli až donedávna produkované a sledované v kontrolovaných laboratórnych podmienkach, kde nedochádzalo k ich kontaktu s biotou⁸. Implementácia nanočastíc mimo laboratórnych podmienok do priemyselných procesov, bežne dostupných technológií a produktov⁹ ich bezprostredne dáva do kontaktu so životným prostredím a organizmami, ktoré sa v ňom nachádzajú¹⁰, čo vyvoláva zvýšený záujem nielen o ich toxicitu, ale aj o ich interakcie s bunkovými štruktúrami a spôsob metabolizácie v živých organizmoch. Prehľad o ekotoxikologických účinkoch a vlastnostiach prírodných a antropogénnych nanočastíc a nanomateriálov podávajú vo svojich prácach viacerí autori^{11–13}.

My sa v rámci tohto článku po uvedení do problematiky týkajúcej sa nanočastíc zameriame predovšetkým na výber dostupných informácií týkajúcich sa ich toxicity na eukaryotické bunky a vyššie rastliny.

2. Charakterizácia a klasifikácia nanočastíc

Na základe klauzuly Európskej komisie uvádza *Lidén*¹⁴, že pojem nanomateriál musí spĺňať najmenej jednu z nasledujúcich kritérií: (1) skladá sa z častíc veľkosti 1 až 100 nm s jednou alebo viacerými dimenziami; (2) obsahuje vnútorné alebo povrchové štruktúry jednej alebo viacerých dimenzií v rozmedzí veľkosti 1–100 nm so špecifickým povrchom $> 60 \text{ m}^2 \text{ cm}^{-3}$ s výnimkou materiálov pozostávajúcich z častíc veľkosti 1 nm. Pod pojmom častica rozumieme časť hmoty s definovanými fyzickými hranicami. Nanočastice boli teda definované ako častice najmenej jednej dimenzie s veľkosťou 1–100 nm (cit.¹⁵). Z hľadiska ekotoxikológie hovoríme o nanomateriáloch aj v prípade agregátov, ktorých veľkosť sa pohybuje rádovo v stovkách nanometrov¹⁶.

Prístupov ku klasifikácii nanočastíc je viacero. Vzhľadom na ich pôvod môžu byť zaradené do troch základných skupín: (1) nanočastice prírodné; (2) umelo syntetizované a (3) náhodne vytvorené ľudskou aktivitou¹⁷. Nanočastice náhodne vytvorené ľudskou činnosťou sú napr. výfukové plyny, výpary uvoľňované pri zváraní alebo nanočastice prítomné v priemyselných odpadových vodách. Práve nanočastice vytvorené cieľenou ľudskou činnosťou dali základ jednému z najmodernejších odvetví vedy a technológie. Lin a Xing¹⁸ delia skupinu umelo syntetizovaných nanočastíc do štyroch podskupín:

- a) Materiály založené na uhlíku zahŕňajúce fullerény – zlúčeniny zložené väčšinou z desiatok atómov uhlíka, všeobecne označované ako C₆₀. Majú široké využitie v optike a biomedicíne. Do tejto skupiny patria aj

uhlíkové nanorúrky SWCNT tvorené jednou vrstvou grafénu stočenou do cylindrickej štruktúry s priemerom 1 nm a dĺžkou niekoľko μm a nanorúrky MWCNT, ktoré predstavujú niekoľko koncentrických vrstiev rôznej dĺžky a priemeru¹⁹. Ich využitie v technológiách rôzneho druhu je veľmi bohaté hlavne kvôli ich mechanickým, termickým, fotochemickým a elektrickým vlastnostiam²⁰.

- b) Materiály obsahujúce kov, napr. nanozlato, nanozinok (nano-Zn), nanohliník (nano-Al) a oxidy kovov ako TiO_2 , ZnO a Al_2O_3 . Charakterizuje ich tepelná a elektrická vodivosť²¹. Využívajú sa v potravinárskom priemysle, v rôznych materiáloch, v katalýze²², pri transporte látok v živých systémoch²³, kozmetike²⁴ ako zložky opaľovacích krémov (nano- TiO_2 , ZnO , Fe_3O_4)²⁵, v prímiesiach pohonných hmôt (CeO_2)²⁶ a v posledných rokoch sa výskum zameriaval aj na ich aplikácie v diagnostike vážnych ochorení ako biosenzory²⁷.

Do tejto skupiny nanočastíc patria aj takzvané quantum dots (kvantové body) známe ako polovodičové nanočastice, ku ktorým zaraďujeme napríklad častice CdS , CdSe , CdTe , PbS , ZnS , HgS , GaP , GaAs , InP (cit.²⁸). Ide o častice s veľkosťou od 2–10 nm s výnimočnými elektronickými, optickými, magnetickými a katalytickými vlastnosťami, ktoré sa využívajú napr. v optike ako optické zosilňovače, operačné lasery, pri magnetickej rezonancii (MRI) a v mnohých iných odvetviach²⁹.

- c) Dendrimery predstavujú nanopolyméry zložené z množstva rozvetvených polymérnych jednotiek. Používajú sa predovšetkým vo farmácii ako nosiče účinnej látky v liečivách³⁰.
- d) Materiály kombinujúce viacero typov nanočastíc alebo nanočastice v kombinácii s veľkými objemovými (bulk) materiálmi. Štúdium toxicity týchto typov kompozitov je veľmi komplikované, lebo v nich dochádza ku kombinácii efektov jednotlivých skupín nanočastíc, ktorých účinky často nie sú dostatočne objasnené ani na individuálnej úrovni³⁰.

3. Interakcie nanočastíc a ich vstup do eukaryotických buniek

Transport nanočastíc do bunky teoreticky začína už po ich vstupe zo zdrojov do ekosystému, kde najprv dochádza k interakciám s abiotickým prostredím (voda, pôda, ovzdušie), ktoré často vedú ku zmenám ich povrchových vlastností. Tieto zmeny potom determinujú ďalší osud nanočastíc v prostredí a tým aj ich dostupnosť pre organizmy. Keď sa nanočastica priblíži k organizmu, vzájomné interakcie sa môžu prejaviť na rozhraniach biologických membrán, prípadne môžu viesť až ku vstupu nanočastice do organizmu.

Hoci semipermeabilita bunkovej steny umožňuje transport malých molekúl, transport väčších molekúl pri-

padne agregátov nanočastíc je limitovaný veľkosťou pórov, ktorých priemer sa pohybuje medzi 5–20 nm (cit.³¹).

V momente, keď nanočastice prejdú do bunky, môžu interagovať s rôznymi organelami (napr. endoplazmatickým retikulom, Golgiho aparátom, endo-lyzozomálnym systémom) a ovplyvňovať tak metabolické procesy, ktoré v nich prebiehajú³². Po rozložení vrchného obalu nanočastice, môže kyslé prostredie endozómov nanočasticu doslova naleptať, čo vedie k uvoľňovaniu voľných iónov z povrchu nanočastíc a postupne znižuje priemer jadra nanočastice. V konečnom dôsledku to má za následok úplnú stratu funkčnosti nanočastice – resp. jej charakteristických vlastností ako napr. magnetický moment u kovových nanooxidov alebo stratu fluorescenčných vlastností u polovodičových nanočastíc (tzv. quantum dots). Uvoľnené voľné ióny môžu mať vplyv na homeostázu v bunke, s čím sú spojené ďalšie vedľajšie účinky³³.

Vstup nanočastíc do organizmu môžu sprostredkovať procesy bežne zabezpečujúce príjem molekúl a látok potrebných pre život organizmu³⁴. Jednými z takýchto látok sú napr. aj lipidy a proteíny, pre ich príjem bunka využíva proces nazývaný endocytóza. Nanočastice v nich môžu byť degradované, alebo dochádza k poškodeniu niektorých bunkových mechanizmov, prípadne až k apoptóze bunky³⁵.

Nedávne výskumy ukázali, že nanočastice môžu do eukaryotickej bunky vstupovať nielen cez endo-lyzozomálne dráhy, ale dokonca aj autofágny spôsobom, pri ktorom sa materiál pohlcuje do štruktúr nazývaných autofagozomy³⁶.

4. Toxicita nanočastíc

S rastúcim množstvom aplikácií nanotechnológií v bežnom živote narastá aj množstvo otázok o toxicite a miere nebezpečenstva týchto materiálov. Pri hodnotení toxicity nanomateriálov a nanočastíc je potrebné brať do úvahy ako charakter materiálu, tak aj jeho veľkosť, tvar, povrch, náboj, typ povrchovej úpravy, disperziu častíc, možnosť aglomerácie, agregácie a v neposlednom rade koncentráciu. Pri zvažovaní rizík spojených s nanomateriálmi je potrebné dôkladne poznať aj charakter, vlastnosti a množstvo prímiesí a nečistôt, ktoré materiál obsahuje³⁷. Významnú úlohu tu zohrávajú aj abiotické faktory ako pH, náboj iónov, tvrdosť vody alebo charakter organických zlúčenín, ktoré pôsobia na stupeň a spôsob agregácie¹⁴. Nanočastice sa svojim veľkým špecifickým povrchom a vysokou reaktivitou výrazne odlišujú od bežných častíc, čo môže viesť k zvýšeniu ich toxicity a biologickej dostupnosti³⁸. Veľmi dôležitým parametrom sú z hľadiska toxicity aj povrchové vlastnosti nanočastíc, pretože ovplyvňujú stabilitu a pohyblivosť častíc v koloidných suspenziách alebo ich agregáciu a depozíciu vo vodných systémoch¹³. Schopnosť agregácie a aglomerácie nanočastíc sa pokladá za jeden z aspektov, ktorý môže vyvolávať nejednotnosť vo výsledkoch hodnotenia toxicity. Agregácia a aglomerácia častíc, ktorá je u nanočastíc častým ja-

vom, je teda pomerne veľkou výzvou v štúdiu ich toxicity¹⁰.

Objasnením mechanizmu toxicity určitého typu nanočastíc vznikajú šance na elimináciu alebo čiastočné zníženie ich toxických účinkov.

5. Fytotoxicita nanočastíc

Hoci mechanizmus toxicity nanočastíc zatiaľ nie je celkom objasnený, predpokladá sa, že úzko súvisí s ich chemickým zložením, štruktúrou, veľkosťou a povrchom častíc. Ich toxicita môže byť vyvolaná ako chemickou cestou – uvoľnením toxických iónov, tak aj stresom, ktorý je výsledkom pôsobenia samotných nanočastíc. Nanočastice dokážu interagovať nielen s abiotickým prostredím, do ktorého sa dostávajú, ale aj s biotou, ktorá sa v prostredí vyskytuje. Keďže rastliny tvoria základ každého ekosystému, je sledovanie ich vplyvu práve na vegetáciu veľmi dôležité. Vzájomné interakcie medzi rastlinami a nanočasticami môžu výrazne ovplyvniť ako transport, tak aj osud nanočastíc v životnom prostredí. Vylúčiť sa nedajú ani interakcie s pôdnymi mikroorganizmami žijúcimi v symbióze s koreňmi mnohých rastlín³⁹. Pri hodnotení fytotoxicity zohráva veľmi významnú úlohu aj pôda, lebo jej špecifické vlastnosti výrazne ovplyvňujú biodostupnosť prvkov³³. Nakoľko vyššie rastliny (dvoj- a jednoklíčnolistové) veľmi výrazne reagujú na prítomnosť kontaminantov, vrátane nanočastíc, ktoré sa vyskytujú v ich okolí, sledovaniu interakcií rastlín s nanočasticami z hľadiska toxického účinku sa venovali viacerí autori^{40,18}. Dôležitým faktorom pri prenose nanočastíc do rastlinného organizmu je predovšetkým ich veľkosť, od ktorej priamo závisí schopnosť prechodu cez bunkovú stenu a cytoplazmatickú membránu. Keďže v bunkovej stene sa nachádzajú makropóry (väčšinou okolo 3,5 nm, maximálne 5 nm) a mikropóry (pod 0,5 nm)⁴¹, väčšie nanočastice pravdepodobne do rastlín nemôžu vstupovať. Vplyv nanočastíc na rastliny veľmi výrazne závisí od efektivity ich transportu, translokácie a akumulácie v rastlinných pletivách a organelách buniek. V koreni sa môžu nanočastice pohybovať v medzibunkovom priestore (apoplastom) alebo plazmodezmami buniek (symplastom). Prechodom cez epidermu a kortex koreňa môžu byť nanočastice translokované až do nadzemných častí rastlín (stonka, listy, kvety, plody). Jednou z najrozšírejších priamych metód používaných na lokalizáciu nanočastíc v rastlinných pletivách je transmisná elektrónová mikroskopia⁴².

Najnovšie experimenty poukazujú na skutočnosť, že toxicita spôsobená nanočasticami nie je len výsledkom ich interakcie s rastlinami, ale výrazne závisí aj od vplyvu iónov, ktoré sa z kovových nanočastíc uvoľňujú⁴³. Ak sa táto skutočnosť neberie do úvahy, vedie k určitým pochybnostiam vzhľadom k interpretácii dát. Ak teda chceme hovoriť o pozitívnych alebo negatívnych účinkoch nanočastíc na vývoj, rast alebo produktivitu rastlín, je vždy potrebné zohľadniť aj pôsobenie iónových foriem prípadne kombinácií nanočastíc kovu a jeho iónovej formy⁴⁴.

5.1. Negatívne účinky nanočastíc na rast a vývin vyšších rastlín

Do skupiny nanočastíc s najširším komerčným využitím patria aj vďaka ich silným antimikrobiálnym účinkom nanočastice striebra⁴⁵, ktoré sú toxické nielen pre niektoré druhy baktérií, ale aj pre mnohé iné druhy vyšších organizmov⁴⁰, vrátane rastlín⁴⁶.

Ako uvádzajú Nair a Chung⁴⁷, nano-Ag pôsobiaci počas jedného týždňa (koncentrácia 0; 0,2; 0,5; 1 mg l⁻¹) na *Oryza sativa* výrazne redukovalo dĺžku koreňov o 13,5 (0,2 mg l⁻¹) až 41,4 % (0,5 mg l⁻¹). Veľmi podobné výsledky uvádzajú aj Qian a spol.⁴⁸ pre *Arabidopsis thaliana*. Quian a spol.⁴⁸ a Haytham a Green⁴⁶ popisujú nepriaznivé účinky nanočastíc striebra na rastliny ako zníženie produkcie biomasy, obsahu Chl *a*, Chl *b* a celkového obsahu chlorofylov. Negatívny účinok nano-Ag popísali Barrera a spol.⁴⁹ ako redukcii rastu koreňov *Lactuca sativa* a *Cucumis sativus*. Samotné klíčenie (index klíčenia) však v tomto prípade nebolo významne ovplyvnené. Žiadny vplyv nanočastíc Ag a TiO₂ na rýchlosť klíčenia semien *Solanum lycopersicum* uvádzajú aj Song a spol.⁵⁰. Fytotoxicitu Ag-NČ a AgNO₃ potvrdili pre viaceré druhy vyšších rastlín aj Yin a spol.⁵¹ a Ma a spol.⁵², ktorí zistili, že Ag-NČ už v koncentrácii 1 mg l⁻¹ pôsobia na semenáčky *A. thaliana* toxicky, pričom toxicita závisí od koncentrácie a rozmeru častíc. Autori predpokladajú, že poškodenie koreňov je výsledkom adsorpcie Ag-NČ na bunkovú stenu alebo ich väzby na niektorú z jej štruktúr a/alebo väzbu na sekundárne metabolity. Inhibičné účinky vykazujú aj nanočastice zinku a oxidu zinočnatého. Lee a spol.⁵³ uvádzajú pri *A. thaliana* 94% inhibíciu klíčenia semien a spomalenie rastu nadzemných častí pri koncentrácii 400 mg l⁻¹ ZnO-NČ, pričom koncentrácia 500 mg l⁻¹ klíčenie semien úplne zastavila (100% inhibícia). Pre reďkev *Raphanus sativus* je 50% inhibícia rastu (IC₅₀) uvádzaná už pri koncentrácii okolo 50 mg l⁻¹ Zn-NČ a ZnO-NČ a pre *Brassica napus* sa IC₅₀ hodnoty pohybovali v oblasti koncentrácií 20 mg l⁻¹ (cit.⁴⁸).

Okrem nanočastíc obsahujúcich kovy sa pri rastlinách sledoval aj vplyv uhlíkových nanočastíc. Cañas a spol.⁵⁴ pri nefunkčných jednoduchých uhlíkových nanorúrkach (SWCNT) s veľkosťou častíc 8 nm aplikovaných v koncentráciách 9, 56, 315 a 1750 mg l⁻¹ na *Brassica oleracea*, *L. sativa*, *Daucus carota*, *Allium cepa* a *S. lycopersicum* nepotvrdili žiadny preukazný účinok. V prítomnosti funkčných uhlíkových nanorúrok (SWCNT), tiež s veľkosťou 8 nm, už ale pri koncentráciách 104, 315 a 1750 mg l⁻¹ po 15 dňoch expozície zaznamenali pri *L. sativa* redukcii dĺžky koreňov.

Torre-Roche a spol.⁵⁵, ktorí hodnotili vplyvy C₆₀ fullerénu na *Zea mays* a *Glycine max*, uvádzajú, že koncentrácia 500 mg kg⁻¹ redukovala ich biomasu. Stampoulis a spol.⁵⁶ zaznamenali redukcii produkcie biomasy u *Cucurbita pepo* ošetrených 1000 mg l⁻¹ MWCNT a redukčný účinok MWCNT v koncentrácii 2000 mg l⁻¹ na rast koreňov *L. sativa* pozorovali aj Lin a Xing¹⁸. Naopak Wild a Jones⁵⁷ nepozorovali v prítomnosti MWCNT (100 mg l⁻¹)

u *Triticum* spp. žiadne morfológické zmeny a Khodakovskaya a spol.⁵⁸ dokonca uvádzajú pri *S. lycopersicum* pri nízkych koncentráciách nanomateriálov (50–200 mg l⁻¹) ich stimulačné účinky, ktoré sa prejavili výrazným rastom stonky, kvetov a produkciou plodov.

5.2. Pozitívne účinky nanočastíc na rast a vývin vyšších rastlín

V literatúre sa okrem uvádzania negatívnych vplyvov nanočastíc na rastliny, stretávame aj s prácami, ktoré jednoznačne potvrdzujú ich pozitívne vplyvy. Tu si ale treba uvedomiť, že úspešnosť potlačenia výskytu ochorení plodín, zvýšenie ich vitality a výnosov závisí nielen od typu použitých nanočastíc a ich rozmeru, ale aj od rastlinného druhu a vlastností pôdy (alebo iného kultivačného média). V neposlednej miere treba zohľadniť aj to, že pozitívne účinky môžu byť aj výsledkom pôsobenia iónových foriem študovaných nanočastíc^{59,60}.

Pozitívny vplyv nanočastíc hliníka (Al₂O₃-NČ) na rast, morfológiu a fotosyntézu vodnej rastliny *Lemna minor* potvrdili vo svojej práci Juhel a spol.⁶¹. Vystavenie *L. minor* Al₂O₃-NČ po dobu 7 dní malo stimulačné účinky na rast a akumuláciu biomasy, pričom zvýšenie produkcie biomasy bolo proporčné s morfológickou adaptáciou rastlín (zvýšený rast koreňa, väčší počet listov kolónii a prírastok špecifického fotosyntetického výkonu).

Pokiaľ ide o nanočastice Fe, Alidoust a Isoda⁵⁹ potvrdili pozitívny vplyv troch foriem Fe₂O₃ (nanočastice Fe₂O₃, Fe₂O₃-NČ potiahnuté citrátom, iónová forma Fe₂O₃) na rastliny *G. max* L. Pozitívne účinky kovových nanočastíc Fe sorbovaných na fosfáte uvádzajú pre *Spinacia oleracea* L. aj Almeelbi a Bezbaruah⁶⁰. Tieto experimenty jednoznačne potvrdili, že na výslednom účinku nanočastíc sa výrazne podieľa spôsob ich aplikácie. Kým Alidoust a Isoda⁵⁹ zistili, že na rozdiel od foliárnej aplikácie, aplikácia nanočastíc Fe do pôdy, pravdepodobne v dôsledku vyzrážania iónov Fe³⁺, nemala na rast a vývin rastlín žiadny vplyv. Almeelbi a Bezbaruah⁶⁰ pri pestovaní špenátu v hydroponickom roztoku pozorovali zvýšenú produkciu biomasy a 11–21 násobný nárast obsahu Fe v koreňoch, stonkách a výhonkoch rastlín. Podobný priaznivý účinok nanočastíc Mn na produkciu biomasy koreňov a výhonkov, obsah chlorofylu a zvýšenú fosforyláciu karotenoidov, zvýšený metabolizmus dusíka a vývoj kyseliny uvádzajú vo svojich prácach s *Vigna radiate* aj Padhan a spol.⁶² a na *A. cepa* L. Konotop a spol.⁶³.

Pozitívny vplyv sa pozoroval aj po aplikácii nanočastíc Ti na klíčenie semien *Salvia officinalis*⁶⁴ a *S. oleracea*⁶⁵. Ako uvádzajú Feizi a spol.⁶⁴ pozitívny vplyv TiO₂-NČ je pravdepodobne výsledkom zvýšenej tvorby ROS (reactive oxygen species), superoxidu (O₂⁻) a hydroxylového radikálu (HO•), ktoré majú sterilizačné účinky. Nano-TiO₂ častice sa môžu podieľať aj na zlepšení príjmu vody a kyseliny, ktoré sú pri klíčení veľmi dôležité⁶⁶. Toto by mohlo pomôcť pri riešení problémov s klíčivosťou semien niektorých plodín vrátane liečivých rastlín. Okrem uvedených prípadov pozorovali pozitívny

vplyv hlavne u nanočastíc oxidu zinočnatého ZnO-NČ na rast vyšších rastlín a klíčivosť semien viacerí autori^{66,67}. Pozornosť sa v tomto smere venovala aj nanočasticiam Se⁶⁸ a Co⁶⁹. Penetrácia semien nanočasticami je jeden z alternatívnych spôsobov ako zvýšiť ich vitalitu, synchronizáciu klíčenia a zlepšiť rast plodín v stresových podmienkach⁷⁰. Adaptácia tejto metódy je veľmi sľubná, a preto by sa výskumu nanopenetrácie semien mala venovať väčšia pozornosť. Získané výsledky potvrdzujú, že penetrácia má pozitívny vplyv aj na spustenie antioxidačného mechanizmu v semenách, ktoré klíčia v chladnom prostredí⁷¹.

6. Oxidačný stres vyvolaný nanočasticami a obranné mechanizmy rastlín

Nanočastice, ktoré sa do rastliny dostanú, môžu vyvolať stresovú reakciu. V prirodzených podmienkach sú v rastlinách reaktívne kyslíkové formy (ROS) vedľajšími produktmi metabolizmu bunkových štruktúr – chloroplastov, mitochondrií a peroxizómov a za normálnych okolností sú v rovnováhe s antioxidačným systémom rastliny. Ich zvýšená produkcia v stresových podmienkach môže viesť k oxidačnému poškodeniu biomolekúl⁷².

Pri oxidatívnom strese dochádza k nerovnosti v produkcii ROS, ktorých množstvo prevyšuje antioxidačnú kapacitu bunky. ROS prítomný v bunke je často kvantifikovaný ako pomer množstva glutationu (GSH) ku glutation disulfidu (GSSH). Redoxný pár GSH/GSSH slúži nielen ako hlavný regulátor redoxnej rovnováhy, ale aj ako senzor bunkovej odpovede na daný vonkajší alebo vnútorný podnet⁷³. Hierarchia modelu oxidatívneho stresu hovorí, že kým pri nízkych hodnotách má pre organizmus ochrannú funkciu, jeho vyššie hodnoty, ktoré už bunka nie je schopná redukčne metabolizovať, majú na bunku škodlivé až zničujúce účinky⁷⁴. Na zhodnotenie hladiny stresu sa najčastejšie používa stanovenie obsahu H₂O₂ (cit.⁷⁵).

V literatúre sa uvádza, že nanočastice Ag a ZnO zvyšujú produkciu ROS, čo vedie k poškodeniu rastlín, ktoré sa môže prejavovať odumieraním buniek, poškodením DNA a znížením obsahu chlorofylu⁷⁶. Na vyrovnanie sa s oxidačným stresom majú rastliny vybudovaný antioxidačný systém, ktorý obsahuje niekoľko enzýmov: superoxid-dismutázu (SOD), katalázu (CAT), askorbátperoxidázu (APX) a glutatióperoxidázu (GPX), ktoré dokážu ROS efektívne odstraňovať. Sledovaniu aktivity SOD, CAT a APX v rastlinách vystavených nanočasticami kovov sa venovali viacerí autori^{75,67}. Z ich prác je zrejmé, že produkcia ROS a aktivita antioxidačných enzýmov sa môže líšiť v závislosti od podmienok expozície, typu aplikovaných nanočastíc a druhu rastliny. Napríklad kým v koreňoch rastlín *Triticum* spp., ktoré boli vystavené CuO (500 mg kg⁻¹) dochádzalo ku stimulácii aktivity CAT, po aplikácii nanočastíc ZnO (500 mg kg⁻¹) bola aktivita tohto enzýmu potlačená⁷⁷. Okrem aktivity oxidačných enzýmov sa pri hodnotení oxidačného stresu využíva aj sledovanie génov kódujúcich jednotlivé enzýmy. Tieto

informácie pomáhajú pri identifikácii antioxidačného mechanizmu. Okrem antioxidačných enzýmov využívajú v boji proti oxidačnému stresu rastliny aj neenzýmové antioxidanty a HSP („heat shock“ proteíny). Nezastupiteľnú úlohu v boji s oxidačným stresom spôsobeným ťažkými kovmi má glutatión, ktorý dokáže „vychytávať“ reaktívne kyslíkové častice, pričom sa oxiduje za vzniku oxidovaného glutatión disulfidu (GSSG), ktorý je spätne redukovaný pomocou glutatiónreduktázy (GR). Navyše glutatión je esenciálnou molekulou v procese syntézy fytochelátinov, peptidov ktoré sú dôležité pri detoxikácii ťažkých kovov chelatáciou. Výskum v tejto oblasti je zatiaľ len v začiatkoch a tak je otázne, či sa tento mechanizmus aktivuje aj pri toxickom účinku nanočastíc⁴².

Produkcia „heat shock“ proteínov (HSPs) a nízko-molekulových „chaperónov“ je ďalšou alternatívnou cestou, ktorú môžu rastliny využiť pri detoxikácii a obrane voči abiotickému a oxidačnému stresu. Úloha HSPs pri ameliorácii následkov toxicity nanočastíc zatiaľ nie je známa. Dá sa však predpokladať, že ich úloha spojená s expozíciou rastlín nanočasticiam bude podobná ako pri oxidačnom strese⁷⁸.

7. Záver

Napriek značnému množstvu prác, ktoré sa venujú danej tematike, je zrejme, že oblasť nanotoxikológie u rastlín ponúka ešte veľa možností pre ďalší výskum. Väčšina informácií o transporte nanočastíc do buniek je získavaná z testov na jednobunkových organizmoch alebo živočíšnych bunkách. Rastlinám, ktoré tvoria základ potravinových reťazcov, sa zatiaľ z pohľadov sledovania účinkov nanočastíc venovala menšia pozornosť. Prehľad prác ukazuje, že pri rastlinách sa zatiaľ sledoval len obmedzený počet typov nanočastíc a do hodnotení boli zaradené len niektoré druhy a skupiny rastlín. Táto skutočnosť dáva teda priestor pre rozsiahly výskum, nakoľko dnes už v rôznych oblastiach využívame veľké množstvo rôznych nanomateriálov s veľkou variabilitou účinkov na živé organizmy.

Zoznam skratiek

ADH	alkoholdehydrogenáza
APX	askorbátperoxidáza
CAT	kataláza
GPX	glutatiónperoxidáza
GR	glutatiónreduktáza
GSH	glutatión
GSSG	oxidovaný glutatión
GSSH	glutatión disulfid
HSPs	„heat shock“ bielkoviny
Chl <i>a</i>	chlorofyl <i>a</i>
Chl <i>b</i>	chlorofyl <i>b</i>
MRI	magnetická rezonancia
MWCNT	nanorúrky s viacerými stenami (multi-walled carbon nanotube)

MTs	metalotioneíny
NČ	nanočastice
PAMAM	polyamidoamín
ROS	reaktívne formy kyslíka (reactive oxygen species)
SOD	superoxiddizmutáza
SWCNT	nanorúrky s jednoduchou stenou (single-walled carbon nanotube)

LITERATÚRA

- Novoselov K. S., Geim A. K., Morozov S. V., Jiang D., Zhang Y., Dubonos S. V., Grigorieva I. V., Firsov A. A.: *Science* 306, 666 (2004).
- Curl R. F.: *Rev. Mod. Phys.* 69, 691 (1997).
- Norris D. J., Bawendi M. G.: *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys.* 53, 16338 (1996).
- Tzalenchuk A., Lara-Avila S., Kalaboukhov A., Paolillo S., Syväjärvi M., Yakimova R., Kazakova O., Janssen T. J. B. M., Fařko V., Kubatkin S.: *Nat. Nanotechnol.* 5, 186 (2010).
- Gittleman J. I., Abeles B., Bozowski S.: *Phys. Rev. B* 9, 3891 (1974).
- Lipkowitz K. B., Larter R., Cundari T. R.: *Rev. Comput. Chem.* 19, 1 (2003).
- Hoet P. H. M., Bruske-Hohlfeld I., Salata O. V.: *J. Nanobiotechnol.* 2, 12 (2004).
- Colvin V. L.: *Nat. Biotechnol.* 21, 1166 (2003).
- Thomas T., Thomas K., Sadrieh N.: *J. Toxicol. Sci.* 91, 14 (2006).
- Řihová Ambrožová J., Čiháková P., Škopová V.: *Acta Environ. Univ. Comenianae* 23, 5 (2015).
- Handy R. D., Von der Kamme R. F., Lead J. R., Hasselov M., Owen R., Crane M.: *Ecotoxicology* 17, 287 (2008).
- Wiesner M. R., Lowry G. V., Alvarez P., Dionysiou D., Biswas P.: *Environ Sci Technol.* 2006, 4336.
- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N. B., Filser J., Miao A.-J., Quigg A., Santschi P. H., Sigg L.: *Ecotoxicology* 17, 372 (2008).
- Lidén G.: *Ann. Occup. Hyg.* 55, 1 (2011).
- Oberdörster G., Stone V., Donaldson K.: *Nanotoxicology* 1, 2 (2007).
- Poland C. A., Duffin R., Kinloch I., Maynard A., Wallace W. A. H., Seaton A., Stone V., Brown S., MacNee W., Donaldson K.: *Nat. Nanotechnol.* 3, 423 (2008).
- Tuteja N., Gill S. S. (ed.): *Crop Improvement under Adverse Conditions*, Springer, New York 2013.
- Lin D., Xing B.: *Environ. Pollut.* 150, 243 (2007).
- Yon J. N., Lead J. R.: *Sci. Total Environ.* 400, 396 (2008).
- Arepalli S., Nikolaev P., Holmes W., Files B. S.: *Appl. Phys. Lett.* 78, 1610 (2001).
- Logothetidis S.: *Nanostructured Materials and Their Application*, Springer, Berlin 2012.
- Shang C., Hong W., Wang J., Wang.: *J. Power Sour-*

- ces 285, 12 (2015).
23. Pradhan S., Patra P., Mitra S., Dey K. K., Basu S., Chandra S., Palit P., Goswami A.: *J. Agr. Food Chem.* 63, 2606 (2015).
 24. Robertson T. A., Sanchez W. Y., Roberts M. S.: *J. Biomed. Nanotechnol.* 6, 452 (2010).
 25. Botta C., Labille J., Auffan M., Borschneck D., Miche H., Cabié M., Masion A., Rose J., Bottero J.-Y.: *Environ. Pollut.* 159, 1543 (2011).
 26. Arul M. Z. S., Anand R. B., Udayakumar M.: *Fuel* 130, 160 (2014).
 27. Dobson J.: *Drug Dev. Res.* 67, 55 (2006).
 28. Wang X. J., Ruedas-Rama M. J., Hall E. A. H.: *Anal. Lett.* 40, 1497 (2007).
 29. Bera D., Qian L., Tseng T.-K., Holloway P. H.: *Materials* 3, 2260 (2010).
 30. Abhilash M.: *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* 1, 1 (2010).
 31. Fleischer A., O'Neill M. A., Ehwald R.: *Plant Physiol.* 121, 829 (1999).
 32. Zemke-White W. L., Clements K. D., Harris P. J.: *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 245, 57 (2000).
 33. Melo L. C. A., Alleoni F., Carvalho G., Azevedo R. A.: *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 174, 847 (2011).
 34. Mortimer M., Kasemets K., Kahru A.: *Toxicology* 269, 182 (2010).
 35. Howes M. T., Mayor S., Parton R. G.: *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 519 (2010).
 36. He C., Klionsky D. J.: *Annu. Rev. Genet.* 43, 67 (2009).
 37. Sayes C. M., Warheit D. B.: *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* 1, 660 (2009).
 38. Nel A., Xia T., Madler L., Li N.: *Science* 311, 622 (2006).
 39. Andrade S. A. L., Gratão P. L., Azevedo R. A., Silveira A. P. D., Schiavinato M. A., Mazzafera P.: *Environ. Exp. Bot.* 68, 198 (2010).
 40. Battke F., Leopold K., Maier M., Schmidhalter U., Schuster M.: *Plant Biol.* 10, 272 (2009).
 41. Yadav S. K.: *S. Afr. J. Bot.* 76, 167 (2010).
 42. Ma C., White J. C., Dhankher O. P., Xing B.: *Environ. Sci. Technol.* 49, 7109 (2015).
 43. Cho W. S., Cho M., Jeong J., Choi M., Cho Han B. S., Kim S. H., Kim H. O., Lim Y. T., Chung B. H.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 236, 16 (2009).
 44. Ko K. S., Kong I. C.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 3295 (2014).
 45. Park E.-J., Yi J., Kim Y., Choi K., Park K.: *Toxicol. In Vitro* 24, 872 (2010).
 46. Haytham M. M., Green I.: *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 30, 1 (2015).
 47. Nair G., Chung I. M.: *Chemosphere* 112, 105 (2014).
 48. Qian H., Peng Ch., Han X.: *J. Environ. Sci. (China)* 25, 1947 (2013).
 49. Barrena R., Casals E., Colón J., Font X., Sánchez A., Puentes V.: *Chemosphere* 75, 850 (2009).
 50. Song U., Jun H., Waldman B., Roh J., Kim Y., Yi J., Lee E. J.: *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 60 (2013).
 51. Yin L., Colman B. P., McGill B. M., Wright J. P., Bernhardt E. S.: *PLoS One* 7, 1 (2012).
 52. Ma X., Lee J. G., Deng Y., Kolmakov A.: *Sci. Total Environ.* 408, 3053 (2010).
 53. Lee Ch. W., Mahendra S., Zodrow K.: *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 669 (2010).
 54. Cañas J. E., Long M., Nations S.: *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1922 (2008).
 55. Torre-Roche R. D. L., Hawthorne J., Deng Y.: *Environ. Sci. Technol.* 47, 12539 (2013).
 56. Stampoulis D., Sinha S. K., White J. C.: *Environ. Sci. Technol.* 43, 9473 (2009).
 57. Wild E., Jones K. C.: *Environ. Sci. Technol.* 43, 5290 (2009).
 58. Khodakovskaya M., Dervishi E., Mahmood M.: *ACS Nano* 3, 3221 (2009).
 59. Alidoust D., Isoda A.: *Acta Physiol. Plant* 35, 3365 (2013).
 60. Ameerli T., Bezbaruah A.: *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2, 1625 (2014).
 61. Juhel G., Batisse E., Hugues Q., Daly D., van Pelt F. N. A. M., O'Halloran J., Jansen M. A. K.: *Aquat. Toxicol.* 105, 328 (2011).
 62. Pradhan S., Patra P., Das S., Chandra S., Mitra S., Dey K. K., Akbar S., Palit P., Goswami A.: *Environ. Sci. Technol.* 22, 13122 (2013).
 63. Konotop I. O., Kovalenko M. S., Ulynets' V. Z., Meleshko A. O., Batsmanova L. M., Taran N. I.: *Tsitol Genet.* 48, 37 (2014).
 64. Feizi H., Amirmoradi S., Abdollahi F., Pour S. J.: *Annu. Rev. Res. Biol.* 4, 814 (2013).
 65. Zheng L., Hong F. S., Lu S. P., Liu C.: *Biol. Trace Elem. Res.* 104, 83 (2005).
 66. Tarafdar J. C., Raliya R., Mahawar H., Rathore I.: *Agric. Res.* 3, 257 (2014).
 67. Hernandez-Viezcás J., Castillo-Michel H., Servin A., Peralta-Videa J., Gardea-Torresdey J.: *Chem. Eng. J.* 170, 346 (2011).
 68. Domokos-Szabolcsy E., Marton L., Sztrik A., Babka B., Prokisch J., Fari M.: *Plant Growth Regul.* 68, 525 (2012).
 69. Ghasemi B., Hosseini R., Dehghan Nayeri F.: *Turk. J. Bot.* 39, 769 (2015).
 70. Carvalho R. F., Piotto F. A., Schmidt D., Peters L. P., Monteiro C. C., Azevedo R. A.: *Sci. Agric.* 68, 598 (2011).
 71. Dehkourdi E. H., Mosavi M.: *Biol. Trace Elem. Res.* 155, 283 (2013).
 72. Carocho M., Ferreira I. C. F. R.: *Food Chem. Toxicol.* 51, 15 (2013).
 73. Xiao G. G., Wang M., Li N., Loo J. A., Nel A. E.: *J. Biol. Chem.* 278, 50781 (2003).
 74. Zhang F., Ali Z., Amin F.: *ChemPhysChem* 11, 730 (2010).
 75. Rico C. M., Morales M. I., McCreary R., Castillo-Michel H., Barrios A. C., Hong J., Tafoya A., Lee W. Y., Varela-Ramirez A., Peralta-Videa J. R., Gardea Torresdey J. L.: *Environ. Sci. Technol.* 47, 14110 (2013).

76. Mukherjee A., Peralta-Videa J. R., Bandyopadhyay S., Rico C. M., Zhao L., Gardea Torresdey J. L.: *Metallo-mics* 6, 132 (2014).
77. Dimkpa C. O., McLean J. E., Latta D. E., Manango'n E., Britt D. W., Johnson W. P., Boyanov M. I., Anderson A. J.: *J. Nanopart. Res.* 14, 1125 (2012).
78. Timperio A. M., Egidí M. G., Zolla L.: *J. Proteomics* 71, 391 (2008).

V. Hrivnáková^a and A. Fargašová^b (^a*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Analytical Department,* ^b*Department of Environmental Ecology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University Bratislava*): **Characterization of Nanoparticles and Their Effects on Eukaryotic Cells and Higher Plants**

The recent boom in nanotechnology has brought up an increased interest in the toxicity of nanostructured materials. In the center of attention, however, there are the effects on animals or humans. From the global and environmental point of view, effects nanoparticles on plants which are at the beginning of the food chains have to be studied as well. The present review surveys the observations that have already been done in this field. After a brief review of the classification and basic properties of nanoparticles, we discussed transportation process of nanoparticles into the eukaryotic cell via endocytosis, as well as the basic principles of nanotoxicity, its mechanisms and the factors affecting it. The part devoted to the nanoparticle phytotoxicity deals with both positive and negative effects of nanoparticles on morphological changes in plants and the reduction of seed germination. The final chapter is focused on oxidative stress caused by the presence of nanoparticles and on the defense mechanisms of plants.