

Agata Świętek 

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska
(Zespół Nanotoksykologii)

e-mail: agata.swietek22@gmail.com

WPŁYW NANODIAMENTÓW NA PARAMETRY ROZWOJOWE ŚWIERSZCZA DOMOWEGO (*ACHETA DOMESTICUS*)

THE INFLUENCE OF NANODIAMONDS ON THE DEVELOPMENTAL PARAMETERS OF HOUSE CRICKET (*ACHETA DOMESTICUS*)

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the developmental parameters of *Acheta domesticus* after two-generation exposure to low dietary concentrations of NDs (doses: 0.2 and 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). The wild insect line and an insect line selected for longevity to verify coping mechanisms with environmental stress. It was designed to assess whether NDs administered during the life cycle of crickets in successive generations affect the developmental parameters and the proportion of larvae with particularly slow growth (so-called midgets). The second aim was to test whether individuals selected from a long-lived line exhibit more efficient compensatory mechanisms related to organismal development than individuals from the wild line. In addition, the regenerative capacity of the insects was examined after NDs withdrawal.

To collect data, photographs of individual insect cohorts were taken on defined developmental days and analyzed using ImageJ software. Extensive data were collected showing changes in body size and comparisons of developmental rates between groups and lines.

The results proved the largest body size of 1st generation and significantly higher growth rate. It can be assumed that exposure to low doses of ND to be safe. Generation 2nd from both lines exhibited significantly smaller sizes, particularly in the wild line treated with higher ND concentrations. It is speculated that ND-induced epigenetic modifications may shape offspring responses. Elimination of ND from the diet did not restore the studied parameters. Importantly, there was a noticeable increase in the percentage of so-called midgets. The inherited epigenetic pattern may be inadequate after the withdrawal of the stress factor.

The negative effects of NDs may extend beyond the “contact time” with these particles. Environmental contamination by NDs is challenging, especially in multigenerational exposures. Special care must be taken when using NDs in various areas of life.

KEY WORDS: nanodiamonds, multigenerational exposure, body development, epigenetic, recovery.

STRESZCZENIE

Nieodwracalną konsekwencją coraz szerszego zastosowania nanodiamentów (ND), jest wzrastający udział tych cząsteczek w środowisku. Jak dotąd, podjęto niewiele badań dotyczących potencjalnej toksyczności ND dla organizmów, zwłaszcza w zakresie chronicznej, wielopokoleniowej ekspozycji.

Praca miała na celu ocenę parametrów rozwojowych *Acheta domesticus* po dwupokoleniowym narażeniu na niskie stężenia ND w diecie (dawki: 0,2 i 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). W eksperymencie wykorzystano dziką linię owadów oraz selekcjonowaną w kierunku długowieczności, w celu zweryfikowania mechanizmów radzenia sobie ze stresem środowiskowym. Badano czy ND podawane przez cały cykl życiowy świerszcza w kolejnych pokoleniach, mają wpływ na rozmiar ciała owadów oraz odsetek larw o szczególnie wolnym wzroście (tzw. mikrusy). Ponadto, sprawdzono, czy osobniki z linii długożyjącej wykazują sprawniejsze mechanizmy kompensacyjne związane z rozwojem organizmu, w porównaniu do linii dzikiej. Zbadano również możliwości regeneracyjne dostrzegalne w cyklu rozwojowym zwię-

rząt, po odstawieniu ND.

W celu zebrania danych wykonywano w określonych dniach rozwojowych fotografie poszczególnych kohort owadów, które analizowano z użyciem programu ImageJ. Zebrano obszerne dane, pokazujące zmiany wielkości ciała, a także porównanie tempa rozwoju pomiędzy grupami i liniami.

Wyniki dowiodły największy rozmiar ciała owadów pokolenia 1 oraz istotnie wyższą dynamikę ich wzrostu. Można przypuszczać, że ekspozycja na niskie dawki ND wydaje się być bezpieczna. Pokolenie 2 obu linii cechowało się istotnie mniejszymi rozmiarami, szczególnie widoczne w linii dzikiej, traktowanej wyższym stężeniem ND. Być może, reakcje potomstwa mogą być kształtowane modyfikacjami epigenetycznymi. Eliminacja ND w następnym pokoleniu nie spowodowała przywrócenia badanych parametrów. Co ważne, zauważalnie wzrósł odsetek tzw. mikrusów. Odziedziczony wzorzec epigenetyczny mógł być nieadekwatny po wycofaniu czynnika stresowego.

Negatywne skutki ND mogą wykraczać poza “czas kontaktu” z tymi cząstkami. Zanieczyszczenie środowiska przez ND stanowi wyzwanie, zwłaszcza w przypadku narażenia wielopokoleniowego. Należy zachować szczególną ostrożność przy stosowaniu ND w różnych dziedzinach życia.

SŁOWA KLUCZOWE: nanodiamenty, ekspozycja wielopokoleniowa, parametry rozwojowe, epigenetyka, odstawienie.

WSTĘP

Obecnie wielu naukowców badających nanomateriały, w tym nanocząstki węgla skłonnych jest uważać nanodiamenty (ND) za materiał o wysokiej biokompatybilności, unikalnych właściwościach oraz niskiej toksyczności (Ma et al., 2021; Mi et al., 2021). Atutem jest także powierzchnia cząsteczki zawierająca aktywne, powierzchniowe grupy funkcjonalne, co sprawia, że ND są podatne na różnego rodzaju modyfikacje chemiczne (Mishra et al., 2018). Dlatego też ND są coraz częściej wykorzystywane w wielu dziedzinach, między innymi w powłokach elektrochemicznych, kompozytach polimerowych, materiałach polerskich, smarach, biosensorach, czujnikach obrazu, implantach i lekach (Basso et al., 2020; Stursa et al., 2016; Yuan et al., 2010). Obecność nanocząstek w komercyjnie dostępnych produktach staje się coraz bardziej powszechna (Research and Markets, 2022). W dalekosiężnej wizji można się spodziewać, że ND mogą być uwalniane do środowiska, narażając w ten sposób organizmy w nim żyjące i wpływając na stabilność ekosystemów (Augustyniak et al., 2022).

Pojawiają się również doniesienia na temat mechanizmów toksyczności tych nanocząstek, co wynika to przede wszystkim z ich wysokiej reaktywności chemicznej i aktywności biologicznej. Dodatkowo, nanomolekuły mogą przenikać

przez bariery biologiczne i łatwo przemieszczać się przez systemy biologiczne, prowadzące do zachwiania homeostazy organizmu (Turcheniuk and Mochalin, 2017).

Dotychczasowe doniesienia literaturowe nie pozwalają jednoznacznie stwierdzić, jakie zagrożenie dla organizmów i środowiska niesie ekspozycja na ND. Ponadto brak jest satysfakcjonujących danych dotyczących modelu toksyczności dla ND, a także ich losów w organizmach. Badania zostały podjęte ze względu na fragmentaryczny stan wiedzy dotyczący toksyczności nanodiamentów, zwłaszcza w odniesieniu do modeli *in vivo* (Karpeta-Kaczmarek et al., 2018; Augustyniak et al., 2022).

Celem pracy było określenie ryzyka dla *Acheta domesticus* wskutek długoterminowego narażenia na nanocząstki diamentowe. W eksperymencie wykorzystano linie owadów, standardową (dziką) oraz selekcionowaną w kierunku długowieczności w celu zweryfikowania (potencjalnie odmiennych) mechanizmów radzenia sobie ze stresem środowiskowym. Ponadto, badano możliwości regeneracyjne dostrzegalne w cyklu rozwojowym świerszczy po odstawieniu ND (w tzw. grupach recovery).

MATERIAŁ I METODY

Nanodiamenty zakupione w firmie PlasmaChem GmnH, Berlin; Single Digit

(nazwa handlowa) otrzymano według zapewnień producenta, w procesie dezintegracji chemicznej (wielkość cząstek: 5-15 nm). Przed przystąpieniem do eksperymentów, scharakteryzowano morfologię, strukturę krystaliczną i skład chemiczny ND z użyciem technik mikroskopowych i spektroskopowych (Karpeta-Kaczmarek et al., 2016b).

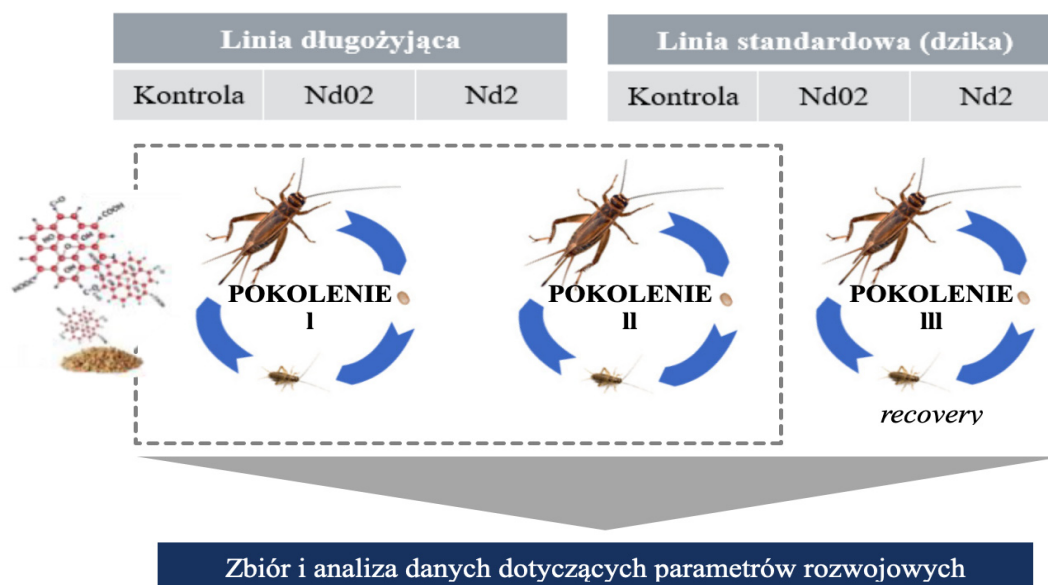
Acheta domestica (Insecta, Orthoptera: Gryllidae) użyte w eksperymencie uzyskano z hodowli laboratoryjnej Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, prowadzonej od 34 lat. W tym czasie wyprowadzono dwie linie selekcyjonowane w kierunku długo- i krótkowieczności, które wykazują rozbieżne cechy względem siebie oraz ogólnej hodowli. Opisano odmienne cechy charakteryzujące rozwój, długość życia oraz odporność na czynniki prooksydacyjne dla wspomnianych linii (Flasz et al., 2020, 2021a, 2021b). W niniejszej pracy badania zostały przeprowadzone na osobnikach z linii długowiecznej (D) oraz z hodowli ogólnej (H) (linia dzika). Należy nadmienić, że owad ten nie jest wymagający w hodowli a zastosowanie go w eksperymentach nie wymaga akceptacji ze strony komisji bioetycznej (Dziewięcka, 2017).

Pokarm przygotowano na bazie zmielonej paszy KanisanQ, zawierającej między innymi komponenty zbożowe, białko roślinne, witaminy i mikroelementy. W grupach traktowanych paszę zmieszano z określonymi objętościami ND. Stężenia nanodiamentów ustalono w oparciu o

wyniki wcześniej przeprowadzonych eksperymentów (Karpeta-Kaczmarek et al., 2016a, b, c, 2018). Ze względu na krótkoterminowy charakter przytoczonych badań, podawane były wówczas wyższe dawki nanodiamentów (20 i 200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). W niniejszym eksperymencie, oceniano wpływ długotrwałej, dwupokoleniowej ekspozycji, dlatego przyjęto niższe dawki: 0,2 i 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Dieta zwierząt z grupy kontrolnej nie zawierała domieszki nanocząstek.

Larwy stadium L1/L2 *Acheta domestica* zostały podzielone na trzy grupy eksperymentalne, odpowiednio w obrębie linii dzikiej (H) oraz długożyjącej (D). Tym samym uzyskano grupy: K (kontrola), Nd02 (dawka nanodiamentów: 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) i Nd2 (dawka nanodiamentów: 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Ryc. 1). Hodowlę zwierząt przeznaczonych do doświadczenia prowadzono w plastikowych insektariach, w standardowych dla tego gatunku warunkach (temperatura: $28,7 \pm 0,44^\circ\text{C}$; fotoperiod L:D 12:12; wilgotność: $43,8 \pm 6,72\%$). W czasie trwania doświadczenia owady miały nieograniczony dostęp do wody, pożywienia oraz kryjówek. Eksperyment obejmował trzy pokolenia- dwa pierwsze, eksponowano na w/w stężenia ND w pokarmie, natomiast trzecie pokolenie zostało przestawione na czystą karmę (tzw. recovery), taką samą jaką otrzymywały osobniki z grup kontrolnych.

W celu zebrania danych dotyczących parametrów rozwojowych *Acheta domestica* wykonywano w określonych dniach rozwojowych fo-



Ryc. 1. Model eksperymentalny (opracowanie własne).

tografie poszczególnych kohort owadów. Zdjęcia wykonywane były zawsze z tej samej wysokości, obejmując wnętrze insektarium. W kolejnym etapie uzyskane fotografie były analizowane z użyciem programu ImageJ. Zajęto się wykonaniem pomiarów powierzchni ciała owadów. Ponadto, zebrano informacje dotyczące liczebności larw wolniej rosnących (zwierzęta odstające niewielkim rozmiarem od reszty kohorty). Przeanalizowano łącznie 119 fotografii, co pozwoliło na zebranie obszernych danych, pokazujących zmiany wielkości ciała, a także porównanie tempa rozwoju pomiędzy grupami i liniami. Na początku zoptymalizowano metodę, by ustalić kolejność działań, które zapewnią spójność i wiarygodność otrzymanych wyników, a następnie ustalono ostateczną procedurę analiz.

OPRACOWANIE STATYSTYCZNE WYNIKÓW

Celem określenia istotności różnic pomiędzy badanymi generacjami zastosowano pakiet ogólnych modeli liniowych. Wpierw dane zostały przetransformowane i przedstawione w skali logarytmicznej. Następnie dane poddano analizie, korzystając z modelu jednakowych nachyleń, by zweryfikować hipotezę H_0 o braku różnic w grupach. Otrzymane wyniki testów nie potwierdziły hipotezy zerowej, dlatego skorzystano z modelu różnych nachyleń w celu oceny istotności różnic pomiędzy poszczególnymi grupami w doświadczeniu. Wyniki przedstawione w formie graficznej opracowano przy użyciu programu Excel (Microsoft Office Professional Plus 2019). Opracowanie statystyczne wykonano za pomocą programu STATISTICA wersja 13 (StatSoft, Inc.).

WYNIKI

Przedstawiono wykresy skonstruowane na podstawie uzyskanych wyników, bez transformacji danych, w celu zobrazowania rzeczywistych zależności pomiędzy grupami, jakie wystąpiły w analizowanym przedziale czasowym (Ryc. 2, 3). Dni rozwojowe z uwzględnieniem aktualnie notowanej temperatury przeliczono także na stopniodni, w celu ujednoczenia wyników. Porównania statystyczne, wykonano na danych

transformowanych, przedstawionych w skali logarytmicznej.

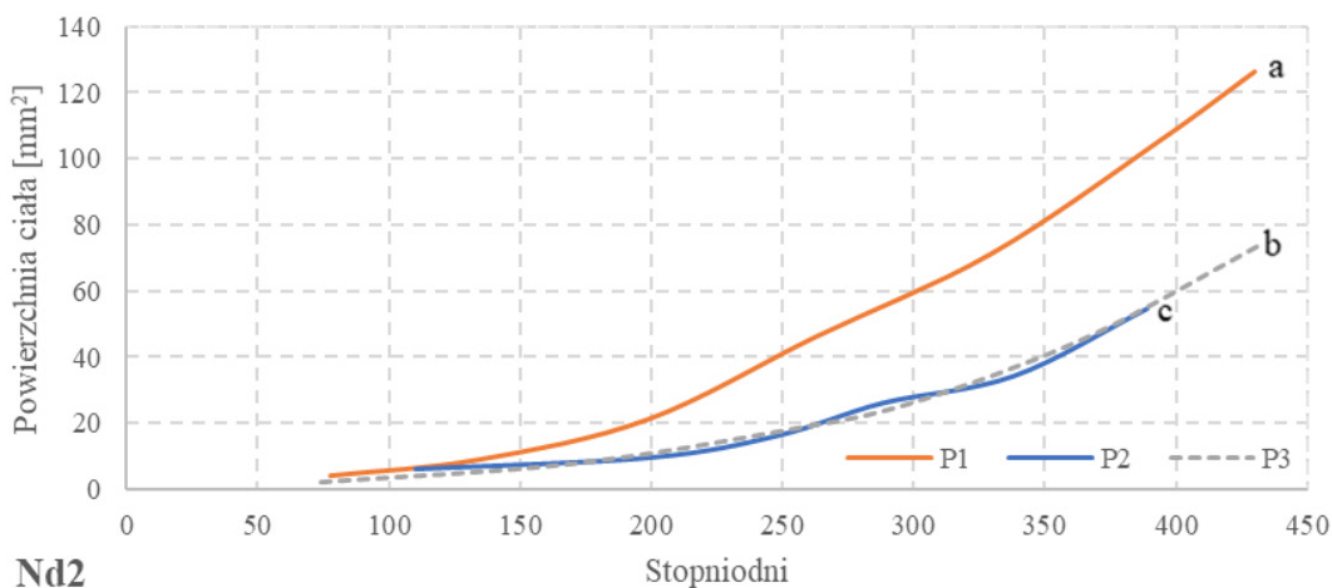
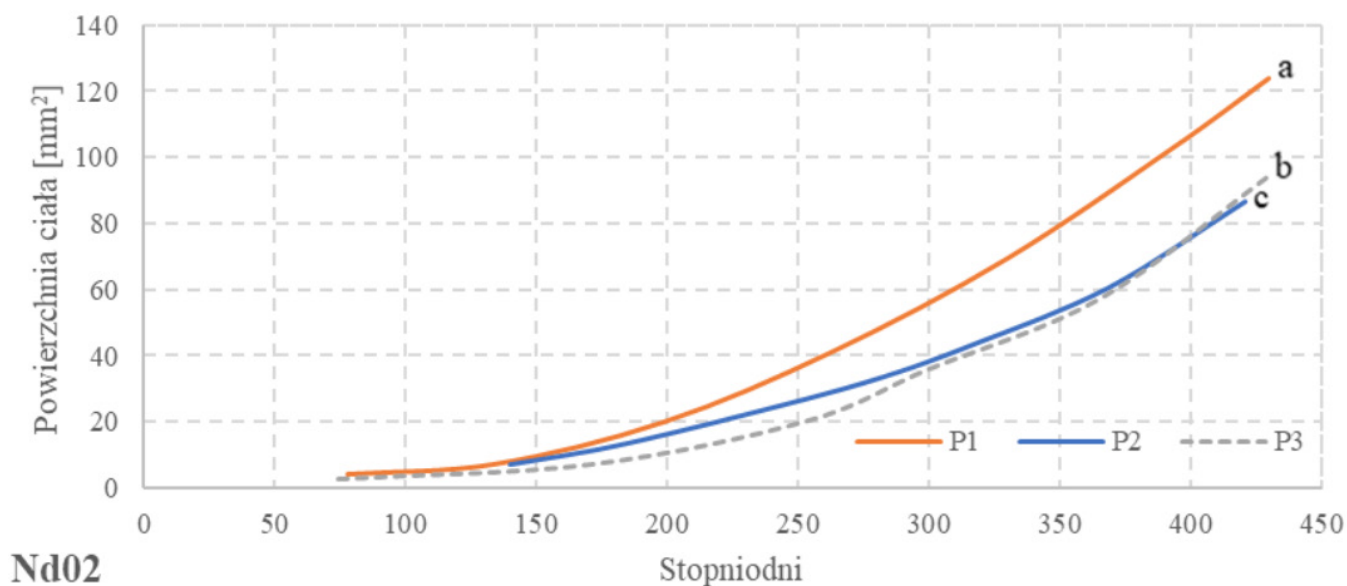
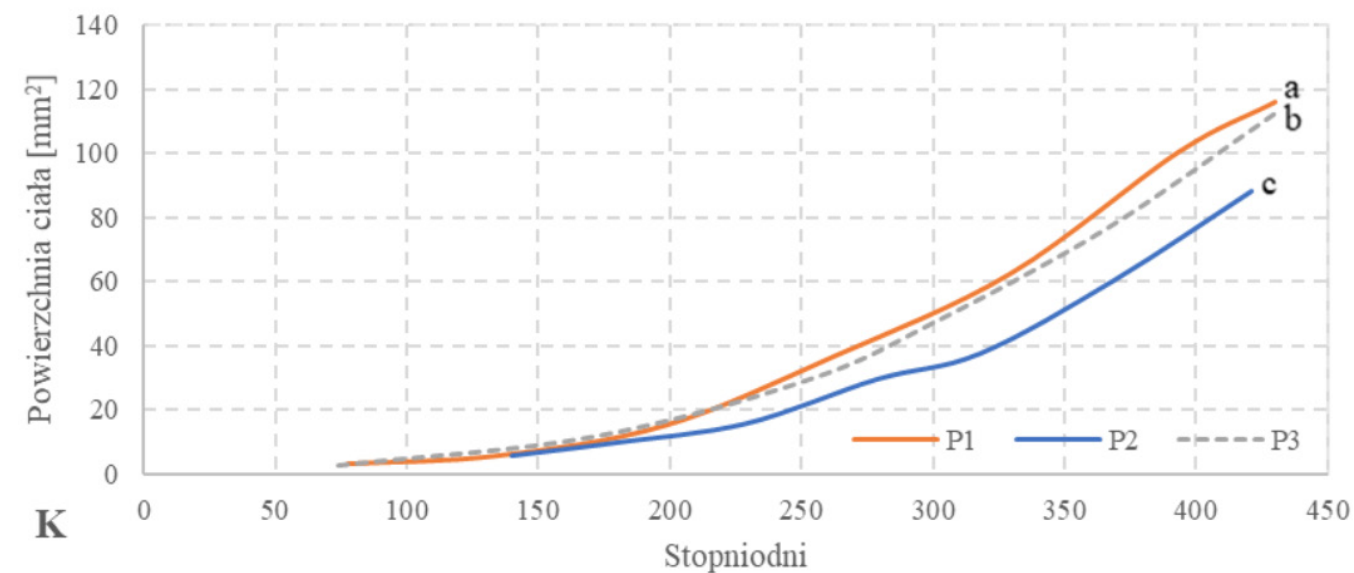
Małymi literami (a, b, c) zaznaczono różnice statystyczne między grupami.

Porównując powierzchnię ciała *Acheta domestica* pomiędzy pokoleniami, w obrębie tych samych grup doświadczalnych, można stwierdzić, że największą powierzchnią cechowały się owady z I pokolenia (Ryc. 2, 3). Ponadto, owady z pokolenia II wykazywały tendencję do najwolniejszego wzrostu, zwłaszcza w grupach kontrolnych obu linii. Jakkolwiek, w grupach eksponowanych na ND, zwłaszcza w linii D, stwierdzono istotnie wyższą powierzchnię ciała u owadów z pokolenia II w porównaniu z pokoleniem III (Ryc. 3, Nd02 i Nd2). W przypadku owadów z linii H, opisana powyżej zależność nie jest tak klarowna, aczkolwiek test statystyczny wykazał różnicę nachyleń krzywych przyrostu powierzchni ciała owadów z pokolenia II i III, zarówno w grupach kontrolnych, jaki i traktowanych ND (Ryc. 2). Ponadto warto nadmienić, że linia dzika (Ryc. 2, Nd02), w pokoleniu II początkowo rosła szybciej, ale po 300-nym stopniodniu badany parametr niemal zrównał się z wartościami otrzymanymi dla owadów z pokolenia III (recovery). W przypadku linii długożyjącej (Wykres 3, Nd02), osobniki ostatniego pokolenia (recovery), po przekroczeniu 150-tego stopniodnia, były istotnie mniejsze od pozostałych. Owady z linii D, traktowane ND w stężeniu $2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, we wszystkich pokoleniach wzrastały istotnie różnie już od 150-tego dnia.

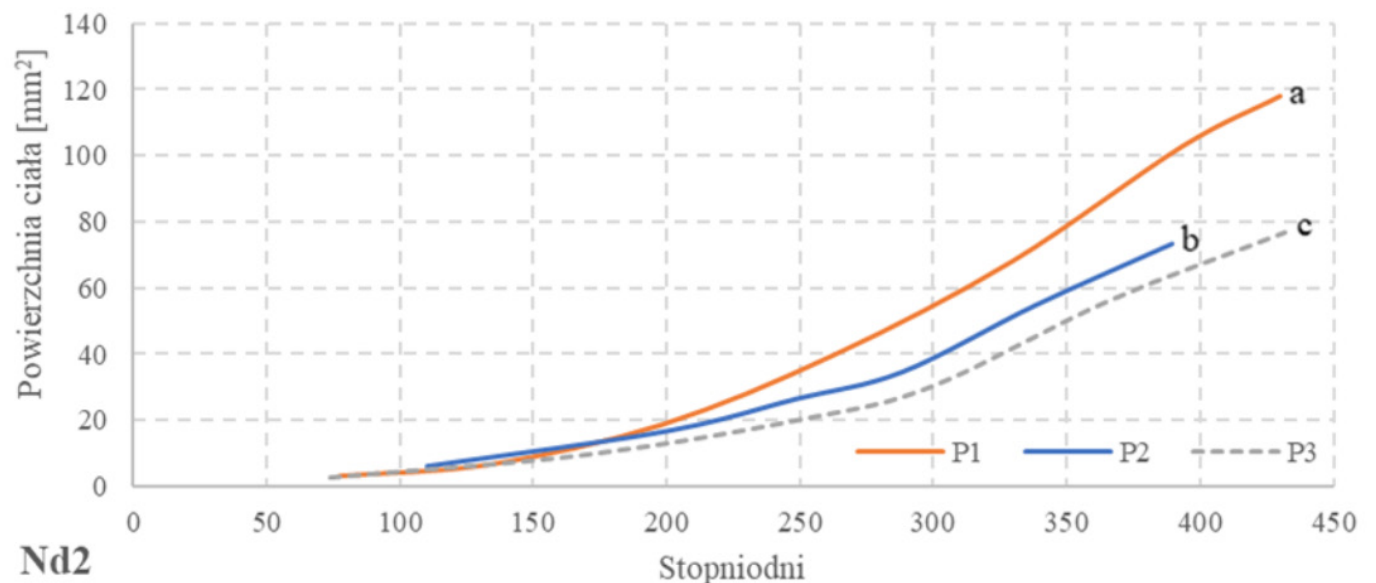
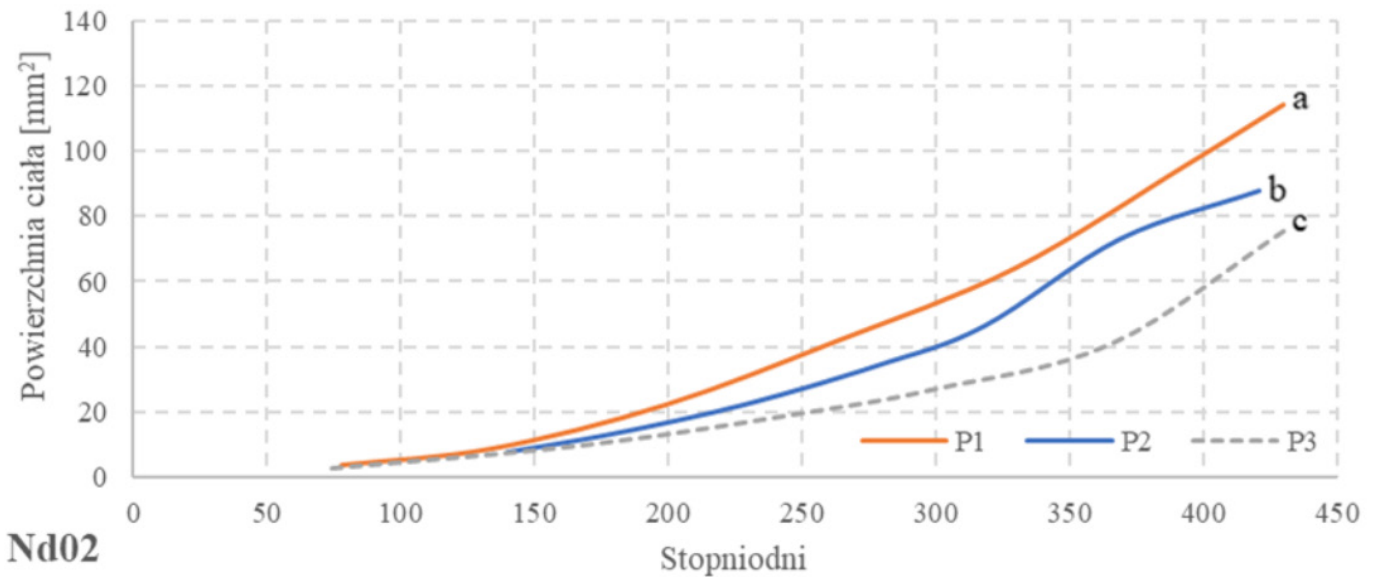
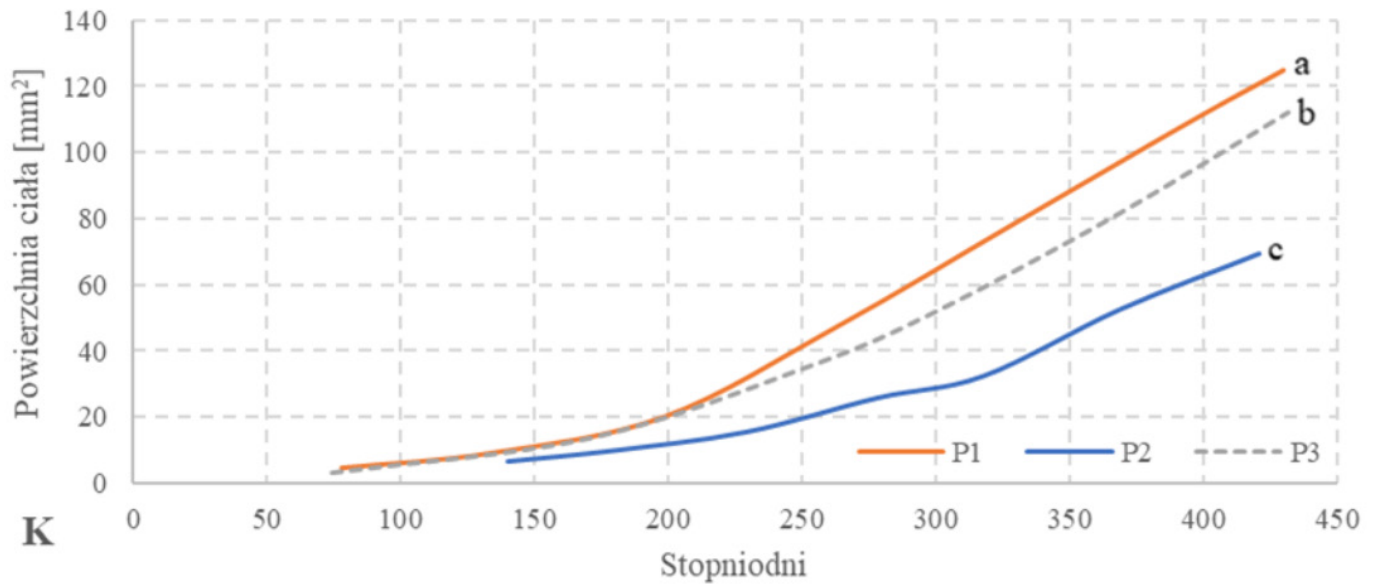
Pokolenie III charakteryzowało się zauważalnie największym odsetkiem mikrusów, przy czym u owadów nienarażonych (recovery) w linii dzikiej wzrost liczby osobników wolniej rozwijających się skorelowany był z przyjmowanym stężeniem ND (Ryc. 4). Odwrotną zależność zanotowano w przypadku linii długożyjącej.

DYSKUSJA

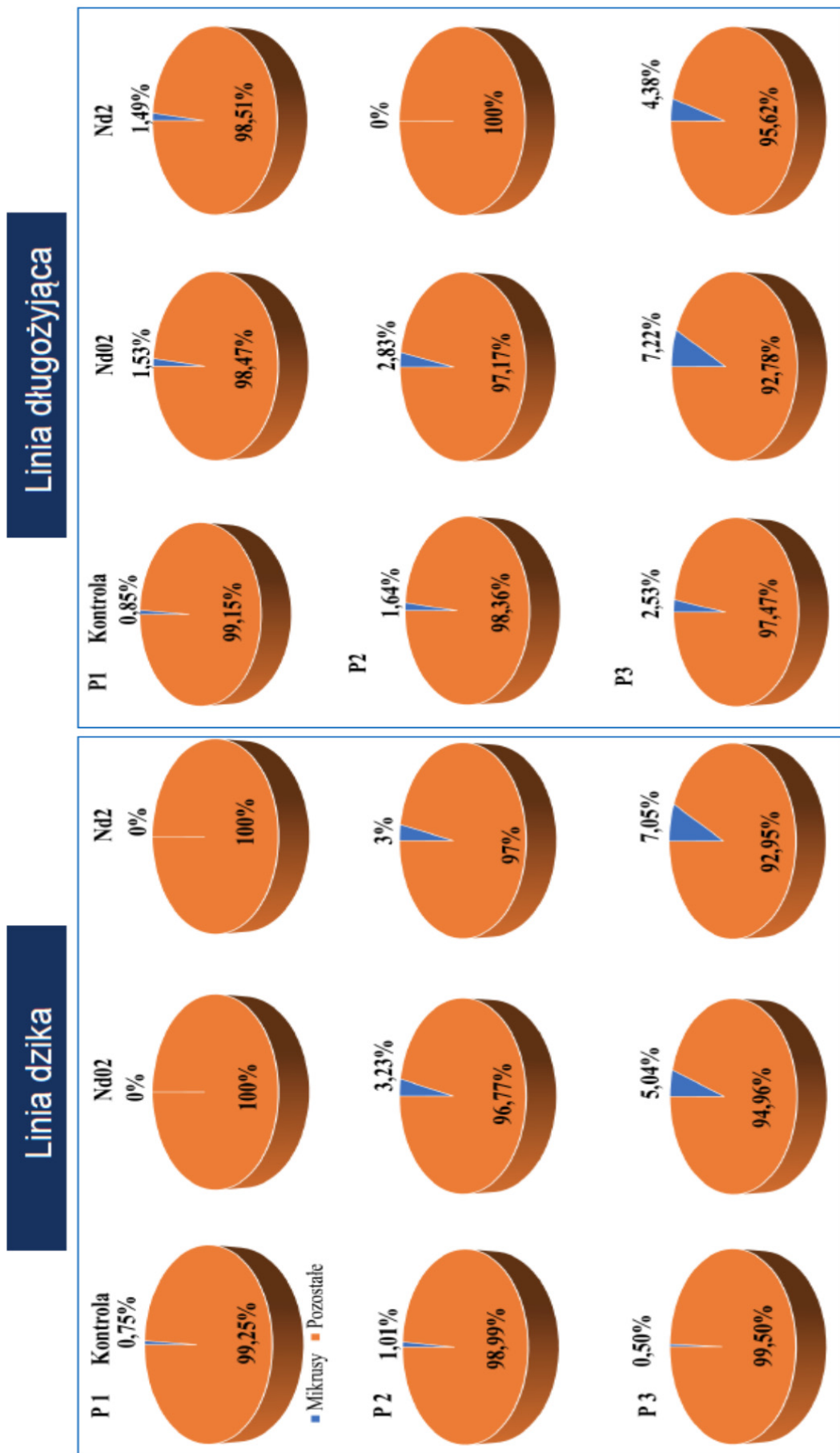
Dane literaturowe dotyczące wpływu ND na parametry rozwojowe bezkręgowców są ograniczone. Podkreślić należy brak analiz opisujących skutki przewlekłego, wielopokoleniowego narażenia u owadów na te ksenobiotyki. Należy także wspomnieć, że publikowane badania najczęściej prowadzone były na modelach *in vitro* (Liu et al., 2007, 2009; Xing et al., 2011; Zhang et



Ryc. 2. Porównanie powierzchni ciała *Acheta domestica* w pokoleniach, w linii H po ekspozycji na nanodiamenty w stężeniach 0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Nd02) oraz 2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Nd2).



Ryc. 3. Porównanie powierzchni ciała *Acheta domestica* w pokoleniach, w linii D po ekspozycji na nanodiamenty w stężeniach $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Nd02) oraz $2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Nd2).



Ryc. 4. Odsetek osobników wolniej rosnących (tzw. mikrusów) w pokoleniach, po ekspozycji na nanodiamenty w stężeniach 0,2 µg·g⁻¹ (Nd02) oraz 2 µg·g⁻¹ (Nd2).

al., 2012). W przeciwieństwie do badań *in vivo*, nie pozwalają one wnioskować o losach nanocząstek w organizmie oraz ogólnej odpowiedzi intoksykowanego organizmu. Wcześniejsze wyniki publikowane przez Zespół Nanotoksykologii (Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego) dowiodły o złożonym mechanizmie toksyczności ND. Karpeta-Kaczmarek et al. (2016a) zaobserwowali szereg zmian w strukturze jelit u świerszczy, które otrzymywały podawane drogą pokarmową nanodiamenty w stężeniu $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Nabłonek jelita środkowego i jelita tylnego był wyraźnie uszkodzony przez ND. Ponadto, stwierdzono korelację pomiędzy stężeniem ND w pokarmie, a stopniem uszkodzenia struktury komórek nabłonka. Dodatkowo, zaproponowano potencjalny mechanizm toksyczności ND, które, jako czynnik stresowy, można powiązać z uruchomieniem procesów autofagii, w tym mitofagii i retikulofagii (Karpeta- Kaczmarek et al., 2016a). Prowadzono także eksperyment, w których oceniano toksyczność nanodiamentów u *Acheta domesticus* po przewlekłej ekspozycji na dwa różne stężenia (20 i $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pokarmu) podawanych przez całe życie. Badania aktywności enzymów stresu oksydacyjnego, całkowitej pojemności antyoksydacyjnej oraz poziomu białka szoku cieplnego dostarczyły danych o istotnym wzroście mierzonych parametrów, po 7 tygodniach ekspozycji u osobników narażonych na wyższe stężenia ND. Dane te pokrywają się z wynikami testu kometowego, który wykazał niestabilność DNA u owadów, zwłaszcza eksponowanych na dawkę $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Autorzy konkludowali, że toksyczność ND jest zależna od stężenia, podczas gdy wysokie dawki oddziałują w sposób toksyczny, śladowe ilości, których udział w środowisku jest bardziej prawdopodobny, mogą być bezpieczne dla organizmów (Karpeta- Kaczmarek et al., 2016b). Co interesujące, inne badanie zespołu, na tym samym organizmie modelowym, potwierdziło przypuszczenie braku znaczącej toksyczności, w przypadku gdy ND aplikowane były krótkotrwale (10 dni) w pożywieniu. Pozwala to domniemywać o względnym bezpieczeństwie tych nanocząstek dla organizmów, podawanych w określonych warunkach (Karpeta- Kaczmarek et al., 2016c).

Opisane w przytoczonych publikacjach

niekorzystne skutki oddziaływania nanocząstek na organizmy, uwidocznione w postaci fluktuacji badanych parametrów, dostarczają cennych danych, najczęściej na poziomie komórek. Podjęte w niniejszym badaniu analizy parametrów rozwojowych świerszczy (powierzchnia i liczebność larw o wolniejszym wzroście), w odpowiedzi na podawane ND, stanowią wskaźniki punktów końcowych na poziomie organizmu. Uzyskane wyniki rozpatrywać można w kontekście dawki, danej linii (selekcja w zakresie długowieczności) lub czasu ekspozycji. W tej pracy zdecydowano się skupić na omówieniu wpływu ND na parametry rozwojowe w kontekście poszczególnych pokoleń, ponieważ wydaje się interesujące, że stanowiły one nieco inne wyzwanie dla każdego z nich.

Dane uzyskane dla pokolenia I obrazują bezpośredni efekt fizjologiczny owadów, będący skutkiem pojawienia się nowego czynnika stresogennego w środowisku. W tym przypadku nie obserwuje się efektów międzypokoleniowych (Skinner, 2014). Uzyskane wyniki wykazały, że owady pierwszego pokolenia charakteryzowały się największym rozmiarem ciała w porównaniu do pozostałych. Wyniki te są zbieżne z danymi uzyskanymi w badaniu Mohan et al. (2010), w którym fluorescencyjne nanodiamenty (FND) były wprowadzane do organizmu *Caenorhabditis elegans* poprzez karmienie koloidalnym roztworem FND. Obecność FND w komórkach nie spowodowała żadnych zmian w długości życia, potencjale rozrodczym i reprodukcyjnym nicieni. Co więcej, badania z wykorzystaniem różnych genów związanych ze stresem (czynnika transkrypcyjnego *daf-16* i ligazy glutaminianowocysteinowej *gcs-1*) nie potwierdziły wykrywalnego stresu w organizmie (Mohan et al., 2010). Z kolei Mendonça et al. (2011) ocenili toksyczny wpływ ND na przeżycie, reprodukcję i strukturę tkankową *Daphnia magna*. Przewlekła toksyczność wysokich stężeń powodowała zahamowanie reprodukcji i 100% śmiertelność (Mendonça et al., 2011). Natomiast Cid et al. (2015) wykazali zależną od stężenia indukcję niektórych reagujących na stres enzymów antyoksydacyjnych (GST, CAT) i wzrost peroksydacji lipidów uszkodzających błony komórkowe małży *Corbicula fluminea* narażonych na ND (Cid et al., 2015). Rów-

nie ważna wydaje się odpowiednia modyfikacja powierzchni nanocząstek. Marcon et al. (2010) udowodnili potencjalną embriotoksyczność i teratogenność karboksylowanych nanodiamentów u zarodków *Xenopus laevis*. Cząsteczki te miały negatywny wpływ na procesy gastrulacji i neurulacji, powodując nieprawidłowości fenotypowe i wysoką śmiertelność. W tym samym badaniu, testy żywotności komórek wykazały, że ND nie były cytotoksyczne dla komórek nerki ludzkiego zarodka 293 (HEK293) w stężeniach poniżej 50 mg mL^{-1} (Marcon et al., 2010). Z kolei zespół Nunn et al. (2018) monitorował rozwój zarodków *Danio rerio*, ryby z rodziny karpowatych, podczas ekspozycji na różne stężenia nanodiamentów. Zanotowano zależne od dawki wady w rozwoju embrionalnym obejmujące obrzęk worka żółtkowego, zgięcie ogona, nieprawidłowości płetw i obrzęk osierdziowy, natomiast opisane zmiany nie były istotne statystycznie (Nunn et al., 2018). Nasuwają się przypuszczenia, że ND podawane drogą pokarmową mogą wpływać na rozwój organizmów w sposób zależny od dawki. Dlatego wydaje się, że narażenie na niskie dawki ND, które naśladują obecne w środowisku zanieczyszczenie, jest stosunkowo bezpieczne.

Drugie pokolenie stanowiło potomstwo owadów, które przez cały cykl życiowy narażone były na działanie ND. Podobnie, osobniki te otrzymywały nanocząstki drogą pokarmową. Wiadomo, że zdolność owadów do rozwijania fenotypów odpowiednich dla ich środowiska zależy od informacji epigenetycznej. Obecnie wiadomo, że wiele czynników środowiskowych powoduje zmiany epigenetyczne, w tym obecność patogenów, pasożytów, szkodliwych chemikaliów i innych czynników stresowych (Mukherjee et al., 2015; Glastad et al., 2019). Ważne i pilne jest zatem zajęcie się tym zagadnieniem przy ocenie ryzyka związanego z nanomateriałami (Smolkova et al., 2019). W badaniu nad *Caenorhabditis elegans* wprowadzano do gonad drogą mikroiniekcji fluorescencyjne ND (FND). Następnie, cząstki te były rozpraszane w gonadzie i dostarczane do zarodków, a kolejno do wyklutych larw w następnym pokoleniu. Nie stwierdzono nieprawidłowości w rozwoju embrionalnym zarodków. Obserwacje wykazały, że FND jest biologicznie obojętny, nie powoduje żadnych nieprawidłowości w podziale

komórek, różnicowaniu lub morfogenezie podczas embriogenezy i nie wywołuje żadnej wykrywalnej reakcji na stres (Mohan et al., 2010). Można stwierdzić, że sposób podania nanocząstek w tym doświadczeniu jest dyskusyjny, gdyż nie odzwierciedla naturalnej, fizjologicznej drogi ekspozycji na ND. Podobnie, uzyskane w niniejszej pracy wyniki, wskazują na dość efektywne procesy redukcji stresu, wywołanego podawaniem ND w linii długożyjącej pokolenia II, w porównaniu do linii dzikiej. Można przypuszczać, że nałożenie dwóch czynników: wzorca epigenetycznego pochodzącego od pokolenia rodzicielskiego oraz prowadzonej selekcji, wpływa na lepsze przygotowanie do radzenia sobie ze stresem. Co ważne, różnice między liniami dzikimi i długowiecznymi w ich odpowiedzi na ND mogą być związane ze wzorcem rozmnażania. Osobniki typu dzikiego koncentrują się na szybkiej i obfitej produkcji jaj tuż po osiągnięciu dojrzałości. W przeciwieństwie do tego, owady linii długowiecznej mają rozciągnięty w czasie proces reprodukcji. Ogólnie rzecz biorąc, głównym celem linii H nie jest aktywacja obrony antyoksydacyjnej, ale zainicjowanie procesu rozmnażania (Flasz et al., 2020).

W pokoleniu trzecim wszystkie zwierzęta otrzymywały pokarm kontrolny (bez dodatku ND) przez cały cykl życiowy. Jakkolwiek, można przypuszczać, że wzorzec epigenetyczny został odziedziczony po pokoleniu rodzicielskim, narażonym na czynnik stresowy. Okazuje się jednak, że po odstawieniu ND, odziedziczone informacje genetyczne są nieaktualne, co przekłada się na dostrzegalne różnice pomiędzy badanymi grupami. W badaniu nad bezkręgowcem glebowym *Enchytraeus crypticus* narażonym wielopokoleniowo na dwa nanomateriały: węgiel wolframu oraz chlorek kobaltu, cztery pokolenia przebywały w zanieczyszczonej, a następnie dwa pokolenia w czystej glebie. Wyniki wykazały, że ekspozycja na materiał wolframowy spowodowała globalny wzrost metylacji DNA, który utrzymywał się w pokoleniach nie poddanych ekspozycji i był związany ze wzrostem reprodukcji (efekt fenotypowy). Interesujące w tym przypadku byłoby zidentyfikowanie mechanizmu, który za tym stoi, w tym jaki dokładnie mechanizm i jaka konkretnie metylacja powoduje takie zmiany (Bicho et al., 2020). W innej pracy autorzy badali wpływ nanomateria-

łów węglowych, w tym fulerenów (C60), jednościennych nanorurek węglowych (SWCNTs) i wielościennych nanorurek węglowych (MWCNTs) z neutralnymi, dodatnimi i ujemnymi grupami funkcyjnymi na rozwielitki generacji F1 i F2 po ekspozycji F0. Dane z tego badania wskazały, że toksyczność wielopokoleniowa występuje w przypadku narażenia na niektóre nanomateriały i jest w dużym stopniu zależna od składu chemicznego powierzchni nanomateriału. Autorzy wnioskowali, że badane nanomateriały nie mają silnego wielopokoleniowego wpływu na wielkość rozwielitek, gdyż żaden z zastosowanych materiałów nie wpłynął na wielkość zwierząt o więcej niż 6,5% (Arndt et al., 2014). Schultz et al. (2016) prowadzili eksperyment na populacjach *C. elegans*, które były eksponowane na działanie różnych nanomateriałów srebra (Ag) przez sześć pokoleń, a kolejne cztery pokolenia pozostawały nienarażane, aby umożliwić regenerację organizmu. Wyniki ujawniły silny, zależny od stężenia wpływ na wielkość czerwca i końcową wielkość ciała, co było zróżnicowane w zależności od postaci Ag. Badanie możliwości regeneracyjnych po wielopokoleniowym narażeniu wykazało duże podobieństwo wzorca stężenie-odpowiedź populacji tzw. recovery do wzoru reakcji ostatniego narażonego pokolenia przodków F5, niezależnie od formy zastosowanych materiałów Ag. Wskazuje to na prawdopodobne przekazanie informacji o wrażliwości przez nieeksponowane pokolenia, a nie mechanizmy regeneracyjne (Schultz et al., 2016). Należałoby się zatem zastanowić nad losami ND, które z pewnością dostają się do komórek osobników poprzedniego pokolenia. Zdolność do penetracji komórek przez ND potwierdziły badania na liniach komórkowych HeLa, w których obserwowano okołojądrową i jądrową lokalizację wewnątrzkomórkową ND (Tammam et al., 2016). Badanie przeprowadzane na komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wykazało, że 20% zastosowanych ND trafiało do jądra komórkowego (Morita et al., 2020). Daje to podstawę do rozważań na temat potencjalnych, możliwych oddziaływań pomiędzy DNA a ND. Laptinskiy et al. (2018, 2022) przeprowadzali eksperyment za pomocą spektroskopii Ramana i spektroskopii absorpcyjnej w podczerwieni (IR), którego celem było badanie oddziaływań DNA z powierzchnią

karboksylowanych nanodiamentów w zawieszynie wodnej. Stwierdzono adsorpcję komplementarnych par zasad DNA na powierzchni ND poprzez tworzenie wiązań wodorowych (Laptinskiy et al., 2018, 2022). Ponadto, inni naukowcy zasugerowali, że cząsteczki nanodiamentów mogą naśladować funkcje białek, w tym histonów, wysoce zasadowych białek, które biorą udział w składaniu i rozwijaniu DNA (Mochalin et al., 2011). W pokoleniu III niniejszej pracy obie linie zareagowały podobnie, a usunięcie ND z diety nie doprowadziło do spodziewanego powrotu parametrów typowych dla grupy kontrolnej. Być może wynikało to ze zwiększenia uszkodzeń DNA, które mogło być efektem zamierzonego, zaprogramowanego zmniejszenia stabilności genomu dla poprawy adaptacji do czynników stresowych w zmieniającym się środowisku (Augustyniak et al., 2022).

PODSUMOWANIE

Podaż nanodiamentów przez cały cykl życiowy *Acheta domesticus* przyczyniła się do ujawnienia istotnych różnic rozwojowych pomiędzy grupami eksperymentalnymi, w liniach dzikiej i długożyjącej. Wyjaśnienia takiego rezultatu można upatrywać w kumulacji molekularnych efektów, wywołanych toksycznością nanocząstek. Eksperyment dowiódł, że obie grupy traktowane ND cechowały się odmienną w stosunku do kontroli dynamiką wzrostu. Natomiast ekspozycja na niskie dawki ND w pierwszym pokoleniu wydawała się być stosunkowo bezpieczna. Potomstwo owadów narażonych na ND wykazało w zasadzie skuteczną obronę przed ND, przy czym lepiej radziły sobie zwierzęta wyselekcjonowane pod kątem długowieczności. Być może nastąpiło nasilenie mechanizmów obronnych, w tym antyoksydacyjnych, u owadów z linii selekcjonowanej w kierunku długiego życia. Przypuszcza się, że reakcje potomstwa mogą być kształtowane modyfikacjami epigenetycznymi wywołanymi przez ND. Po zaprzestaniu podawania nanocząstek diamentów (grupy recovery) badane parametry rozwojowe nie powróciły do poziomu porównywalnego dla osobników kontrolnych. Wyjaśnieniem takiego rezultatu mogą być złożone zjawiska epigenetyczne. Zaprezentowany w tej pracy eksperyment pokazał, że prawdopodobnie odziedziczony

wzorzec epigenetyczny mógł być niewłaściwy po wycofaniu czynnika stresowego. Co ważne, negatywne skutki działania ND mogą wykraczać poza czas bezpośredniego kontaktu organizmu z tymi cząstkami. Można przypuszczać, że mechanizm toksyczności ND jest bardzo złożony i nie ogranicza się jedynie do nasilenia stresu komórkowego.

Wyniki niniejszych badań mogą być pomocne w opracowaniu uregulowań prawnych oraz zasad bezpiecznego użytkowania ND, w tym dawek, czasu ekspozycji a także sposobów postępowania z pozostałościami i odpadami zawierającymi te nanocząstki.

LITERATURA

Arndt, D. A., Chen, J., Moua, M., Klaper, R.D. (2014) 'Multigeneration impacts on *Daphnia magna* of carbon nanomaterials with differing core structures and functionalizations', *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(3), pp. 541-547. doi:10.1002/etc.2439.

Augustyniak, M., Babczyńska, A., Dziewięcka, M., Flasz, B., Karpeta-Kaczmarek, J., Kędziorski, A., Mazur, B., Rozpędek, K., Seyed Alian, R., Skowronek, S., Świerczek, E., Świętek, A., Tarnawska, M., Wiśniewska, K., Ziętara, P. (2022) 'Does age pay off? Effects of three-generational experiments of nanodiamond exposure and withdrawal in wild and longevity-selected model animals', *Chemosphere*, 303, pp. 135129. doi: 10.1016/j.chemosphere.2022.135129.

Basso, L., Cazzanelli, M., Orlandi, M., Miotello, A. (2020) 'Nanodiamonds: Synthesis and Application in Sensing, Catalysis, and the Possible Connection with Some Processes Occurring in Space', *Applied Sciences*, 10(12), pp. 4094. doi: 10.3390/app10124094.

Bicho, R.C., Scott-Fordsmand, J.J., Amorim, M.J.B. (2020) 'Multigenerational Exposure to WCCo Nanomaterials-Epigenetics in the Soil Invertebrate *Enchytraeus crypticus*', *Nanomaterials (Basel)*, 10(5), pp. 836. doi:10.3390/nano10050836.

Cid, A., Picado, A., Correia, J.B., Chaves, R., Sil-

va, H., Caldeira, J., de Matos, A.P.A., Diniz, M.S. (2015) 'Oxidative stress and histological changes following exposure to diamond nanoparticles in the freshwater Asian clam *Corbicula fluminea*', *Journal of Hazardous Materials*, 284, pp. 27-34. doi: 10.1016/j.jhazmat.2014.10.055.

Dziewięcka, M. (2017) 'Ocena toksyczności in vivo tlenku grafenu (GO) u przedstawiciela bezkręgowców z gatunku *Acheta domestica* [Rozprawa doktorska, Uniwersytet Śląski w Katowicach]', Repozytorium Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. https://sbc.org.pl/Content/275338/praca_doktorska_Marta_Dziewiecka.pdf.

Flasz, B., Dziewięcka, M., Kedziorski, A., Tarnawska, M., Augustyniak, J., Augustyniak, M. (2021b) 'Multigenerational selection towards longevity changes the protective role of vitamin C against graphene oxide-induced oxidative stress in house crickets', *Environmental Pollution*, 290. doi: 117996. 10.1016/j.envpol.2021.117996.

Flasz, B., Dziewięcka, M., Kedziorski, A., Tarnawska, M., Augustyniak, M. (2020) 'Vitellogenin expression, DNA damage, health status of cells and catalase activity in *Acheta domestica* selected according to their longevity after graphene oxide treatment', *Science of The Total Environment*, 737. doi: 140274. 10.1016/j.scitotenv.2020.140274.

Flasz, B., Dziewięcka, M., Kedziorski, A., Tarnawska, M., Augustyniak, M. (2021a) 'Multigenerational graphene oxide intoxication results in reproduction disorders at the molecular level of vitellogenin protein expression in *Acheta domestica*' *Chemosphere*, 280, 130772. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.130772.

Glastad, K.M., Hunt, B.G., Goodisman, M.A.D. (2019) 'Epigenetics in Insects: Genome Regulation and the Generation of Phenotypic Diversity', *Annual Review of Entomology*, 64, pp. 185-203. doi: 10.1146/annurev-ento-011118-111914.

Stursa, J., Havlik, J., Petrakova, V., Gulka, M., Ralis, J., Zach, V., Pulec, Z., Stepan, V., Zargaleh, S.A., Ledvina, M., Nesladek, M., Treussart,

- F., Cigler, P. (2016) 'Mass production of fluorescent nanodiamonds with a narrow emission intensity distribution', *Carbon NY*, 96, pp. 812-818. doi: 10.1016/j.carbon.2015.09.111.
- Karpeta-Kaczmarek, J., Augustyniak, M., Rost-Roszkowska, M. (2016a) 'Ultrastructure of the gut epithelium in *Acheta domesticus* after longterm exposure to nanodiamonds supplied with food', *Arthropod Structure & Development*, 1, pp. 12.
- Karpeta-Kaczmarek, J., Dziewięcka, M., Augustyniak, M., Rost-Roszkowska, M., Pawlyta, M. (2016b) 'Oxidative stress and genotoxic effects of diamond nanoparticles', *Environmental Research*, 148, pp. 264-272.
- Karpeta-Kaczmarek, J., Dziewięcka, M., Augustyniak, M., Rost-Roszkowska, M. (2016c) 'Effects of short-term exposure of *Acheta domesticus* to nanodiamonds in food: DNA damage but no histological alteration in tissues', *Carbon*, 110, pp. 458-468. doi: 10.1016/j.carbon.2016.09.053.
- Karpeta-Kaczmarek, J., Kedziorski, A., Augustyniak-Jablokow, M., Dziewięcka, M., Augustyniak, M. (2018) 'Chronic toxicity of nanodiamonds can disturb development and reproduction of *Acheta domesticus* L.', *Environmental Research*, 166. doi: 10.1016/j.envres.2018.05.027.
- Laptinskiy, K.A., Burikov, S.A., Vervalde, A.M., Dolenko, T.A. (2022) 'Raman and CARS spectroscopy of interactions of nanodiamonds with DNA strands in water', *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 30(1), pp. 66-70. doi: 10.1080/1536383X.2021.1993830.
- Laptinskiy, K.A., Vervalde, E.N., Bokarev, A.N., Burikov, S.A., Torelli, M.D., Shenderova, O.A., Plastun, I.L., Dolenko, T.A. (2018) 'Adsorption of DNA Nitrogenous Bases on Nanodiamond Particles: Theory and Experiment', *The Journal of Physical Chemistry C*, 122 (20), pp. 11066-11075. doi: 10.1021/acs.jpcc.7b12618.
- Liu, K.K., Cheng, C.L., Chang, C.C., Chao, J.I. (2007) 'Biocompatible and detectable carboxyated nanodiamond on human cell', *Nanotechnology*, 18. doi: 10.1088/0957-4484/18/32/325102.
- Liu, K.K., Wang, C.C., Cheng, C.I., Chao, J.I. (2009) 'Endocytic carboxyated nanodiamond for the labeling and tracking of cell division and differentiation in cancer and stem cells', *Biomaterials*, 30, pp. 4249-4259.
- Ma, M., Guan, P., Mukerabigwi, J.F., Yan, F., Chen, D., Sun, Y., Huang, X., Cao, Y. (2021) 'Nanodiamond conjugated fluorescein through ethylenediamine linker for cellular biomarking', *Diamond and Related Materials*, 118. doi: 10.1016/j.diamond.2021.108546.
- Marcon, L., Riquet, F., Vicogne, D., Szunerits, S., Bodart, J.F., Boukherroub, R. (2010) 'Cellular and in vivo toxicity of functionalized nanodiamond in *Xenopus embryos*', *Journal of Materials Chemistry*, 20, pp. 8064-8069.
- Mendonca, E., Diniz, M., Silva, L., Peres, I., Castro, L., Correia, J.B., Picado, A. (2011) 'Effects of diamond nanoparticle exposure on the internal structure and reproduction of *Daphnia magna*', *Journal of Hazardous Materials*, 186, pp. 265-271.
- Mi, Z., Chen, C.B., Tan, H.Q., Dou, Y., Yang, C., Turaga, S.P., Ren, M., Vajandar, S.K., Yuen, G.H., Osipowicz, T., Watt, F., Bettiol, A.A. (2021) 'Quantifying nanodiamonds biodistribution in whole cells with correlative iono-nanoscopy', *Nature Communications*, 12. doi: 10.1038/s41467-021-25004-9.
- Mishra, R., Chhalodia, A.K., Tiwari, S.K. (2018) 'Recent progress in nanodiamonds: Synthesis, properties and their potential applications', *Veruscript Functional Nanomaterials*, 2.
- Mochalin, V.N., Shenderova, O., Ho, D., Gogotsi, Y. (2011) 'The properties and applications of nanodiamonds', *Nature Nanotechnology*, 7(1), pp. 11-23.
- Mohan, N., Chen, C.S., Hsieh, H.H., Wu, Y.C., Chang, H.C. (2010) 'In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in Ca-

- enorhabditis elegans', Nano Letters, 10(9), pp. 3692-3699. doi: 10.1021/nl1021909.
- Morita, A., Hamoh, T., Sigaeva, A., Norouzi, N., Nagl, A., van der Laan, K.J., Evans, E., Schirhagl, R. (2020) 'Targeting Nanodiamonds to the Nucleus in Yeast Cells', Nanomaterials (Basel, Switzerland), 10(10), 1962. doi: 10.3390/nano10101962.
- Mukherjee, K., Twyman, R.M., Vilcinskas, A. (2015) 'Insects as models to study the epigenetic basis of disease' Progress in Biophysics and Molecular Biology', 118, pp. 69-78. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2015.02.009.
- Nunn, N., d'Amora, M., Prabhakar, N., Panich, A.M., Froumin, N., Torelli, M.D., Vlasov, I., Reineck, P., Gibson, B., Rosenholm, J.M., Giordani, S., Shenderova, O. (2018) 'Fluorescent single-digit detonation nanodiamond for biomedical applications', Methods and Applications in Fluorescence, 6, 035010.
- Research and Markets. Metal Nanoparticles - Global Market Trajectory & Analytics. https://www.researchandmarkets.com/reports/5030157/metal-nanoparticles-global-markettrajectory?utm_source=CI&utm_medium=PressRelease&utm_code=s2d9cv&utm_campaign=1418460+-+Metal+Nanoparticles+Market+Study+2020+2027%3a+Growing+at+a+CAGR+of+14.2%25+Despite+C OVID 19&utm_exec=joca220prd (data dostępu: 19.06.2022r.).
- Schultz, C.L., Wamucho, A., Tsyusko, O.V. (2016) 'Multigenerational exposure to silver ions and silver nanoparticles reveals heightened sensitivity and epigenetic memory in *Caenorhabditis elegans*', Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 283(1832), 20152911. doi: 10.1098/rspb.2015.2911.
- Skinner, M.K. (2014) 'Environmental stress and epigenetic transgenerational inheritance', BMC Medicine, 12. doi: 10.1186/s12916-014-0153-y.
- Smolkova, B., Dusinska, M., Gabelova, A. (2019) 'Epigenetic Effects of Nanomaterials', Editor(s):
- Nriagu J., Encyclopedia of Environmental Health (Second Edition), Elsevier, 678-685.
- Tammam, S.N., Azzazy, H.M.E., Lamprecht, A. (2016) 'How successful is nuclear targeting by nanocarriers', Journal of Controlled Release, 229, pp. 140-153. doi: 10.1016/j.jconrel.2016.03.022.
- Turcheniuk, K., Mochalin, V.N. (2017) 'Biomedical applications of nanodiamond', Nanotechnology, 28(25), 252001.
- Xing, Y., Xiong, W., Zhu, L., Osawa, L., Hussin, S., Dai, L. (2011) 'DNA damage in embryonic stem cells caused by nanodiamonds', ACS Nano, 5, pp. 2376-2384.
- Yuan, Y., Wang, X., Jia, G., Liu, J.H., Wang, T., Gu, Y., Yang, S.T., Zhen, S., Wang, H., Liu, Y. (2010) 'Pulmonary toxicity and translocation of nanodiamonds in mice', Diamond and Related Materials, 19, pp. 291-299.
- Zhang, X., Hu, W., Li, J., Tao, L., Wei, Y. (2012) 'A comparative study of cellular uptake and cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes, graphene oxide, and nanodiamond', Toxicology Research, 1, pp. 62-68.

§ Praca wpłynęła do redakcji: 30.06.2022r.

Zrecenzowano: 29.08.2022r.

Przyjęto do druku: 04.09.2022r.