

NATALIA TOPA^{1,2} , JOANNA HOMA¹ 

Autor korespondencyjny, e-mail: natalia.topa@doctoral.uj.edu.pl

¹ Zakład Immunologii Ewolucyjnej, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Uniwersytet Jagielloński, ul. Gronostajowa 9, 30-387 Kraków

Department of Evolutionary Immunology, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, Gronostajowa 9, 30-387 Cracow

² Szkoła Doktorska Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, Wydział Biologii, Uniwersytet Jagielloński
The Doctoral School of Exact and Natural Sciences, Faculty of Biology, Jagiellonian University

Nanomateriały kontra natura: jak rośliny i zwierzęta ewoluują, by radzić sobie z nowoczesnymi wyzwaniami

Nanomaterials vs nature: how plants and animals evolve to cope with modern challenges

DOI: <https://doi.org/10.12775/KOSMOS.2024.007>

Abstrakt

Interakcje między nanomateriałami (ENMs) a wrodzonym układem odpornościowym stanowią istotny element adaptacji organizmów do zmieniającego się środowiska. Mimo ewolucyjnych różnic, mechanizmy obronne roślin i zwierząt wykazują podobieństwa w rozpoznawaniu i eliminacji obcych cząstek. Do ich rozpoznania, rośliny wykorzystują receptory odporności wrodzonej na poziomie każdej komórki, podczas gdy zwierzęta angażują wyspecjalizowane komórki immunokompetentne, takie jak np. fagocyty. Nanocząstki oddziałują z tymi systemami, indukując reakcje stresowe, w tym produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) oraz aktywację receptorów TLR. Wpływ nanomateriałów zależy od ich właściwości fizykochemicznych, a także od gatunku organizmu i warunków środowiskowych. Zrozumienie tych interakcji ma kluczowe znaczenie dla oceny potencjalnego ryzyka toksyczności oraz dla wykorzystania nanotechnologii w biomedycynie i inżynierii środowiskowej. Celem niniejszej pracy jest przegląd aktualnej wiedzy na temat tych interakcji oraz wskazanie kierunków dalszych badań.

Słowa kluczowe: nanomateriały, wrodzony układ odpornościowy, interakcje, stres oksydacyjny, toksyczność

Abstract

Interactions between engineered nanomaterials (ENMs) and the innate immune system are a crucial aspect of organism adaptation to changing environments. Despite evolutionary differences, the defense mechanisms of plants and animals show similarities in recognition and elimination of foreign particles. For this purpose, plants utilize innate immunity receptors at the cellular level, whereas animals engage specialized immunocompetent cells, such as phagocytes. Nanoparticles interact with these systems, inducing stress responses, including the production of reactive oxygen species (ROS) and the activation of Toll-like receptors (TLRs). The impact of nanomaterials depends on their physicochemical properties, as well as on the species of the organism and environmental conditions. Understanding of these interactions is essential for assessing the potential toxicity risks and for utilizing nanotechnology in biomedicine and environmental engineering. This review aims to provide an overview of the current knowledge on these interactions and to identify directions for future research.

Key words: nanomaterials, innate immune system, interactions, oxidative stress, toxicity

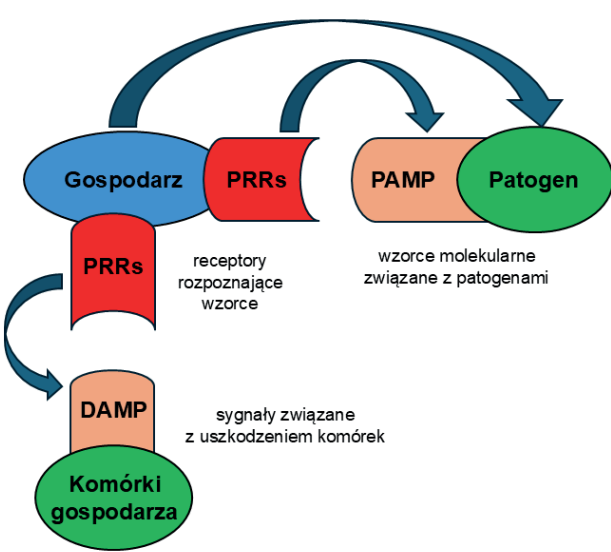
NANOMATERIAŁY A WRODZONY UKŁAD ODPORNOŚCIOWY

Nanotechnologia osiąga bardzo szerokie zastosowanie, m.in. w nauce, medycynie, elektronice, inżynierii i technologii, a także w dziedzinach chemii, biologii oraz fizyki (National Nanotechnology Initiative, www.nano.gov) i jest najlepiej prosperującą i obiecującą dziedziną nauki XXI w., która zajmuje się technikami tworzenia struktur i cząsteczek osiągających rozmiary nanometryczne (1–100 nm) (Bayda i współaut. 2019). Jednak ciągły rozwój nanotechnologii i wprowadzenie sztucznie stworzonych nanomateriałów (ENMs, z ang. *engineered nanomaterials*) wzbudzają obawy o ich potencjalny negatywny wpływ na zdrowie ludzi i na środowisko. W związku z tym prowadzone są szeroko zakrojone badania nad interakcjami ENMs z systemami biologicznymi (Fadeel i współaut. 2018; Krug i Wick 2011; Oberdörster i współaut. 2005). Organizmy żywe wykształciły mechanizmy obronne do zwalczania patogenów oraz eliminowania szkodliwych substancji i martwych komórek. ENMs, mimo że mogą przypominać patogeny pod względem rozmiaru i kształtu, oddziałują na organizmy w sposób pasywny (Boraschi i współaut. 2020). Dlatego badania, jak ENMs wchodzą w interakcje z mechanizmami obronnymi organizmów, jest kluczowe do zrozumienia ich potencjalnej toksyczności.

Głównym systemem obronnym organizmów jest odporność wrodzona, która stanowi jedyną formę ochrony ponad 95% organizmów żywych i odpowiada za około 80–90% skuteczności ochrony u kręgowców (Chumakov i współaut. 2021; Murphy i współaut. 2022). Odporność wrodzona opiera się na barierach fizycznych, chemicznych i komórkowych. Jeśli zostaną one naruszone, wrodzone mechanizmy odpornościowe eliminują około 90% pozostałych zagrożeń (Chumakov i współaut. 2021). Najważniejszym elementem odporności wrodzonej są komórki fagocytarne i receptory rozpoznające wzorce (PRRs, z ang. *pattern-recognition receptors*), takie jak receptory Toll-podobne (TLRs, z ang. *toll-like receptors*), które występują u wszystkich organizmów wielokomórkowych i służą do wykrywania patogenów (np. bakterii) (Murphy i współaut. 2022). Fagocyty mają zdolność pochłaniania oraz trawienia materiału obcego, co umożliwia eliminację niepożądanych cząstek. Receptory PRRs mają głównie zdolność rozpoznawania wzorców molekularnych związanych z patogenami (PAMPs, z ang. *pathogen-associated molecular patterns*), ale mogą także reagować na różnorodne czynniki stresowe, takie jak zmiany pH, temperatury czy zasolenia, które mogą zaburzać homeostazę organizmu (Murphy i współaut. 2022). Odpowiedź odpornościowa obejmuje różne reakcje humoralne i komórkowe, które aktywują specyficzne szlaki sygnalizacyjne w odpowiedzi na

PAMPs oraz sygnały związane z uszkodzeniem komórek (DAMPs, z ang. *damage-associated molecular pattern*) (Ryc. 1).

Cechy fizykochemiczne ENMs, takie jak rozmiar, kształt, czy ładunek powierzchniowy, wpływają na ich interakcję z fagocytami. Jednak, mimo intensywnych badań, nie udało się ustalić jednoznacznych powiązań pomiędzy właściwościami ENMs, a mechanizmami ich pochłaniania/eliminacji, co ogranicza możliwości przewidywania wyników tych interakcji. Oddziaływania ENMs z komórkami fagocytującymi zależą od kondycji zdrowotnej organizmu, drogi ekspozycji na ENMs oraz rodzaju zaangażowanych w obronę komórek (Baranska i współaut. 2018). W tym przeglądzie skupiamy się na interakcji między nanomateriałami a wrodzonym układem odpornościowym w wybranych grupach roślin i zwierząt, skupiając się na mięczakach, pierścienicach, skorupiakach, szkarłupniach i rybach (Ryc. 2, Tab. 1).



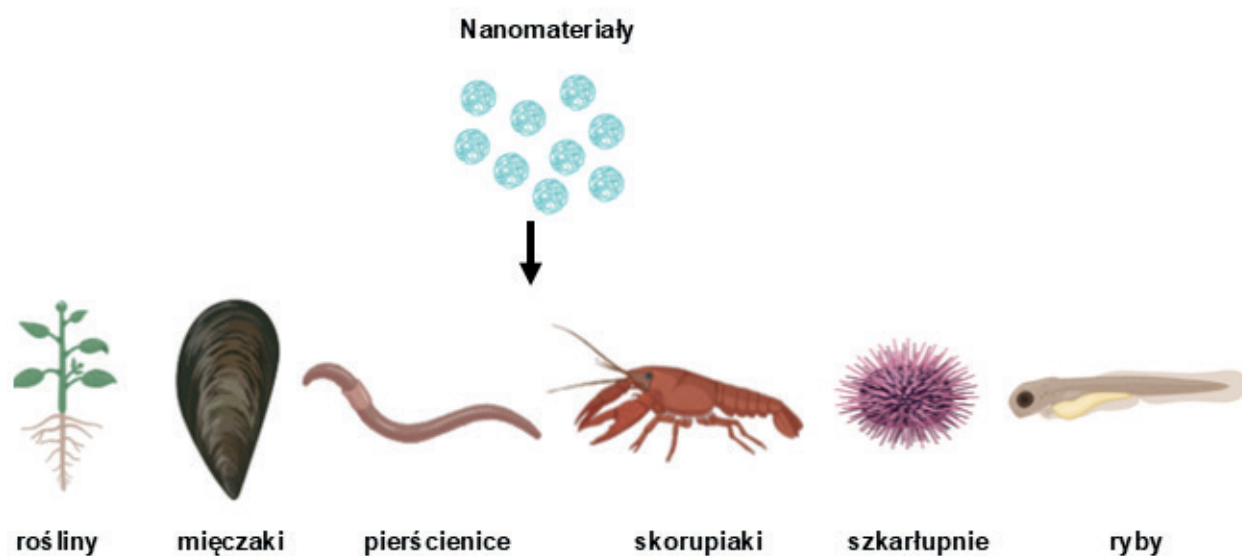
Ryc. 1. Rozpoznawanie wzorów molekularnych związanych z patogenami (PAMPs) oraz sygnałów związanych z uszkodzeniem komórek (DAMPs) przez receptory rozpoznające wzorce (PRRs). Opracowanie własne (zmienione za Zheng 2024, opis w tekście)

Tab. 1. Ewolucja układu odpornościowego wybranych grup roślin i zwierząt (opis w tekście)

Organizm	Typy komórek odporności wrodzonej	Obrona na poziomie organizmu	Odpowiedź komórkowa	Odpowiedź humoralna
Rośliny	Wszystkie komórki	Ściana komórkowa, Kutikula	Reakcja nadwrażliwości, PTI, ETI	Produkcja ROS, Hormony
Małże	Hemocyty	Muszla, Śluz	Fagocytoza, Enkapsulacja, Aktywność proPO	Produkcja ROS/NO, Lizozym
Dżdżownice	Celomocyty	Oskórek, Śluz, Grzbietowe pory w ciele (celomodukty), Autonomia (odrzućcie końcowych segmentów ciała)	Fagocytoza, Enkapsulacja, Aktywność proPO	CCF, LBP/BPI, Lizozym, Fetydyna, Produkcja ROS/NO
Raki	Hemocyty	Oskórek, Warstwa woskowa i biofilm, Przewód pokarmowy	Fagocytoza, Enkapsulacja, Melanizacja, Aktywność proPO	Produkcja AMP, Lizozym, Proteazy, System krzepnięcia, Receptory PRRs
Jeżowce	Amebocyty, Komórki wibrujące	Bariera jelita	Fagocytoza, Enkapsulacja	PRRs: TLRs, NLRs, Białka zawierające domenę SRCR

Tab. 1. Ewolucja układu odpornościowego wybranych grup roślin i zwierząt (opis w tekście) – cd.

Organizm	Typy komórek odporności wrodzonej	Obrona na poziomie organizmu	Odpowiedź komórkowa	Odpowiedź humoralna
Ryby	Makrofagi, Granulocyty, Monocyty, Komórki dendrytyczne	Skóra, Śluz, Łuski, Skrzela, Przewód pokarmowy	Fagocytoza, Mediatory zapalne, Cytotoksyczność zależna od przeciwciał (ADCC)	Lizozym, Interferony, Białka ostrej fazy, Układ dopełniacza

**Ryc. 2.** Wybrane grupy organizmów omówione w poniższym przeglądzie. Opracowanie własne (Bio-Render.com.)

ROŚLINY

Rośliny, w przeciwieństwie do zwierząt, nie posiadają wyspecjalizowanych tkanek i komórek immunokompetentnych. Ich odpowiedź odpornościowa odbywa się na poziomie każdej komórki. Rośliny są w stanie rozpoznawać zagrożenia dzięki receptorom znajdującym się w błonach komórkowych i cytoplazmie. Receptory te, nazywane receptorami odporności wrodzonej, wykrywają obce cząstki i sygnały związane z patogenami, co aktywuje odpowiedzi odpornościowe (Ngou i współaut. 2022; Zhou i Zhang 2020). Wyróżnia się dwa główne mechanizmy odporności roślin: odporność aktywowaną wzorcem (PTI, z ang. *pattern-triggered immunity*) oraz odporność aktywowaną efektem (ETI, z ang. *effector-triggered immunity*). PTI jest uruchamiana przez zewnętrzne

sygnały, np. obecność patogenów, natomiast ETI przez wewnętrzne reakcje komórek związane z efektem działania patogenów. Oba typy odpowiedzi mają na celu ochronę roślin przed czynnikami szkodliwymi (Boraschi i współaut. 2023). Receptory odpornościowe u roślin są podobne pod względem budowy do występujących u zwierząt receptorów TLR, co sugeruje, że mechanizmy obronne obu królestw ewoluowały niezależnie. W chwili gdy patogen zostaje rozpoznany przez komórki roślin, uruchamiany zostaje szereg reakcji biochemicznych, w tym produkowane zostają fitocytokiny, które pełnią funkcję sygnałową i wzmacniają reakcję na stres poprzez mobilizację innych komórek do działania (Gust i współaut. 2017).

Wchłanianie nanomateriałów przez rośliny jest tematem, który wzbudza wiele dyskusji. Rośliny nie mają wyspecjalizowanych komó-

rek fagocytarnych, a wchłanianie nanocząstek (ENMs) może zachodzić na poziomie wszystkich komórek budujących tkanki roślin. Wchłanianie zachodzi zwykle przez bariery fizyczne, takie jak kutikula, ściana komórkowa i błona komórkowa, które chronią roślinę przed obcymi substancjami (Schwab i współaut. 2016). W tkankach nadziemnych ENMs mogą być wchłaniane przez naturalne otwory takie jak aparaty szparkowe, czy przetchlinki. W korzeniach mogą natomiast wnikać przez pory ścian komórkowych, a następnie przemieszczać się drogą apoplastyczną (przez ściany komórkowe ksylemu) lub symplastyczną (przez cytozol komórek ksylemu). Pory ściany komórkowej roślin mają wielkość 3–6 nm, co uniemożliwia przenikanie przez nie większych cząstek (Sabot-Attwood i współaut. 2012). Nanocząstki złota (AuNPs) o rozmiarach 4–12 nm są zatrzymywane w ścianie komórkowej i nie mogą być pochłaniane przez korzenie roślin, co przebadano na gatunku *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik pospolity) (Ferrari 2022). Jednak u kilku gatunków roślin, np. u *Brassica juncea* (kapusta sitowata) zaobserwowano pochłanianie ENMs większych niż rozmiary porów ściany komórkowej, co sugeruje, że zmiany w strukturze ściany, jej elastyczność lub transport aktywny mogą umożliwić przenikanie takich cząstek. Ponadto stwierdzono, że małe dodatnio naładowane AuNPs (< 5 nm) są pochłaniane skuteczniej niż neutralne lub ujemnie naładowane większe cząstki (Ali i współaut. 2021).

Nanocząstki złota, które są ogólnie uznawane za stosunkowo bezpieczne, są często używane do badań nad wpływem nanomateriałów na odporność roślin. Wyniki badań są jednak zróżnicowane w zależności od warunków eksperymentalnych. Niektóre z nich wskazują, że AuNPs mogą być nieprzyswajalne przez rośliny, podczas gdy inne sugerują, że ich działanie może być wynikiem, np. blokowania porów komórkowych lub interakcji z czynnikami zewnętrznymi, które wywołują odpowiedzi obronne (Siddiqi i Husen 2016). W wielu badaniach nie wykryto efektów stosowania nanozwiązków, nawet przy różnych stężeniach (Pacheco i Buzea 2018), co może być niedostatecznie reprezentowane w li-

teraturze, ponieważ badania prezentujące wyniki negatywne są rzadziej publikowane. Niektóre eksperymenty sugerują jednak, że wysokie stężenia AuNPs, np. powyżej 100 mg/l, mogą mieć negatywny wpływ na rośliny, podczas gdy niższe stężenia (poniżej 50 mg/l) mogą wspomagać kiełkowanie nasion, wzrost roślin, a także zwiększać zawartość chlorofilu (Arora i współaut. 2012; Kumar i współaut. 2013). W przypadku umiarkowanych stężeń obserwowano redukcję stresu oksydacyjnego, w tym produkcji reaktywnych form tlenu (ROS, z ang. *reactive oxygen species*), co może poprawiać ogólną kondycję roślin i zwiększać ich odporność na stres (Ferrari i współaut. 2021). Obecnie wiadomo, że interakcje między nanocząstkami, a roślinami są bardzo zróżnicowane oraz trudne do przewidzenia, a ich skutki mogą różnić się w zależności od gatunku rośliny, rodzaju nanocząstek oraz warunków środowiskowych (Ali i współaut. 2021; Boraschi i współaut. 2023).

MIĘCZAKI

Układ odpornościowy mięczaków, do których należą m.in. małże, ostrygi i kalmary, stanowią wyspecjalizowane komórki immunokompetentne, zwane hemocytami. Hemocyty pod względem morfologii dzielą się na trzy główne typy: hialinowe, semigranularne i granularne, a różnorodność tych komórek zależy od wielu czynników, zarówno środowiskowych, jak i biologicznych, w tym infekcji przez mikroorganizmy, takie jak bakterie, wirusy czy pierwotniaki (Dyachuk 2016). Hemocyty odgrywają główną rolę w obronie przed patogenami poprzez fagocytozę oraz produkcję czynników humoralnych, takich jak aglutyniny, enzymy lizosomalne (np. lizozym), ROS oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMPs, z ang. *antimicrobial peptides*) (Canesi i współaut. 2002). W genomach wielu mięczaków zidentyfikowano także geny kodujące receptory TLR (Brennan i Gilmore 2018).

Interakcje pomiędzy układem odpornościowym a nanomateriałami zostały najlepiej zbadane u małży, które są organizmami osiadłymi występującymi w ekosystemach słodkowodnych i morskich. Dodatkowo, małże są ważnymi zwie-

rzętami hodowanymi w akwakulturze, co przyczynia się do szerszego zakresu badań nad ich interakcjami z nanomateriałami. Ich sposób odżywiania, który jest oparty na filtracji wody za pomocą skrzelii, sprawia, że są one szczególnie narażone na różne stresory środowiskowe. Z tego powodu małże rozwinęły wysoce rozwinięte mechanizmy wchłaniania cząsteczek nano- i mikroskalowych poprzez endocytozę i fagocytozę, co jest niezbędne do procesów, takich jak trawienie wewnętrzne oraz odpowiedź odpornościowa na patogeny (Boraschi i współaut. 2023; Canesi i współaut. 2012; Canesi i Corsi 2016). W badaniach nad wpływem nanomateriałów na funkcje hemocytów małży, zaobserwowano dużą różnorodność wyników, która zależała od rodzaju stosowanego nanomateriału, gatunku małży oraz warunków ekspozycji. Na przykład, u gatunku *Mytilus galloprovincialis* (omulek śródziemnomorski) narażonego na działanie nanocząsteczek tlenku tytanu (TiO_2), zauważono, że ich stężenie miało wpływ na stabilność błon lizosomalnych oraz aktywność fagocytarną, a także prowadziło do wzrostu produkcji ROS i tlenku azotu (NO , z ang. *nitric oxide*) co wskazywało na wywołanie stresu oksydacyjnego w komórkach (Barmo i współaut. 2013). W przypadku gatunku małży *Tegillarca granosa*, długotrwałe narażenie na wysokie stężenia nanocząsteczek TiO_2 (10–100 mg/l) prowadziło do znacznego zmniejszenia liczby hemocytów oraz ich aktywności fagocytarnej, a także do obniżenia ekspresji genów kodujących receptory PRRs i innych cząsteczek związanych z odpowiedzią odpornościową (Shi i współaut. 2017).

W ostatnich latach wzrosło również zainteresowanie toksycznością wywołaną mikro- i nanoplastikiem (M-NPLs, z ang. *microplastics and nanoplastics*), które wynika głównie z degradacji plastiku w oceanach, co przyczyniło się do badań nad interakcjami M-NPLs z układem odpornościowym małży. W przykładowych badaniach wykorzystano różne typy nanopolimerów jako zamienników NPLs, w szczególności nanocząstki polistyrenowe (PS-NPs). Eksperymenty pokazały, że NPLs mogą być wchłaniane przez hemocyty, wywołując różnorodne reakcje, takie jak zmniejszenie fagocytozy oraz wzrost pro-

dukcji toksycznych rodników tlenowych (Auguste i współaut. 2021a, 2021b). Badania wykazały, że interakcje z nanoplastikiem zależą od cech cząstek (rozmiar, ładunek powierzchniowy) oraz warunków eksperymentalnych (stężenie, czas ekspozycji). Zauważono również różne reakcje w zależności od subpopulacji hemocytów, przy czym najbardziej zaangażowane w odpowiedź odpornościową były duże ziarniste hemocyty, które są w pełni dojrzałymi fagocytami (Sendra i współaut. 2020). Badania na mięczakach, a w szczególności małżach, wykazują złożone interakcje z nanomateriałami, które mogą wpływać na funkcje hemocytów i wywoływać stres komórkowy, co podkreśla potrzebę dalszych badań nad ich mechanizmami adaptacyjnymi i potencjalnymi zagrożeniami środowiskowymi.

DŹDŻOWNICE

Dżdżownice są organizmami kosmopolitycznymi, które mają bardzo duże znaczenie glebotwórcze. Ze względu na środowisko ich bytowania, które obfituje w mikroorganizmy, grzyby i inne patogeny, dżdżownice wykształciły skuteczne mechanizmy wrodzonej odpowiedzi odpornościowej oparte na mechanizmach komórkowych oraz humoralnych (Kauschke i współaut. 2007). Pierwszą linię obrony dżdżownic przed patogenami stanowi wór powłokowo-mięśniowy, zbudowany z jednowarstwowego nabłonka (oskórka) i dwóch warstw mięśni – okrężnych i podłużnych. Oskórek zawiera mukopolisacharydy, które stanowią barierę antydrobnoustrojową oraz matrycę dla włókien kolagenowych. Komórki oskórka wydzielają śluz, lipidy i białka, chroniący przed patogenami. Jednak główną rolę w reakcji odpornościowej odgrywają komórki immunokompetentne – celomocyty (Bilej i współaut. 2000; Matejko i współaut. 2016; Roubalová i współaut. 2015). Układ odpornościowy dżdżownic umiejscowiony jest w celomie, która jest wypełniona płynem celomatycznym, zawierającym oprócz celomocytów, także liczne czynniki humoralne (Dvořák i współaut. 2016). Celomocyty dzielą się na dwie główne populacje: amebocyty, których główną funkcją jest obrona

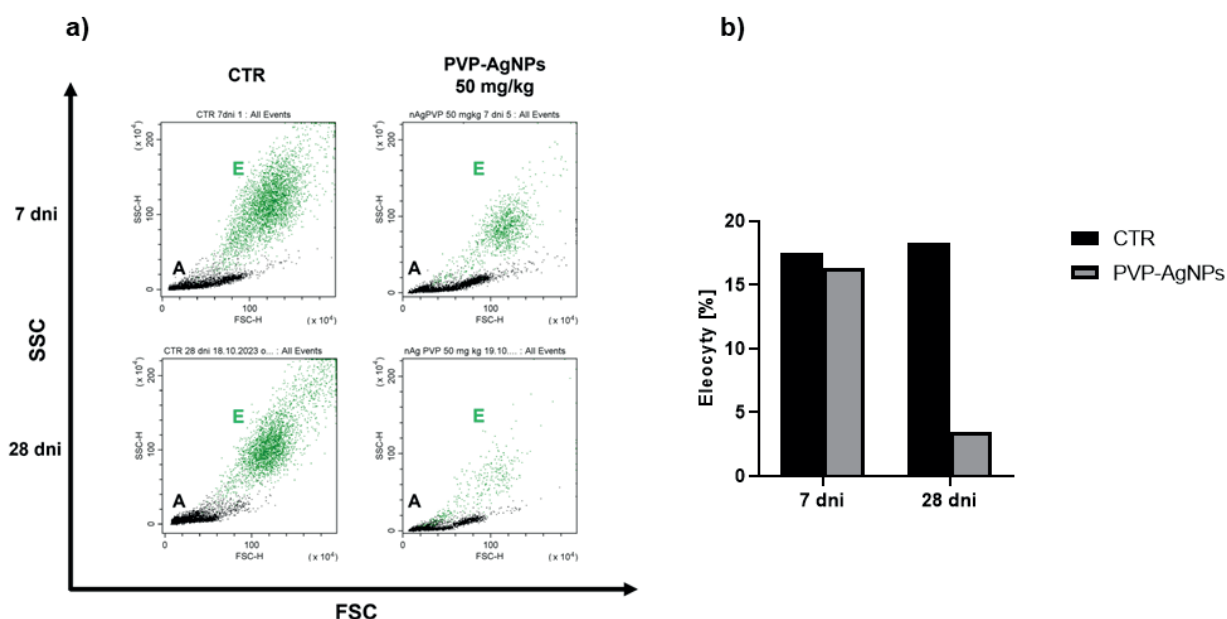
organizmu przed patogenami poprzez fagocytozę i enkapsulację (Adamowicz 2005; Kurek i współaut. 2007) oraz eleocyty, które gromadzą substancje zapasowe, wspierają detoksykację tkanek, biorą udział w akumulacji metali ciężkich, utrzymaniu prawidłowego pH płynu celomatycznego oraz odpowiedniej równowagi jonowej organizmu (Homa i współaut. 2010; Matejko i współaut. 2016; Płytycz i współaut. 2006). Do mechanizmów eliminacji patogenów u dżdżownic zalicza się fagocytozę, enkapsulację oraz usuwanie patogenów przez metanefrydia (narządy wydalnicze). Dżdżownice posiadają także mechanizmy humoralne wrodzonej odpowiedzi odpornościowej, wytwarzane przez celomocyty. Do czynników humoralnych należą m.in. białka przeciwbakteryjne, białka lityczne, proteazy i czynniki wspomagające fagocytozę, enkapsulację oraz procesy krzepnięcia. Przykładami takich czynników są m.in. lizozym, fetydyna, białko LBP/BPI, cytolityczny czynnik celomatyczny (CCF, z ang. *coelomic cytolytic factor*) oraz mitogeny celomatyczny (CMF, z ang. *coelomic mitogenic factor*) (Cooper i Roch 2003; Ghosh 2018). Czynniki te pełnią funkcje proteolityczne, cytolityczne, hemaglutynacyjne i przeciwnowotworowe (Bhorgin i Uma 2014; Cooper i współaut. 2001).

Badania nad wpływem nanomateriałów na układ odpornościowy pierścienic są ograniczone, a większość prac dotyczy ekspozycji dżdżownic na nanocząstki srebra (AgNPs). Po narażeniu dżdżownic z rodzaju *Eisenia* na AgNPs, wykazano akumulację tych cząstek w komórkach, szczególnie w amebocytach, co prowadziło do stresu oksydacyjnego i mitochondrialnego, apoptozy oraz zmian w ekspresji genów, w tym genów kodujących receptory TLR (Hayashi i współaut. 2012; Bodó i współaut. 2020). Profilowanie transkryptomiczne potwierdziło, że pod wpływem AgNPs dochodzi w komórkach dżdżownic do wzrostu ekspresji genów związanych z TLR (*lbp/bpi*) i sygnalizacją wewnątrzkomórkową (*mekk1*, z ang. *mitogen activated kinase*) (Hayashi i współaut. 2016). Ponadto, aktywność fagocytarna celomocytów wzrastała po ekspozycji na nanocząstki tlenku miedzi (CuO NPs) oraz żelaza

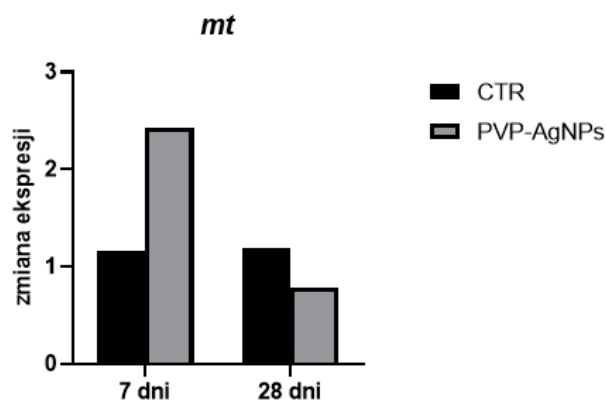
(nZVI), z jednoczesnym wzrostem peroksydacji lipidów (Pacheco i współaut. 2021; Semerad i współaut. 2020). Z kolei u dżdżownic z gatunku *Lumbricus rubellus* narażenie na fuleren C60 (cząsteczkę składającą się z 60 atomów węgla ułożonych w kształt przypominający piłkę futbolową) zmniejszało ekspresję CCF, sugerując działanie immunosupresyjne (van der Ploeg i współaut. 2014). Badania *in vivo* wykazały, że AgNPs u różnych gatunków dżdżownic gromadzą się głównie w ścianach jelit, tkance chlo-ragogenowej i metanefrydiach, co sugeruje, że są one tą drogą wchłaniane, detoksykowane i wydalone (Diez-Ortiz i współaut. 2015; Garcia-Velasco i współaut. 2016). Ponadto, AgNPs powodują stres oksydacyjny, peroksydację lipidów, apoptozę oraz utratę masy ciała zwierząt (Lapied i współaut. 2010; Saleeb i współaut. 2020). Przykładowo, narażenie dżdżownic *Eisenia fetida* na nanosrebro powlekane poliwinylpirolidonem (PVP-AgNPs) o stężeniu 100 mg/kg gleby przez 7 dni nie powodowało śmiertelności, jednak przy ekspozycji 14-dniowej śmiertelność wynosiła 10%. Wyższe stężenia tego nanosrebra (200–300 mg/kg) powodowały znacznie większą śmiertelność, sięgającą nawet 95–100% po 7 i 14 dniach (Garcia-Velasco i współaut. 2016). Nasze badania w warunkach glebowych na gatunku *Eisenia andrei* wykazały, że PVP-AgNPs o stężeniu 50 mg/kg gleby powoduje spadek udziału procentowego eleocytów po długotrwałym (28-dniowym) narażeniu na ten związek (Ryc. 3. a–b). Dodatkowo po krótkotrwałej (7-dniowej) ekspozycji na to nanosrebro zaobserwowaliśmy podwyższoną ekspresję genu kodującego metalotioneinę (*mt*), czyli białka mającego zdolność do zwalczania stresu oksydacyjnego, który może być spowodowany m.in. skażeniem metalami ciężkimi (Ryc. 4) (wyniki własne, niepublikowane). W przypadku narażenia dżdżownic *Metaphira posthuma* na zawarte w glebach CuO NPs zaobserwowano spadek aktywności fagocytarnej celomocytu oraz produkcji NO, co wskazuje na szkodliwy wpływ tych nanocząsteczek na układ odpornościowy (Gautam i współaut. 2018). Badania na pierścienicach wykazały ponadto, że nanomateriały mogą wpływać na funkcje od-

pornościowe, co może skutkować uszkodzeniami tkanek, utratą masy ciała i wzrostem śmiertelności osobników. Jednak toksyczność zależy

przede wszystkim od zastosowanej w tworzeniu nanocząsteczki powłoki, stężenia związku oraz czasu ekspozycji.



Ryc. 3. Przykładowe wyniki uzyskane w badaniach nad wpływem traktowania dżdżownic gatunku *Eisenia andrei* nanocząstkami srebra powlekanych poliwinylpirolidonem (PVP-AgNPs) o stężeniu 50 mg/kg gleby w warunkach *in vivo* po 7 i 28 dniach. a) Reprezentatywne wykresy dot plot analizy cytometrycznej celomocytów. Wszystkie wykresy wskazują populację amebocytów (A) oraz eleocytów (E). FSC – wielkość komórek, SSC – ziarnistość komórek. b) Procentowy udział eleocytów użytych z analiz w cytometrze przepływowym



Ryc. 4. Wpływ ekspozycji krótkoterminowej (7 dni) i długoterminowej (28 dni) dżdżownic gatunku *Eisenia andrei* na nanocząstki srebra powlekane poliwinylpirolidonem (PVP-AgNPs) o stężeniu 50 mg/kg gleby na ekspresję genu kodującego białka stresu wiążącego metale ciężkie, metalotioneiny (*mt*)

SKORUPIAKI

Skorupiaki jako grupa stawonogów, która obejmuje wiele gatunków morskich, słodkowodnych oraz lądowych posiadają złożony układ odpornościowy. W środowisku naturalnym skorupiaki często napotykają na różne czynniki stresogenne, takie jak zmienne zasolenie, tempera-

tura, metale ciężkie i nanomateriały, co wpływa na ich reakcje immunologiczne. Jedną z typowych reakcji skorupiaków na stresory, takie jak czynniki fizyczne i chemiczne jest hiperglikemia, podczas której dochodzi do zwiększonej produkcji hormonu hiperglikemicznego (CHH, z ang. *crustacean hyperglycemic hormone*). Hormon ten reguluje metabolizm energetyczny, umożli-

wiając mobilizację rezerw energetycznych, co pomaga organizmowi przystosować się do trudnych warunków. Podobny wzrost poziomu CHH obserwuje się podczas infekcji wirusowych lub zakażeń pasożytniczych. Tak więc u skorupiaków istnieje skomplikowana sieć neuroendokrynno-immunologiczna, która pomaga w utrzymaniu homeostazy w obliczu tych zagrożeń (Boraschi i współaut. 2023).

W układzie odpornościowym skorupiaków najważniejszą rolę pełnią hemocyty, które są zaangażowane w procesy takie jak fagocytoza, enkapsulacja oraz liza obcych cząstek, a także w produkcję różnorodnych czynników humoralnych, w tym substancji przeciwdrobnoustrojowych, czynników krzepnięcia i inhibitorów proteaz, np. serpiny, inhibitory tripsyny i elastazy (Griffith i współaut. 2014; Iwanaga i Lee 2005). Fagocytoza, będąca kluczowym mechanizmem obronnym skorupiaków, umożliwia eliminację patogenów oraz usuwanie martwych komórek i fragmentów tkanek (Liu i współaut. 2020). Do receptorów biorących udział w fagocytozie należą m.in. lektyny oraz receptory immunoglobulinowe. Szczególną rolę odgrywa tu receptor Dscam (z ang. *Down syndrome cell adhesion molecule*), występujący wyłącznie u stawonogów, który może wiązać cząsteczki powierzchniowe bakterii, np. lipopolisacharydy i peptydoglikany, co ułatwia ich fagocytozę. W formie związanej z błoną komórkową Dscam promuje fagocytozę w hemocytach, a jego rozpuszczalna forma działa jako opsonina, przyciągając patogeny i ułatwiając ich rozpoznanie (Li i współaut. 2018). Badania sugerują, że receptory Dscam mogą być aktywowane w odpowiedzi na uszkodzenia tkankowe, co podkreśla ich rolę w utrzymaniu homeostazy (Jin i współaut. 2013).

Nanomateriały mogą istotnie wpływać na układ odpornościowy skorupiaków. Badania na gatunku raka *Cherax quadricarinatus* (rak czerwonoszczypcy) wykazały, że różne rodzaje nanocząsteczek, w tym polistyrenowe, są łatwo wchłaniane przez granulocyty (Boraschi i współaut. 2023). Natomiast w eksperymentach na gatunku lądowego skorupiaaka z rzędu równonogów *Porcellio scaber* (prosionek szorstki) z użyciem nanocząstek tlenku ceru (CeO_2NP)

zaobserwowano wzrost stężenia NO, co wskazuje na odpowiedź odpornościową i reakcję na uszkodzenie tkanek (Hayashi i współaut. 2016). Z kolei nanocząstki złota (AuNP) były biologicznie obojętne w tych samych testach, co sugeruje różnice w odpowiedziach w zależności od typu nanomateriału (Mayall i współaut. 2021). Inne eksperymenty na tym gatunku wykazały, że ekspozycja na nanocząstki może zwiększać lub zmniejszać ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w reakcję immunologiczną, zależnie od typu i wielkości cząstek. Badania sugerują również, że skorupiaki mogą rozpoznawać nanomateriały jako potencjalne zagrożenie, zwłaszcza gdy cząstki te tworzą biomolekularne korony z samoczynnie zmodyfikowanych białek, które mogą być identyfikowane przez układ odpornościowy jako „zmienione własne” (Matzinger 2002). Badania na skorupiakach wykazują, że nanomateriały mają znaczący wpływ na ich układ odpornościowy oraz że różne typy nanocząstek wpływają na skorupiaki w sposób zależny od ich rodzaju i wielkości.

SZKARŁUPNIE

Szkarłupnie posiadają komórki żerne (fagocyty) oraz receptory TLRs (Smith i współaut. 2018). Spośród 5 gromad szkarłupni, jeżowce oraz strzykwy są najbardziej zaawansowane ewolucyjnie. Dominującymi komórkami immunokompetentnymi szkarłupni są fagocyty, które zlokalizowane są w płynach wewnętrznych organizmu (Barela Hudgell i współaut. 2022; Smith i współaut. 2018). Spełniają one wiele funkcji, m.in. są odpowiedzialne za fagocytozę, opsonizację, enkapsulację patogenów oraz produkcję związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. W reakcji obronnej uczestniczą również czynniki humoralne, np. lektyny, lizozymy, białka krzepnięcia, czy profenoloksydaza (proPO) (Smith i współaut. 2018). U jeżowców i rozgwiazd charakterystyczne są również amebocyty oraz komórki wibrujące. Amebocyty pełnią funkcje przeciwbakteryjne i cytotoksyczne (Andrade i współaut. 2021). Natomiast komórki wibrujące, które zgodnie z nazwą charakteryzuje duża ruchliwość, umożliwiają cyrkulację płynu,

w tym wymianę substancji odżywczych, gazów i produktów przemiany materii w organizmie, pomagają usuwać zanieczyszczenia z organizmu oraz odpowiadają za proces krzepnięcia dzięki obecności białek krzepnięcia w swoich ziarnistościach (Smith i współaut. 2018).

Szkarłupnie, w szczególności jeżowce, są szeroko wykorzystywane jako model do badań nad wpływem nanomateriałów na organizmy wodne (Fairbairn i współaut. 2011). Dotychczas najczęściej badanym gatunkiem jest jeżowiec skalny, *Paracentrotus lividus*, który powszechnie występuje w Morzu Śródziemnym i Oceanie Atlantycznym. Badania wykazały, że nanocząsteczki TiO₂ w organizmie *P. lividus* wpływają na sygnalizację wewnątrzkomórkową poprzez transdukcję sygnału p38 MAPK, nie wywołując jednocześnie odpowiedzi zapalnej ani innych szkodliwych efektów na funkcje biologiczne, co w efekcie może wpływać na reakcje przeciwzapalne (Pinsino i współaut. 2015). Badania *in vitro* na tych samych nanocząstkach wykazały w fagocytach obniżenie ekspresji genów związanych z sygnalizacją TLR, w tym jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF- κ B (z ang. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) i kinaz JNK (z ang. *c-Jun N-terminal kinases*) oraz wzrost aktywności antyoksydacyjnej (Alijagic i współaut. 2020). Natomiast badania z wykorzystaniem nanocząstek złota powlekanych stabilizatorem poliwinylpirolidonem (PVP-AuNPs) wykazały, że nanocząstki mogą krótkotrwale aktywować odpowiedź odpornościową poprzez szlak TLR4/p42/44 MAPK, po czym organizm przechodzi do stanu równowagi metabolicznej (Alijagic i współaut. 2021a). Stwierdzono, że przy ekspozycji na AuNPs część fagocytów pobiera nanocząstki, a niektóre komórki wykazują zwiększoną ekspresję markerów CD45 (z ang. *lymphocyte common antigen*) i CD14 (z ang. *cluster of differentiation 14*), sugerując stadium pośrednie dojrzewania i zaangażowanie w aktywację TLR (Alijagic i współaut. 2021b). Badania na szkarłupniach pokazują, że nanomateriały mogą wpływać na odpowiedź odpornościową poprzez aktywację fagocytozy i szlaków sygnalizacyjnych TLR, co prowadzi do odpowiedzi przeciwzapalnej oraz aktywacji procesów antyoksydacyjnych.

RYBY

Ryby są najstarszą grupą kręgowców, której układ odpornościowy działa na podobnych zasadach, jak układ odpornościowy wyższych kręgowców. Podobnie jak u ptaków i ssaków, u ryb występuje odporność wrodzona oraz odporność nabyta. Odporność wrodzona ryb stanowi główną linię obrony przed patogenami i jest kluczowa w walce z infekcjami. Opiera się na rozpoznawaniu PAMPs takich jak peptydoglikany, lipopolisacharydy czy dwuniciowe RNA wirusów, za pomocą receptorów PRR oraz rozpoznawaniu DAMPs, takich jak np. uszkodzone własne białka lub DNA (Elward i Gasque 2003; Fearon 1997).

Pierwszą linię obrony ryb stanowią bariery takie jak łuski, czy śluz pokrywający skórę i skrzel (Ellis 2001; Ingram 1980). Komórki odpornościowe odpowiedzi wrodzonej to głównie fagocyty, takie jak neutrofile, makrofagi i komórki cytotoksyczne (Frøystad i współaut. 1998). Natomiast wśród czynników humoralnych wyróżniamy enzymy lityczne, jak lizozym oraz elementy układu dopełniacza, jak np. białko C3 (Magnadóttir 2002). Białka dopełniacza, pełnią rolę opsonin i wspomagają fagocytozę patogenów, są także ważnym elementem aktywacji innych mechanizmów obronnych (Zarkadis 2001). Istnieją także receptory rozpoznające różne wzorce molekularne, np. TLRs, NLRs (z ang. *NOD-like receptors*), RLRs (z ang. *RIG-I-like receptors*), czy CLRs (z ang. *C-type lectin receptors*), które są zaangażowane w opsonizację, fagocytozę i aktywację układu dopełniacza (Arason 1996).

Nanomateriały znacząco wpływają na odporność wrodzoną ryb. Wiele badań na ten temat prowadzonych jest z użyciem modelowego gatunku danio pręgowanego (*Danio rerio*). Pokazano, że u danio nanomateriały stymulują lub hamują reakcję zapalną oraz indukują stres oksydacyjny (Jia i współaut. 2019). Nanocząstki srebra wywołują działanie prozapalne, co objawia się zwiększoną produkcją cytokin takich jak TNF- α (czynnik martwicy nowotworów, z ang. *tumor necrosis factor*) i IL-1 β (interleukina 1 beta, z ang. *interleukin 1 β*), które z kolei akty-

wują makrofagi i neutrofile. Prowadzi to do zapalnych uszkodzeń tkanek. Toksyczność Ag NPs jest uzależniona od ich wielkości i powierzchni – większe cząsteczki (np. około 40 nm) są bardziej toksyczne dla larw danio, gdyż powodują deformacje ciała oraz uszkodzenia tkanki sercowej, podczas gdy mniejsze (20 nm) łatwiej przenikają przez tkanki dorosłych ryb, powodując toksyczność w skrzelach i jelitach (Jia i współaut. 2019). Podobne właściwości wykazują nanocząstki tlenku miedzi (CuO NPs), które wywołują reakcje zapalne w skórze i jelitach danio pręgowanego. Ekspozycja na CuO NPs powoduje zmiany w transkrypcji genów związanych z procesami zapalnymi oraz zwiększoną migrację neutrofili w ogonie larw. Nanocząstki te indukują także stres oksydacyjny, co prowadzi do generowania ROS i apoptozy komórek (Brun i współaut. 2018; Jia i współaut. 2019; Naatz i współaut. 2017). Nanocząstki tlenku cynku (ZnO NPs) również silnie wpływają na układ odpornościowy danio pręgowanego. Indukują stres oksydacyjny, co powoduje uszkodzenia lizosomalne i mitochondrialne, a także generowanie ROS. ZnO NPs aktywują enzymy antyoksydacyjne, takie jak katalaza i peroksydaza glutationowa, jednocześnie hamując inne kluczowe enzymy, które są niezbędne do odpowiedzi odpornościowej. Rozpuszczalne jony cynku uwalniane z ZnO NPs dodatkowo pogłębiają te toksyczne efekty (Brun i współaut. 2018; Jia i współaut. 2019). W przypadku innych nanomateriałów metalicznych, takich jak nanocząsteczki tytanu (TiO₂ NPs) i ceru (CeO₂ NPs), także zaobserwowano wpływ na odporność wrodzoną. TiO₂ NPs wywoływały łagodną odpowiedź zapalną i stres oksydacyjny, które przy długotrwałej ekspozycji mogą prowadzić do toksyczności reprodukcyjnej. CeO₂ NPs natomiast wpływały na funkcjonowanie przewodu pokarmowego i wchodziły w interakcje z neurotransmiterami, co może zakłócać również procesy odpornościowe (Jia i współaut. 2019). Powyższe badania wykazują na silne oddziaływanie nanomateriałów na odporność wrodzoną ryb. Badania tego typu mogą być pomocne w projektowaniu bezpieczniejszych nanocząstek w celu późniejszego zastosowania ich w biomedycynie.

PODSUMOWANIE

Interakcje organizmów żywych z nanomaterialami są wielowymiarowym zjawiskiem o potencjalnie niejednoznacznych skutkach. Wynika to głównie ze zróżnicowanych właściwości fizykochemicznych nanocząstek oraz ich zróżnicowanego wpływu na systemy biologiczne. Nanocząstki mogą przynosić ogromne korzyści w wielu dziedzinach, takich jak ukierunkowane dostarczanie leków, zaawansowane techniki obrazowania, czy inżynieria tkankowa. Dzięki nim wprowadzając innowacyjne podejście w terapii farmakologicznej można znacząco zwiększyć skuteczność leczenia oraz diagnostyki. Niemniej jednak, obok tych zalet, nanocząstki niosą ze sobą również pewne zagrożenia dla zdrowia ludzi i dla środowiska naturalnego. Mogą powodować stres oksydacyjny, uszkodzenia DNA, stany zapalne, a nawet prowadzić do śmierci komórek. Co więcej, nanocząstki mogą gromadzić się w środowisku, negatywnie wpływając na jakość gleby i wody. Ze względu na niezwykle złożoność systemów biologicznych oraz ogromną różnorodność nanocząstek, przewidywanie ich skutków może być trudne. Ewolucja układu odpornościowego organizmów roślinnych i zwierząt pozwoliła na rozwinięcie wielorakich mechanizmów obronnych (Tab. 1), które mogą być wykorzystane w odpowiedzi na różne czynniki pojawiające się w środowisku w wyniku wprowadzania nowych technologii. Zrozumienie tych interakcji jest kluczowe dla przyszłych zastosowań nanomateriałów, przy jednoczesnym minimalizowaniu ryzyka ich toksyczności. Potrzebne są dalsze badania, aby w pełni zrozumieć te interakcje i ich długoterminowe skutki, co pozwoli na bezpieczne i efektywne wykorzystanie nanomateriałów w różnych dziedzinach nauki i techniki.

Niniejsza publikacja została zrealizowana ze środków Wydziału Biologii w ramach Programu Strategicznego Inicjatywa Doskonałości w Uniwersytecie Jagiellońskim, konkurs Research Support Module (WB.1.4.2024, projekt: U1U/W18/NO/28.74) oraz subwencji N18/DBS/000009.

BIBLIOGRAFIA

- Adamowicz A., 2005. *Morphology and ultrastructure of the earthworm Dendrobaena veneta (Lumbricidae) coelomocytes*. Tissue Cell 37(2): 125–133. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tice.2004.11.002>.
- Ali S., Mehmood A., Khan N., i współaut., 2021. *Uptake, translocation, and consequences of nanomaterials on plant growth and stress adaptation*. J Nanomater 6677616. Doi: <https://doi.org/10.1155/2021/6677616>.
- Alijagic A., Barbero F., Gaglio D., Napodano E., Benada O., i współaut., 2021a. *Gold nanoparticles coated with polyvinylpyrrolidone and sea urchin extracellular molecules induce transient immune activation*. J Hazard Mater 5;402: 123793. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123793>.
- Alijagic A., Bonura A., Barbero F., Puntos V.F., Gervasi F., i współaut., 2021b. *Immunomodulatory Function of Polyvinylpyrrolidone (PVP)-Functionalized Gold Nanoparticles in Vibrio-Stimulated Sea Urchin Immune Cells*. Nanomaterials (Basel) 8;11(10):2646. Doi: <https://doi.org/10.3390/nano11102646>.
- Alijagic A., Gaglio D., Napodano E., Russo R., Costa C., i współaut., 2020. *Titanium dioxide nanoparticles temporarily influence the sea urchin immunological state suppressing inflammatory-related gene transcription and boosting antioxidant metabolic activity*. J Hazard Mater 15;384: 121389. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121389>.
- Andrade C., Oliveira B., Guatelli S., Martinez P., Simões B., i współaut., 2021. *Characterization of Coelomic Fluid Cell Types in the Starfish Marthasterias glacialis Using a Flow Cytometry/Imaging Combined Approach*. Front Immunol. 12: 641664. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.641664>.
- Arason G.J., 1996. *Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates*. Fish Shellfish Immunol 6(4): 277–289. Doi: <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0029>.
- Arora S., Sharma P., Kumar S., Nayan R., Khanna P.K., i współaut., 2012. *Gold-nanoparticle induced enhancement in growth and seed yield of Brassica juncea*. Plant Growth Regul 66: 303–310. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10725-011-9649-z>.
- Auguste M., Balbi T., Miglioli A., Alberti S., Prandi S., i współaut., 2021a. *Comparison of different commercial nanopolystyrenes: behavior in exposure media, effects on immune function and early larval development in the model bivalve Mytilus galloprovincialis*. Nanomaterials 11: 3291. Doi: <https://doi.org/10.3390/nano11123291>.
- Auguste M., Mayall C., Barbero F., Hocevar M., Alberti S., i współaut., 2021b. *Functional and morphological changes induced in hemocytes by selected nanoparticles*. Nanomaterials 11: 470. Doi: <https://doi.org/10.3390/nano11020470>.
- Baranska A., Shawket A., Jouve M., Baratin M., Malosse C., i współaut., (2018). *Unveiling skin macrophage dynamics explains both tattoo persistence and strenuous removal*. J Exp Med 215: 1115–1133. Doi: <https://doi.org/10.1084/jem.20171608>.
- Barela Hudgell M.A., Grayfer L., Smith L.C., 2022. *A flow cytometry based approach to identify distinct coelomocyte subsets of the purple sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus*. Dev Comp Immunol 130: 104352. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104352>.
- Barmo C., Ciacci C., Canonico B., Fabbri R., Cortese K., i współaut., 2013. *In vivo effects of n-TiO2 on digestive gland and immune function of the marine bivalve Mytilus galloprovincialis*. Aquat Toxicol 132–133: 9–18. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.014>.
- Bayat N., Lopes V.R., Schölermann J., Jensen L.D., Cristobal S., 2015. *Vascular toxicity of ultra-small TiO2 nanoparticles and single walled carbon nanotubes in vitro and in vivo*. Biomaterials 63: 1–13. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.05.044>.
- Bayda S., Adeel M., Tuccinardi T., Cordani M., Rizzolio F., 2019. *The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine*. Molecules 27;25(1): 112. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>.

- Bhorgin A.J., Uma K., 2014. *Antimicrobial activity of earthworm powder (Lampito mauritii)*. Int J Curr Microbiol Appl Sci 3(1): 437–443.
- Bilej M., De Baetselier P., Beschin A., 2000. *Antimicrobial defense of the earthworm*. Folia Microbiol 45: 283–300. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF02817549>.
- Bodó K., Baranzini N., Girardello R., Kokhanyuk B., Németh P., i współaut., 2020. *Nanomaterials and Annelid Immunity: A Comparative Survey to Reveal the Common Stress and Defense Responses of Two Sentinel Species to Nanomaterials in the Environment*. Biology 9(10): 307. Doi: <https://doi.org/10.3390/biology9100307>.
- Boraschi D., Canesi L., Drobne D., Kemmerling B., Pinsino A., i współaut., 2023. *Interaction between nanomaterials and the innate immune system across evolution*. Biol Rev Camb Philos Soc 98(3): 747–774. Doi: <https://doi.org/10.1111/brv.12928>.
- Brennan J.J., Gilmore T.D., 2018. *Evolutionary origins of toll-like receptor signaling*. Mol Biol Evol 35: 1576–1587. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy050>.
- Brun N.R., Koch B.E., Varela M., Peijnenburg W.J., Spaink H.P., i współaut., 2018. *Nanoparticles induce dermal and intestinal innate immune system responses in zebrafish embryos*. Environ Sci: Nano 5(4): 904–916. Doi: <https://doi.org/10.1039/C8EN00002F>.
- Canesi L., Ciacci C., Fabbri R., Marcomini A., Pojana G. i współaut., 2012. *Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity*. Mar Environ Res 76: 16–21. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2011.06.005>.
- Canesi L., Corsi I., 2016. *Effects of nanomaterials on marine invertebrates*. Sci Total Environ 565: 933–940. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.085>.
- Canesi L., Gavioli M., Pruzzo C., Gallo G., 2002. *Bacteria-hemocyte interactions and phagocytosis in marine bivalves*. Microsc Res Tech 57: 469–476. Doi: <https://doi.org/10.1002/jemt.10100>.
- Chumakov K., Avidan M.S., Benn C.S., Bertozzi S.M., Blatt L., i współaut., 2021. *Old vaccines for new infections: exploiting innate immunity to control COVID-19 and prevent future pandemics*. Proc Natl Acad Sci USA 118: e2101718118. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.2101718118>.
- Cooper E.L., Kauschke E., Cossarizza A., 2001. *Annelid humoral immunity: cell lysis in earthworms*. Adv Exp Med Biol 484: 169–183. Doi: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1291-2_15.
- Cooper E.L., Roch P., 2003. *Earthworm immunity: a model of immune competence: The 7th international symposium on earthworm ecology. Cardiff. Wales. 2002*. Pedobiologia 47(5–6): 676–688. Doi: <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00245>.
- Diez-Ortiz M., Lahive E., Kille P., Powell K., Morgan A.J., i współaut., 2015. *Uptake routes and toxicokinetics of silver nanoparticles and silver ions in the earthworm Lumbricus rubellus*. Environ Toxicol Chem 34: 2263–2270. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.3036>.
- Dvořák J., Roubalová R., Procházková P., Rossmann P., Škanta F., i współaut., 2016. *Sensing microorganisms in the gut triggers the immune response in Eisenia andrei earthworms*. Dev Comp Immunol 57: 67–74. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.001>.
- Dyachuk V.A., 2016. *Hematopoiesis in Bivalvia larvae: cellular origin, differentiation of hemocytes, and neoplasia*. Dev Comp Immunol 65: 253–257. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.07.019>.
- Ellis A.E., 2001. *Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria*. Dev Comp Immunol 25(8–9): 827–39. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(01\)00038-6](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00038-6).
- Elward K., Gasque P., 2003. *“Eat me” and “don’t eat me” signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system*. Mol Immunol 40(2–4): 85–94. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0161-5890\(03\)00109-3](https://doi.org/10.1016/s0161-5890(03)00109-3).
- Fadeel B., Farcas L., Hardy B., Vasquez-Campos S., Hristozov D., i współaut., 2018. *Advanced tools for the safety assessment of nanomaterials*. Nat Nanotechnol 13: 537–543. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0185-0>.

- Fairbairn E.A., Keller A.A., Mädler L., Zhou D., Pokhrel S., i współaut., 2011. *Metal oxide nanomaterials in seawater: linking physicochemical characteristics with biological response in sea urchin development*. J Hazard Mater 192(3): 1565–71. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.06.080>.
- Fearon D.T., 1997. *Seeking wisdom in innate immunity*. Nature 24:388(6640): 323–4. Doi: <https://doi.org/10.1038/40967>.
- Ferrari E., 2022. *Risk assessment of gold nanoparticle in a stable Arabidopsis exposition system*. PhD Thesis: University of Tübingen, Tübingen, Germany.
- Ferrari E., Barbero F., Busquets-Fité M., Franz-Wachtel M., Köhler H.-R., i współaut., 2021. *Growth-promoting gold nanoparticles decrease stress responses in Arabidopsis seedlings*. Nanomaterials 11: 3161. Doi: <https://doi.org/10.3390/nano11123161>.
- Frøystad M.K., Rode M., Berg T., Gjøen T., 1998. *A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages*. Dev Comp Immunol 22(5–6): 533–49. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(98\)00032-9](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(98)00032-9).
- Garcia-Velasco N., Gandariasbeitia M., Irizar A., Soto M., 2016. *Uptake route and resulting toxicity of silver nanoparticles in Eisenia fetida earthworm exposed through standard OECD tests*. Ecotoxicology 25: 1543–1555. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1710-2>.
- Gautam A., Ray A., Mukherjee S., Das S., Pal K., i współaut., 2018. *Immunotoxicity of copper nanoparticle and copper sulfate in a common Indian earthworm*. Ecotoxicol Environ Saf 148: 620–631. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.008>.
- Ghosh S., 2018. *Environmental pollutants, pathogens and immune system in earthworms*. Environ Sci Pollut Res Int 25(7): 6196–6208. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-1167-8>.
- Griffith J.W., Sokol C.L., Luster A.D., 2014. *Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity*. Annu Rev Immunol 32: 659–702. Doi: <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120145>.
- Gust A.A., Pruitt R., Nürnberger T., 2017. *Sensing danger: key to activating plant immunity*. Trends Plant Sci 22: 779–791. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.07.005>.
- Hayashi Y., Engelmann P., Foldbjerg R., Szabó M., Somogyi I., i współaut., 2012. *Earthworms and humans in vitro: characterizing evolutionarily conserved stress and immune responses to silver nanoparticles*. Environ Sci Technol 46(7): 4166–4173. Doi: <https://doi.org/10.1021/es3000905>.
- Hayashi Y., Miclaus T., Engelmann P., Autrup H., Sutherland D.S., i współaut., 2016. *Nanosilver pathophysiology in earthworms: Transcriptional profiling of secretory proteins and the implication for the protein corona*. Nanotoxicology 10(3): 303–311. Doi: <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1054909>.
- Homa J., Klimek M., Kruk J., Cocquerelle C., Vandenbulcke F., i współaut., 2010. *Metal-specific effects on metallothionein gene induction and riboflavin content in coelomocytes of Allolobophora chlorotica*. Ecotoxicol Environ Saf 73(8): 1937–1943. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.07.001>.
- Ingram G.A., 1980. *Substances involved in the natural resistance of fish to infection—a review*. J Fish Biol 16(1): 23–60. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1980.tb03685.x>.
- Iwanaga S., Lee B.L., 2005. *Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals*. J Biochem Mol Biol 38(2): 128–150. Doi: <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2005.38.2.128>.
- Jia H.R., Zhu Y.X., Duan Q.Y., Chen Z., Wu F.G., 2019. *Nanomaterials meet zebrafish: Toxicity evaluation and drug delivery applications*. J Control Release 311–312: 301–318. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.08.022>.
- Jin X.K., Li W.W., Wu M.H., Guo X.N., Li S., i współaut., 2013. *Immunoglobulin superfamily protein Dscam exhibited molecular diversity by alternative splicing in hemocytes of crustacean, Eriocheir sinensis*.

- Fish Shellfish Immunol. 35(3): 900–9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.029>.
- Kauschke E., Mohrig W., Cooper E. L., 2007. *Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms*. Eur J Soil Biol 43: S110–S115. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.08.043>.
- Krug H.F., Wick P., 2011. *Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge*. Angew Chem Int Ed Engl 50: 1260–1278. Doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201001037>.
- Kumar V., Guleria P., Kumar V., Yadav S.K., 2013. *Gold nanoparticle exposure induces growth and yield enhancement in Arabidopsis thaliana*. Sci Total Environ 461–462: 462–468. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.05.018>.
- Kurek A., Homa J., Kauschke E., Plytycz B., 2007. *Characteristics of coelomocytes of the stubby earthworm, Allolobophora chlorotica (Sav.)*. Eur J Soil Biol 43: S121–S126. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2007.08.051>.
- Lapied E., Moudilou E., Exbrayat J.M., Oughton D.H., Joner, E.J., 2010. *Silver nanoparticle exposure causes apoptotic response in the earthworm Lumbricus terrestris (Oligochaeta)*. Nanomedicine 5: 975–984. Doi: <https://doi.org/10.2217/nnm.10.58>.
- Li X.J., Yang L., Li D., Zhu Y.T., Wang Q., i współaut., 2018. *Pathogen-Specific Binding Soluble Down Syndrome Cell Adhesion Molecule (Dscam) Regulates Phagocytosis via Membrane-Bound Dscam in Crab*. Front Immunol 9: 801. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00801>.
- Liu S., Zheng S.C., Li Y.L., Li J., Liu H.P., 2020. *Hemocyte-Mediated Phagocytosis in Crustaceans*. Front Immunol 11: 268. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00268>.
- Magnadóttir B., 2006. *Innate immunity of fish (overview)*. Fish Shellfish Immunol 20(2): 137–51. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>.
- Matejko S., Pocheć E., Homa J., 2016. *Dżdżownice jako źródło biologicznie aktywnych związków: właściwości przeciwnowotworowe białek dżdżownic*. Kosmos 65(1 (310)).
- Matzinger P., 2002. *The danger model: a renewed sense of self*. Science 296(5566): 301–5. Doi: <https://doi.org/10.1126/science.1071059>.
- Mayall C., Dolar A., Jemec Kokalj A., Novak S., Razinger J., i współaut., 2021. *Stressor-Dependant Changes in Immune Parameters in the Terrestrial Isopod Crustacean, Porcellio scaber: A Focus on Nanomaterials*. Nanomaterials (Basel) 11(4): 934. Doi: <https://doi.org/10.3390/nano11040934>.
- Murphy K.M., Weaver C., Berg L., 2022. *Janeway's Immunobiology, Tenth Edition*. W.W. Norton & Company, New York.
- Naatz H., Lin S., Li R., Jiang W., Ji Z., i współaut., 2017. *Safe-by-Design CuO Nanoparticles via Fe-Doping, Cu-O Bond Length Variation, and Biological Assessment in Cells and Zebrafish Embryos*. ACS Nano. 11(1): 501–515. Doi: <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b06495>.
- Ngou B.P.M., Ding P., Jones J.D.G., 2022. *Thirty years of resistance: zig-zag through the plant immune system*. Plant Cell 34: 1447–1478. Doi: <https://doi.org/10.1093/plcell/koac041>.
- Oberdörster G., Oberdörster E. & Oberdörster J., 2005. *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect 113: 823–839. Doi: <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>.
- Pacheco I., Buzea C., 2018. *Nanoparticle uptake by plants: beneficial or detrimental?*. Phytotoxicity of nanoparticles 1–61. Doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-76708-6_1.
- Pacheco N.I.N., Roubalova R., Dvorak J., Benada O., Pinkas D., i współaut., 2021. *Understanding the toxicity mechanism of CuO nanoparticles: the intracellular view of exposed earthworm cells*. Environ Sci: Nano 8(9): 2464–2477. Doi: <https://doi.org/10.1039/D1EN00080B>.
- Pinsino A., Russo R., Bonaventura R., Brunelli A., Marcomini A., i współaut., 2015. *Titanium dioxide nanoparticles stimulate sea urchin immune cell phagocytic activity involving TLR/p38 MAPK-mediated signal-*

- ling pathway*. Sci Rep 28;5: 14492. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep14492>.
- Plytycz B., Homa J., Koziol B., Rózanowska M., Morgan A.J., 2006. *Riboflavin content in auto-fluorescent earthworm coelomocytes is species-specific*. Folia Histochem Cytobiol 44(4): 275–280.
- Roubalová R., Procházková P., Dvořák J., Škanta F., Bilej M., 2015. *The role of earthworm defense mechanisms in ecotoxicity studies*. Invertebrate Survival Journal 12(1): 203–213.
- Sabo-Attwood T., Unrine J.M., Stone J.W., Murphy C.J., Ghoshroy S., i współaut., 2012. *Uptake, distribution and toxicity of gold nanoparticles in tobacco (Nicotiana xanthi) seedlings*. Nanotoxicology 6(4): 353–60. Doi: <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.579631>.
- Saleeb N., Robinson B., Cavanagh J., Ross J., Munir K., i współaut., 2020. *Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in Aporrectodea caliginosa earthworms exposed to silver nanoparticles and silver nitrate in spiked soil*. Environ Toxicol Chem 39: 1257–1266. Doi: <https://doi.org/10.1002/etc.4713>.
- Schwab F., Zhai G., Kern M., Turner A., Schnoor J.L., i współaut., 2016. *Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants – critical review*. Nanotoxicology 10: 257–278. Doi: <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1048326>.
- Semerad J., Pacheco N.I.N., Grasserova A., Prochazkova P., Pivokonsky M., i współaut., 2020. *In vitro study of the toxicity mechanisms of nanoscale zero-valent iron (nZVI) and released iron ions using earthworm cells*. Nanomaterials 10: 2189. Doi: <https://doi.org/10.3390/nano10112189>.
- Sendra M., Carrasco-Braganza M.I., Yeste P.M., Vila M., Blasco J., 2020. *Immunotoxicity of polystyrene nanoplastics in different hemocyte subpopulations of Mytilus galloprovincialis*. Sci Rep 10: 8637. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65596-8>.
- Shi W., Han Y., Guo C., Zhao X., Liu S., i współaut., 2017. *Immunotoxicity of nanoparticle nTiO(2) to a commercial marine bivalve species, Tegillarca granosa*. Fish Shellfish Immunol 6: 300–306. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.05.036>.
- Siddiqi K.S., Husen A., 2016. *Engineered gold nanoparticles and plant adaptation potential*. Nanoscale Res Lett 11: 400. Doi: <https://doi.org/10.1186/s11671-016-1607-2>.
- Smith L.C., Arizza V., Barela Hudgell M.A., Barone G., Bodnar A.G., i współaut., 2018. *Echinodermata: the complex immune system in echinoderms*. In *Advances in Comparative Immunology* (ed. E. L. COOPER), pp. 409–501. Springer, Cham, Switzerland.
- van der Ploeg M.J., van den Berg J.H., Bhattacharjee S., de Haan L.H., Ershov D.S., i współaut., 2014. *In vitro nanoparticle toxicity to rat alveolar cells and coelomocytes from the earthworm Lumbricus rubellus*. Nanotoxicology 8: 28–37. Doi: <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.744857>.
- Zarkadis I.K., Mastellos D., Lambris J. D., 2001. *Phylogenetic aspects of the complement system*. Dev Comp Immunol 25(8–9): 745–62. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0145-305x\(01\)00034-9](https://doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00034-9).
- Zhou J.-M., Zhang Y., 2020. *Plant immunity: danger perception and signaling*. Cell 181: 978–989. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.04.028>.