

Uniwersytet Śląski w Katowicach

Wydział Nauk Przyrodniczych

Instytut Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska

KINGA SURMIAK– STALMACH

Rozprawa doktorska

**Ocena parametrów komórkowych wybranych narządów
oraz fizykochemicznych właściwości przędzy łownej
samic pająka *Steatoda grossa* (Theridiidae) w aspekcie
krótko– i długoterminowej ekspozycji na nanocząstki srebra**

Promotor:

dr hab. Grażyna Wilczek, prof. UŚ

Katowice, 2024

Serdeczne podziękowania składam:

Promotorowi – Pani dr hab. Grażynie Wilczek, prof. UŚ, za pomoc na każdym etapie przygotowania pracy, cenne rady i wskazówki, cierpliwość, poświęcony czas, a także za wsparcie i wyrozumiałość.

Dr hab. Agnieszce Babczyńskiej, za pomoc udzieloną podczas przeprowadzanych badań, poświęcony czas, życzliwość oraz cenne wskazówki.

Dr hab. Joannie Homie, za możliwość realizacji badań z zakresu analiz cytometrycznych oraz poświęcony czas.

Prof. dr hab. Magdalenie Rost-Roszkowskiej, za możliwość realizacji badań z zakresu transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz pomoc merytoryczną.

Dr hab. Mieczysławowi Sajewiczowi, za możliwość realizacji badań z zakresu chromatografii cienkowarstwowej, poświęcony czas i cenne uwagi.

Dr Izabeli Potockiej, za cenne wskazówki, pomoc udzieloną podczas prowadzonych badań, poświęcony czas, życzliwość i merytoryczne rady oraz możliwość realizacji badań z zakresu skaningowej mikroskopii elektronowej.

Mojemu mężowi Łukaszowi i synowi Erykowi, za okazanie mi największego wsparcia i zrozumienia, wyrozumiałość oraz duże pokłady cierpliwości podczas każdego etapu przygotowywania pracy.

Rodzicom i rodzeństwu, za nieocenione wsparcie na każdym kroku, wiarę oraz zrozumienie.

Koleżankom i Kolegom z Zespołu Fizjologii Zwierząt i Ekotoksykologii, za życzliwość i okazaną pomoc.

STRESZCZENIE

W dobie intensywnego rozwoju nauki i możliwości wykorzystania nowoczesnych technologii ponownie wzrosło zainteresowanie antybakteryjnymi własnościami srebra w formie nanometrycznej. Ze względu na swoje cechy nanosrebro znajduje obecnie szerokie zastosowanie w wielu produktach codziennego użytku. Powszechna obecność produktów zawierających nanocząstki srebra sprawia, że obawy odnośnie ich stosowania stają się coraz większe. Już dziś wiadomo, że nanocząstki wywierają szkodliwy wpływ na organizmy i przyczyniają się do powstawania poważnych uszkodzeń w strukturach komórkowych. Zaburzenia homeostazy prowadzące do upośledzenia procesów fizjologicznych mogą nieść za sobą konsekwencje nie tylko dla konkretnego gatunku, który jest narażony na określony czynnik, lecz także dla wielu innych gatunków powiązanych zależnościami w sieciach troficznych.

Pająki uważane są za ważne regulatory liczebności wielu populacji owadów w ekosystemach łąkowych, leśnych i rolniczych. Jednocześnie należą do bezkręgowców o najwyższych notowanych stężeniach metali. Dotychczasowe analizy zawartości metali w ich tkankach odnosiły się wyłącznie do form cząsteczkowych związków metali. Brak jest danych na temat kumulacji i komórkowych efektów nanocząstek metali (w tym nanosrebra) u tych drapieżnych bezkręgowców. Celem niniejszej pracy było sprawdzenie, czy i do jakiego stopnia srebro w postaci AgNO_3 oraz w dwóch różnych formach nanometrycznych (PVP–AgNPs – nanosrebro w osnowie poliwinylpirolidonu i AgNPs – nanosrebro koloidalne ultraczyste jonowe), podawane pająkom *Steatoda grossa* (Theridiidae) w stężeniach subletalnych, w uproszczonym modelu łańcucha pokarmowego (pożywka suplementowana różnymi formami srebra → muchy *Drosophila hydei* → pająk), mogą powodować efekty cytotoksyczne w wybranych narządach lub tkankach (gruczoły przedne, gruczoły jelita środkowego, hemolimfa) oraz modyfikować wybrane właściwości fizykochemiczne przędzy łownej. Prowadzenie badań w aspekcie krótko- i długoterminowej intoksykacji pozwoliło, także porównać stopień zmian degeneracyjnych w wymienionych narządach.

Badane parametry oraz metody i techniki ich analiz zebrano w poniższej tabeli:

Parametr	Metoda / technika
Stężenie srebra w ciałach pajaków i ich ofiar	Absorpcyjna spektrometria atomowa (AAS)
Parametry stresu oksydacyjnego	Spektrofotometria, cytometria przepływowa
Ilościowa ocena komórek apoptotycznych, nekrotycznych i autofagicznych	Cytometria przepływowa

Ilościowa ocena komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami	Cytometria przepływowa
Stosunek ADP/ATP i stężenie ATP	Luminometria
Ilościowa ocena białek metalotioneinopodobnych (MTs)	Test immunoenzymatyczny (ELISA)
Ocena ultrastruktury tkanek	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)
Ilościowa i jakościowa ocena składu aminokwasów w przędzy łownej	Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (TLC) z densytometrią
Ocena architektury sieci	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)
Analiza składu pierwiastkowego sieci łownych	Analiza rentgenowska z dyspersją energii (EDX)
Ocena kaloryczności sieci łownych	Kalorymetria z mikrobombą tlenową typu MBC-3

Ekspozycja samic *S. grossa* na karmę suplementowaną wybranymi formami srebra skutkowała bioakumulacją tego metalu w ich ciałach, bowiem stężenie metalu zwiększało się wraz z wydłużeniem czasu intoksykacji. Pająki karmione ofiarami zanieczyszczonymi nanocząstkami srebra przez okres 12 miesięcy cechowały się niższym stężeniem tego pierwiastka w ciele, niż w przypadku zastosowania AgNO_3 . Ponadto suplementacja diety związkami srebra powodowała uruchomienie reakcji antyoksydacyjnych, nasilenie produkcji białek metalotioneinopodobnych oraz wystąpienie zmian apoptotycznych, nekrotycznych i autofagicznych w badanych narządach. Zmianom tym towarzyszyło zmniejszenie poziomu potencjału mitochondrialnego i stężenia ATP oraz wzrost wielkości wskaźnika ADP/ATP. Rezultaty tych badań wskazały, na silniejsze prooksydacyjne działanie zanieczyszczeń w postaci AgNO_3 , niż zastosowanych form nanocząstek srebra. Największe zmiany w poziomie wymienionych parametrów odnotowano w komórkach gruczołu jelita środkowego, co może potwierdzać jego znaczącą rolę jako filtra ksenobiotyków i miejsca procesów detoksykacyjnych, którym poddawane są związki dostające się do organizmu drogą pokarmową. Potwierdzono również zmniejszenie średnicy włókien jedwabiu i kaloryczności sieci w warunkach ekspozycji na związki srebra. Jednak stopień tych zmian w badanych grupach był porównywalny niezależnie od zastosowanej formy srebra. Może to wskazywać na alokację energii na kosztowne energetycznie reakcje detoksykacyjne, w celu przeciwdziałania toksyczności srebra w pokarmie.

Słowa kluczowe: *Steatoda grossa*, pająki, nanosrebro, parametry antyoksydacyjne, apoptoza, nekroza, autofagia, hemolimfa, gruczoł jelita środkowego, ampułkowate gruczoły przedne, jedwab pajęczy

ABSTRACT

In the era of intensive scientific development and the possibility of using modern technologies, increased interest in the antibacterial properties of nano-sized silver can be observed. With its specific properties, nano-sized silver is widely used in a number of everyday products. The widespread presence of products containing silver nanoparticles increases concerns about their use. Today, nanoparticles are known to have a harmful effect on organisms and to contribute to serious damage to cellular structures. Disturbances in homeostasis leading to impairment of physiological processes may have consequences not only for a specific species exposed to a specific agent, but also for many other species interlinked through trophic interactions.

Spiders are considered important regulators of the size of many insect populations in meadow, forest and agricultural ecosystems. At the same time, they are among the invertebrates with the highest recorded concentrations of metals. To date, analyses of metal content in their tissues have referred to the molecular forms of metal compounds only. There is no data on the accumulation and cellular effects of metal nanoparticles (including nanosilver) in these predatory invertebrates. This project is primarily intended to verify whether and to what extent silver with the chemical formula AgNO_3 and in two different nano-sized forms (PVP-AgNPs; nanosilver in groundwork polyvinylpyrrolidone and AgNPs; non-ionic colloidal silver) administered to *Steatoda grossa* (Theridiidae) spiders in a simplified food chain model (medium supplemented with various forms of silver \rightarrow *Drosophila hydei* flies \rightarrow spider) can cause cytotoxic effects in selected organs and tissues (the ampullate silk glands, midgut glands, haemolymph) and modify certain physicochemical properties of the hunting web. The research on the aspect of short- and long-term intoxication will also make it possible to assess the extent of degenerative and metabolic changes in the organ.

The tested parameters as well as the methods and techniques of their analysis are summarized in the table below:

Parameter	Method / technique
Silver concentration in the bodies of spiders and their victims	Atomic absorption spectrometry (AAS)
Oxidative stress parameters	Spectrophotometry, Flow cytometric analysis
Quantitative assessment of apoptotic cells, necrotic cells and autophagic cells	Flow cytometric analysis
Quantitative assessment of cells with depolarized mitochondria	Flow cytometric analysis
ADP/ATP ratio and ATP concentration	Luminometric methods

Quantification of metallothioneins (MTs)	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Assessment of tissue ultrastructure	Transmission electron microscopy (TEM)
Quantitative and qualitative assessment of amino acid composition in spider silk	Thin layer chromatography (TLC) with densitometry
Spider web architecture assessment	Scanning electron microscopy (SEM)
Analysis of the elemental composition of spider webs	Energy Dispersive X-Ray Analysis (EDX)
Assessment of the calorific value of spider webs	Oxygen micro-bomb calorimetry MBC-3

Exposure of *S. grossa* females to food supplemented with selected forms of silver resulted in the bioaccumulation of this metal in their bodies, as the concentration of the metal increased along with the extension of the intoxication time. Contamination of prey with silver nanoparticles resulted in a lower concentration of this element in the spiders' bodies after long-term exposure than when AgNO₃ was used. Moreover, dietary supplementation with silver compounds resulted in the activation of antioxidant reactions, intensified production of metallothionein-like proteins and the occurrence of apoptotic, necrotic and autophagic changes in the analysed organs. These changes were concurrent to a decrease in the level of mitochondrial potential and ATP concentration, and an increase of the ADP/ATP ratio. However, the results indicated a stronger pro-oxidant effect of AgNO₃ impurities than of the silver nanoparticle forms used. The greatest changes in the levels of the above parameters were recorded in the cells of the midgut gland, which may confirm its significant role as a filter of xenobiotics and a place of detoxification processes to which compounds entering the body through the digestive system are subjected. A reduction in the diameter of silk fibres and the calorific value of the spider webs in conditions of exposure to silver compounds was also confirmed. However, the extent of these changes in the analysed groups was comparable regardless of the form of silver used. This may indicate that energy is allocated to energy-intensive detoxification reactions to counteract the toxicity of dietary silver.

Keywords: *Steatoda grossa*, spiders, nanosilver, antioxidant parameters, apoptosis, necrosis, autophagy, haemolymph, midgut gland, ampullate silk glands, spider silk

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW	10
1. WSTĘP	11
1.1. Srebro jonowe a nanocząstki srebra – zastosowanie i toksyczność	11
1.2. Zastosowania nanocząstek srebra w medycynie i życiu codziennym	13
1.3. Drogi narażenia i biodystrybucja nanocząstek srebra	16
1.4. Toksyczność nanocząstek srebra	19
1.4.1. Toksyczność względem mikroorganizmów	20
1.4.2. Toksyczność względem ssaków	22
1.4.3. Toksyczność względem bezkręgowców	24
1.5. Mechanizmy toksyczności nanocząstek srebra	26
1.5.1. Parametry fizykochemiczne wpływające na toksyczność nanocząstek srebra 29	
1.5.1.1. Wielkość i typ pokrycia	29
1.5.1.2. Uwalnianie jonów Ag^+ z powierzchni	30
1.6. Pająki w badaniach ekotoksykologicznych	31
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	34
3.1. Charakterystyka gatunku	36
3.2. Warunki hodowli	39
3.3. Charakterystyka grup doświadczalnych	40
3.4. Analizy wybranych parametrów komórkowych, fizykochemicznych właściwości przędzy lownej oraz poziomu metalu w ciele badanego gatunku pająka	43
3.4.1. Pomiar stężenia srebra w ciałach pajaków oraz ich ofiar	43
3.4.2. Parametry stresu oksydacyjnego	44
3.4.2.1. Katalaza (CAT; EC 1.11.1.6)	44
3.4.2.2. Pomiar całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC)	44
3.4.3. Ocena żywotności komórek w wybranych narządach	45
3.4.3.1. Pomiar poziomu komórek apoptotycznych i nekrotycznych	45
3.4.3.2. Ilościowa ocena komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami	47
3.4.3.3. Autofagia	47
3.4.3.4. Stres oksydacyjny	48
3.4.3.5. ATP, ATP/ADP	49
3.4.4. Ilościowa ocena metalotionein metodą immunoenzymatyczną ELISA	50
3.4.5. Pomiar całkowitego stężenia białka	51
3.4.6. Mikroskopowa ocena ultrastruktury komórek w wybranych narządach ...	52

3.4.7.	Ilościowa i jakościowa ocena składu aminokwasów w przędzy łownej metodą chromatografii cienkiej warstwy (TLC) z densytometrią.....	52
3.4.8.	Ocena architektury sieci metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM) 53	
3.4.9.	Kalorymetria	54
3.4.10.	Analizy statystyczne i prezentacja graficzna wyników.....	55
4.	WYNIKI.....	56
4.1.	Stężenie srebra w ciałach pająków <i>Steatoda grossa</i> oraz ich ofiar.....	56
4.2.	Poziom wybranych parametrów antyoksydacyjnych w analizowanych tkankach pająka <i>S. grossa</i>	57
4.2.1.	Katalaza [CAT; EC 1.11.1.6].....	57
4.2.2.	Całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC)	60
4.3.	Ilościowa ocena żywotności komórek w wybranych narządach	63
4.3.1.	Hemolimfa.....	63
4.3.2.	Gruzoł jelita środkowego	66
4.3.3.	Gruzoł przędnny	69
4.3.4.	Ilościowa ocena poziomu potencjału mitochondrialnego	72
4.3.5.	Ilościowa ocena intensywności autofagii	75
4.3.6.	Ilościowa ocena poziomu stresu oksydacyjnego	78
4.3.7.	Ocena stężenie ATP.....	81
4.3.8.	Ocena stosunku ADP/ATP	84
4.4.	Ilościowa ocena białek metalotioneinopodobnych (MTs).....	87
4.5.	Ocena ultrastruktury komórek w wybranych tkankach.....	90
4.6.	Ilościowa i jakościowa ocena składu aminokwasów w przędzy łownej	95
4.7.	Ocena architektury sieci	98
4.8.	Ocena kaloryczności sieci łownych	106
5.	DYSKUSJA.....	108
5.1.	Stężenie srebra w ciałach pająków	109
5.2.	Wpływ AgNPs na parametry antyoksydacyjne i efekt cytotoksyczny	111
5.3.	Ocena ultrastruktury hemolimfy i gruczolów przędnych	121
5.4.	Wpływ AgNO ₃ i nanosrebra na parametry fizykochemiczne sieci łownych pająka <i>S. grossa</i>	122
6.	WNIOSKI	127
7.	BIBLIOGRAFIA.....	129
8.	ANEKS – STATYSTYKI OPISOWE	151

WYKAZ SKRÓTÓW

AAS	absorpcyjna spektrometria atomowa
ABTS	2,2-azytnobis(3etylobenzotiazolini-6-sulfonian)
ABTS⁺	rodnik 2,2-azytnobis(3etylobenzotiazolini-6-sulfonianu)
ADP	adenozyno-5'-difosforan
AgNPs	nanocząstki srebra
ATP	adenozyno-5'-trifosforan
CAT	Katalaza
EDX	analiza rentgenowska z dyspersją energii
GPOx	peroksydaza glutationowa selenozależna
GR	reduktaza glutationowa
GSH	glutationu zredukowany
GST	transferaza glutationowa
GSTPx	peroksydaza glutationowa selenoniezależna
MTs	Metalotioneiny
PBS	zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
ROS	reaktywne formy tlenu
SEM	skaningowa mikroskopia elektronowa
SOD	dysmutaza nadadtlenkowa
TAC	całkowita pojemność antyoksydacyjna
TEM	transmisyjna mikroskopia elektronowa
TLC	cienkowarstwowa chromatografia cieczowa

1. WSTĘP

1.1. Srebro jonowe a nanocząstki srebra – zastosowanie i toksyczność

Srebro (Ag, łac. *argentum*) jest pierwiastkiem chemicznym z grupy metali przejściowych w układzie okresowym. Charakteryzuje się srebrzystobiałym kolorem oraz największą przewodnością elektryczną i termiczną (Bielański, 2012). W przyrodzie występuje w stanie wolnym, a także w minerałach, takich jak argentyt czy chlorargyryt. Większość wydobywanego srebra występuje jako domieszka rud miedzi, złota, ołowiu i cynku (Christie i Brathwaite, 1996).

Stosowanie srebra przez człowieka datowane jest jeszcze przed rewolucją neolityczną. Starożytni Grecy wykorzystywali srebrne naczynia do przechowywania wody i żywności, aby przedłużyć czas ich przydatności do spożycia. Srebro było również stosowane do zaopatrywania ran i owrzodzeń (Bugła-Płoskońska i Oleszkiewicz, 2007; Łysakowska i Denys, 2009; Fries i in., 2010; Guo i in., 2013). Do czasu narodzin nanotechnologii, czerpano korzyści tylko z jego podstawowej formy. Po otrzymaniu srebra w skali nano okazało się, iż jego właściwości można wykorzystać w wielu dziedzinach, przez co stało się jednym z najbardziej zyskownych nanomateriałów (Vaidyanathan i in., 2009).

Nanosrebro najczęściej występuje w postaci zawiesiny składającej się z cząstek wielkości < 100 nm (Khan i in., 2010). Z naukowego punktu widzenia, posiada ono szereg zalet, takich jak: stabilność chemiczna, przewodność termiczna, aktywność katalityczna i antybakteryjna. Dzięki swoim specyficznym właściwościom jest wykorzystywane w wielu technologiach i różnych gałęziach przemysłu. Szerokie zastosowanie znalazło w wielu produktach codziennego użytku – na przykład w kosmetykach, detergentach, sprayach, ubraniach i opakowaniach do przechowywania żywności. Pokrycie produktów nanosrebrem w znaczący sposób podnosi ich skuteczność oraz podwyższa jakość. Jego zastosowanie sięga coraz dalej do innych dóbr konsumenckich, włączając plastry opatrunkowe, szczoteczki do zębów i produkty tak różnorodne jak skarpetki sportowe, lodówki, materiały przewodzące czy ogniwa fotowoltaiczne (Benn i in., 2010; Fries i in., 2010; Guo i in., 2012; Foltynowicz i in., 2013; Schluesener i Schluesener, 2013).

Zagrożeniem dla środowiska naturalnego najczęściej stają się nanocząstki projektowane. Biorąc pod uwagę ich obieg, stwierdza się, że przenikają one do systemów naturalnych, takich jak powietrze, woda oraz gleby przez ścieki przemysłowe i komunalne oraz w postaci substancji dodawanych do środków ochrony roślin.

Potencjalnym zagrożeniem dla środowiska jest bioakumulacja nanocząstek w tych systemach. Ważną kwestią w ocenie toksyczności nanostruktur projektowanych jest nie tylko określenie czy i w jakim stopniu ulegają one degradacji w środowisku, lecz także wykazanie komórkowych efektów ich działania (Baun i in., 2009; Bystrzejewska–Piotrowska i in., 2009; Brar i in., 2010).

Nanostruktury srebra wykazują się dużą aktywnością biobójczą. Przenikając do środowiska naturalnego, stanowią poważny problem w prawidłowym funkcjonowaniu ekosystemów, w szczególności mikroorganizmów występujących w glebie. Nanosrebro eliminując podatne na jego działanie gatunki obniża ich bioróżnorodność. Pierwiastek ten może stanowić zagrożenie dla drobnoustrojów stosowanych w procesach bioremediacji gruntów i biodegradacji zanieczyszczeń. Ponadto nanocząstki srebra zagrażają bakteriom z rodzaju *Bradyrhizobium*, które to odpowiedzialne są za wiązanie azotu, co może prowadzić do zaburzenia cyklu obiegu pierwiastków w przyrodzie (Kumar i in., 2011).

Nanocząstki przedostają się do środowiska naturalnego ze źródeł powierzchniowych lub punktowych. Źródła punktowe to oczyszczalnie ścieków, spalarnie i składowiska odpadów oraz miejsca produkcji nanostruktur. Natomiast powierzchniowe źródła są związane z uwalnianiem nanocząstek poprzez użytkowanie produktów, które je zawierają (Farkas i in., 2011; Walser i in., 2011; Vlachogianni i Valavanidis 2014; Mrowiec i Kosut, 2015).

Pierwotnie nanocząstki srebra uważane były za nietoksyczne dla komórek zwierząt. Ich przedawkowanie wiązało się głównie ze zmianą pigmentacji skóry, zwaną argyrią (srebrzyca). Niemniej jednak ostatnie badania coraz częściej ukazują toksyczne działanie nanosrebra, zwłaszcza wobec ssaków. W wielu badaniach wykazano, że nanocząstki srebra mogą przechodzić do organizmu drogą pokarmową oraz inhalacyjną. Natomiast badania nad przedostawaniem się tego metalu drogą dermalną nie są jednoznaczne. Wraz z wdychanym powietrzem, nanosrebro dociera do płuc, skąd jest wchłaniane do krwioobiegu. W ten sposób dostaje się ono do narządów wewnętrznych. Drogą pokarmową nanocząstki przedostają się do jelit, a następnie są wchłaniane do krwi i dalej do innych organów, podobnie jak ma to miejsce przy inhalacji (Świdwińska–Gajewska i Czerczak, 2014).

W ostatnich latach opublikowane zostały liczne prace badawcze, które miały na celu ocenę wpływu srebra w postaci nanocząstek na różne linie komórek ssaczych – ocenie poddawany był efekt cytotoksyczny oraz genotoksyczny (Shin i in., 2007; Kim i in., 2010; Prabhu i Poulouse, 2012). Badania w warunkach *in vitro* wykazały, że srebro

w formie nanocząstek, przybiera tak mały rozmiar, że może przenikać błonę komórek i przyczyniać się do zaburzeń w ich funkcjonowaniu i metabolizmie (Zhu i in., 2015). Verano-Braga i in. (2014) w eksperymencie prowadzonym na ludzkich komórkach nerkowych wykazali, że nanosrebro prowadzi do formowania się szkodliwych wolnych rodników w komórkach oraz przyczynia się do pojawiania zmian jakościowych i ilościowych w produkcji białek, co może w konsekwencji być przyczyną poważnych schorzeń i chorób. Jednakże, mało jest prac dotyczących oddziaływania nanosrebra na organizmy żywe przy różnych poziomach i czasach ekspozycji tego typu ksenobiotyków (Zhu i in., 2015). Większość doświadczeń, w których badano toksyczność nanosrebra, prowadzona była w warunkach *in vitro*. Jak dotąd eksperymenty wykonywano na komórkach ryb, glonów, skorupiaków, pierwotniaków i nicieni oraz na liniach komórkowych pochodzących od ssaków (Zhu i in., 2008; Zhu i in., 2009; Zook i in., 2012; Bondarenko i in., 2013; Magesky i Pelletier, 2018). Badania w warunkach *in vivo* przeprowadzono na kawii, myszach, szczurach, królikach, rybach oraz na świni domowej (Ahamed i in., 2008; Sung i in., 2008; Korani i in., 2011; Likus i in., 2013, Wang i in., 2019). W doświadczeniach, w których nanocząstki srebra dostawały się do organizmu poprzez inhalację wykazano, że mają one toksyczny wpływ głównie na wątrobę i płuca, gdzie powodowały procesy zapalne i zmiany histopatologiczne. U zwierząt narażanych drogą pokarmową, obserwowano zmiany histopatologiczne jelit, wzrost aktywności enzymów oraz procesy zapalne w wątrobie i jelitach. Nanocząstki docierając do mózgu wywoływały efekty neurotoksyczne między innymi powodując zaburzenia pamięci krótkotrwałej oraz osłabienie procesów obrazujących funkcje poznawcze. Ponadto Park i in. (2010a) wykazali genotoksyczne działanie nanocząstek srebra. W warunkach *in vitro* wykorzystując test kometowy i mikrojądrowy uzyskano wyniki, które świadczyły o uszkodzeniu DNA komórek (Park i in., 2011). Istnieją również niepokojące dane, które przedstawiają szkodliwy wpływ nanosrebra na rozrodczość. Badając gryzonia odnotowano, że nanosrebro wpływa między innymi na opóźnienie pokwitania, obniżenie poziomu hormonów płciowych, a także pogorszenie jakości nasienia (Świdwińska–Gajewska i Czerczak, 2014).

1.2. Zastosowania nanocząstek srebra w medycynie i życiu codziennym

W ostatnich dwóch dekadach stale rośnie zainteresowanie nanosrebrem ze względu na jego silne właściwości przeciwdrobnoustrojowe. Przyczynił się do tego przede wszystkim szybki rozwój nanotechnologii wytwarzających znaczne ilości

różnorodnych form nanosrebra oraz postępująca wśród bakterii antybiotykooporność (Santos i in., 2014).

Obecnie prowadzone są intensywne badania nad skutecznością różnych typów nanocząstek srebra (AgNPs) w leczeniu zakażeń konkretnymi szczepami bakterii. Takie parametry jak wielkość (Morones i in., 2005; Lok i in., 2007; Ivask i in., 2014) i typ pokrycia nanocząstek (Santos i in., 2014) mogą mieć bowiem kluczowe znaczenie dla ich właściwości. Wskazuje się również możliwość zastosowania AgNPs w przypadku zakażeń grzybiczych (Gajbhiye i in., 2009; Ge i in., 2014) i wirusowych (Galdiero i in., 2011).

Nanocząstki srebra są stosowane w wielu produktach codziennego użytku, takich jak kosmetyki, sprzęt AGD, pojemniki na żywność, produkty medyczne, nanofunkcjonalne tworzywa sztuczne, farby i tekstylia. Dzięki skutecznym właściwościom przeciwko bakteriom, grzybom i wirusom AgNPs znalazły swoje zastosowania w trzech głównych sektorach: biomedycynie, produkcji opakowań spożywczych i przemyśle tekstylnym (Nowack i in., 2011). Silne działanie przeciwdrobnoustrojowe nanomateriałów na bazie Ag, nawet przeciwko drobnoustrojom wielolekoopornym (Peng i in., 2020), doprowadziło do ich zastosowań w sektorze opieki zdrowotnej, takich jak implanty i sprzęt medyczny (Lackner i in., 2008), opatrunki na rany (Nadworny i in., 2008), leki przeciwnowotworowe (Venugopal i in., 2017) oraz systemy dostarczania leków przeciwnowotworowych (Benyettou i in., 2015). Jony Ag uwalniane przez AgNPs odgrywają istotną rolę w działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Po uwolnieniu jonów Ag^+ przez AgNPs, aktywność przeciwdrobnoustrojową inicjują kationy metali, a nie nanocząstki metali (Choi i in., 2018). Ponadto AgNPs mogą być używane jako pasywne (Patra i in., 2015; Barbinta-Patrasu i in., 2016) lub aktywne (Ding i in., 2017; Poudel i in., 2018) nanonośniki leków przeciwnowotworowych.

Wiele produktów do pakowania żywności zawierających AgNPs jest łatwo dostępnych na całym świecie (Bumbudsanpharoke i Ko, 2015). Nanosrebro jest wykorzystywane w termoplastycznych materiałach do produkcji opakowań, takich jak polietylen (PE), polipropylen (PP), polistyren (PS) i nylon (Youssef i Abdel-Aziz, 2013; Carbone i in., 2016). Antybakteryjne powłoki na bazie nanosrebra mogą przedłużyć żywotność styropianowych opakowań (Egodage i in., 2016), a także bezpieczeństwo i jakość żywności w środku (Sharma i in., 2020; Ahari i in., 2021). Głównymi zaletami nanotechnologii w dziedzinie tekstyliów są jej właściwości zwiększające wytrzymałość,

niezawodność i wielokrotne wykorzystanie (Asif i Hasan, 2018). Nanocząstki srebra są szeroko stosowane w produkcji kombinezonów chirurgicznych, bandaży, prześcieradeł, poszewek na poduszki, dywanów i ubrań dla zwierząt ze względu na ich gęstą strukturę (Wu i in., 2021). Dodatkowo opatrunki z AgNPs mogą hamować wzrost drobnoustrojów wokół rany, a tym samym przyspieszać proces gojenia (Huang i in., 2007). Tabela 1. zawiera listę różnych zastosowań AgNPs.

Tab. 1. Zastosowania nanocząstek srebra w różnych dziedzinach życia.

ZASTOSOWANIE	PRZYKŁADY
Medycyna i biomedycyna	<p>Produkcja opatrunków, produktów do stosowania na rany i bandaży (Huang i in., 2007)</p> <p>Produkcja cewników z powłoką zawierającą AgNPs (Lackner i in., 2008).</p> <p>Produkcja nici i implantów chirurgicznych (Yaqoob i in., 2020)</p> <p>Produkcja środków dezynfekcyjnych (Yan i in., 2018)</p> <p>Produkcja rusztowań do hodowli tkanek (Shah i in., 2018)</p>
Przemysł spożywczy	<p>Produkcja kubków i butelek dla niemowląt (Momin i in., 2013)</p> <p>Produkcja opakowań na soki owocowe (Emamifar i in., 2010)</p> <p>Produkcja opakowań na mięso (Fernandez i in., 2010)</p>
Przemysł tekstylny	<p>Produkcja nanokompozytu do produkcji tkanin o właściwościach przeciwbakteryjnych i trudnopalnych (Attia i Morsy, 2016)</p> <p>Powłoka tkanin używanych komercyjnie do produkcji skarpet, odzieży chirurgicznej, prześcieradeł, poszewek na poduszki, dywanów i odzieży dla zwierząt (Radetić, 2013; Varner i in., 2010)</p>
Farmaceutyka	<p>Produkcja polimerowych nanokapsulek zatopionych w ultramałe nanoklastry srebra dla synergistycznej farmakologii i lepszego dostarczania doustnego docetakselu (Sohail i in., 2018)</p> <p>Systemy do kontrolowanego dostarczania/ uwalniania leków przeciwnowotworowych (Sohail i in., 2018)</p>

1.3. Drogi narażenia i biodystrybucja nanocząstek srebra

Powszechna obecność produktów zawierających nanocząstki, w tym nanocząstki srebra sprawia, że obawy odnośnie ich stosowania stają się coraz większe. Mimo tego, że nanostruktury od zawsze występują w naturze to dynamiczny wzrost ich produkcji i wzrastająca popularność zastosowania nanosrebra przyczynia się do zwiększenia liczby organizmów narażonych na takie formy metalu (Weldon i in., 2016; Wolska i in., 2017). Nanocząstki srebra wykazują silne właściwości bakteriobójcze, grzybobójcze oraz wirusobójcze przez co znajdują szerokie zastosowanie w produktach codziennego użytku. Srebro w postaci nanometrycznej może być uwalniane do środowiska na każdym etapie cyklu życia produktów, a jego głównym nośnikiem są ścieki. Proces migracji metalu w środowisku powoduje, że na jego toksyczne działanie narażone są organizmy wszystkich poziomów troficznych ekosystemów wodnych i lądowych (Benn i Westerhoff, 2008; Farkas i in., 2011; Kumar i in., 2011; Vlachogianni i Valavanidis, 2014).

Badania, które prezentują model przepływu Ag pochodzenia antropogenicznego w środowisku wykazały, że w największej ilości jest ono kumulowane w glebie, natomiast znikoma ilość występuje w wodzie i powietrzu (Gottschalk i in., 2009). Analizy geochemiczne w skali kontynentalnej (Australia, Chiny, Europa) wykazały, że ogólna mediana dla organogenicznej wierzchniej warstwy gleby wynosi 0,21 mg/kg; dla mineralogenicznej wierzchniej warstwy gleby wynosi 0,057 mg/kg; a dla podglebia 0,016 mg/kg. Badania wykazały ponadto, że maksymalny poziom rozproszonych zanieczyszczeń lokalnych i regionalnych srebra w glebie wynosił 0,02 mg/kg (Reimann i Fabian, 2022). Na obszarach USA i UE połowa lub więcej osadów ściekowych jest dezynfekowana z wykorzystaniem nanosrebra w celu utworzenia biosolidów, które są następnie stosowane jako nawozy na polach uprawnych (Judy i in., 2015b).

Srebro pochodzące z produkcji, zastosowań przemysłowych i konsumenckich zwykle przedostaje się do ścieków. W przypadku oczyszczalni ścieków komunalnych wykazano, że Ag w dużej mierze tworzy osady stałe Ag_2S niezależnie od formy wyjściowej wprowadzanej do strumienia ścieków po wejściu do oczyszczalni ścieków (Kaegi i in., 2011; Lombi i in., 2013; Ma i in., 2014). Skutkuje to wysoką zawartością Ag w osadach ściekowych, dochodzącą do 856 mg/kg suchej masy (Fijalkowski i in., 2017). Osady ściekowe można usuwać na składowiska, spalać lub stosować jako nawozy (biosolidy). W przypadku spalania warto zauważyć, że Ag_2S można przekształcić w Ag^0 (Meier i in., 2016). Popioły z procesu spalania trafiają przede wszystkim na składowiska

odpadów (Donatello i Cheeseman, 2013). Większa część Ag trafia do osadów ściekowych, zamiast wypływać ze ściekami (Li i in., 2013). Jednak część Ag pozostająca w ściekach jest nadal odpowiedzialna za zanieczyszczenie srebrem poprzez osadzanie się na osadach. Pomiar próbek terenowych wykazały, że zawartość Ag w osadach wynosi zwykle kilkaset ng/g lub kilka $\mu\text{g/g}$ (Coynel i in., 2016; Juncos i in., 2017; Metcalfe i in., 2018; Vogt i in., 2019). Na przykład stwierdzono, że Ag ze ścieków gromadziło się głównie w osadach w pobliżu punktu zrzutu oczyszczalni ścieków ($0,98 \pm 0,62 \mu\text{g/g}$), a następnie rozkładało się równomiernie w stężeniach między 0,09 a $0,13 \mu\text{g/g}$ w osadach jeziora przyjmującego ścieki (Vogt i in., 2019). Pod wpływem zaburzeń naturalnych (sztormy, turbulencje, gradienty temperatury i gatunki bentosowe) lub antropogenicznych (pogłębianie i kilwatery statków) nanocząstki Ag i na bazie Ag mogą z czasem być transportowane do innych części zbiorników wodnych (Purcell i Peters, 1998; Vogt i in., 2019). Metcalfe i in. (2018) wykazali, że niewielka frakcja (15–25%) całkowitego Ag w osadach była nietrwała i po wstrząśnięciu może przedostać się do wody w postaci rozpuszczonej lub koloidalnej.

W rzekach, jeziorach, ujściach rzek i oceanach stężenia całkowite Ag oszacowano na poziomie poniżej 10 ng/L (Purcell i Petersa, 1998; Luoma, 2008; Shotyk i in., 2017). Shafer i in. (1994), którzy przeanalizowali zawartość Ag w 49 rzekach, stwierdzili, że całkowite stężenie Ag w wodach wynosiło 1–5 ng/L, $29,1 \pm 26,4 \text{ ng/L}$, $12,2 \pm 6,8 \text{ ng/L}$ odpowiednio na obszarach o niskim zanieczyszczeniu, obszarach miejskich i obszarach głównych rzek, do których wpływa wiele zlewni. Powszechne stosowanie Ag i AgNPs może skutkować ich celowym lub niezamierzonym przedostaniem się do środowiska wodnego poprzez ścieki lub zrzuty przemysłowe (Deycard i in., 2017; Sanchís i in., 2020). Powszechne wprowadzanie i stosowanie produktów zawierających AgNPs spowodowało wzrost typowych stężeń Ag w wodach powierzchniowych, które obecnie mieszczą się w zakresie 0,1–10 ng/l (Johnson i in., 2014; Shotyk i in., 2017; Metcalfe i in., 2018; Sanchís i in., 2020; Javed i in., 2020; Wang i in., 2020). Szacuje się, że przy intensywnym stosowaniu produktów biobójczych na bazie Ag, jego stężenia prawdopodobnie wzrosną na obszarach, które są silnie zanieczyszczone, narażone na wpływ człowieka lub posiadające ograniczone oczyszczalnie ścieków (Galon i Flegal, 2015).

Powszechna dostępność produktów zawierających AgNPs, podwyższa ryzyko ich przenikania do organizmów. Może ono zachodzić drogą pokarmową, wziewną, dermalną lub w wyniku dożylnego podania (podczas stosowania preparatów medycznych).

Główną drogą narażenia na nanosrebro jest droga pokarmowa. AgNPs obecne w opakowaniach żywności mogą być częściowo do niej uwalniane i najczęściej ulegają przy tym modyfikacjom (np. agregacja, utlenianie), które mają wpływ na ich właściwości i toksyczność. Dotychczasowe badania wykazały, że proces uwalniania nie jest szczególnie wydajny, ale podwyższona temperatura i dłuższy czas kontaktu AgNPs z żywnością nasilają to zjawisko (Quadros i in., 2013; Goetz i in., 2013; Artiaga i in., 2015). Podobnie jest w przypadku nanostruktur wchodzących w skład past i szczoteczek do zębów (Mackevica i in., 2016). Ponadto wzrastający poziom zanieczyszczenia środowiska nanocząstkami może powodować zwiększone przyjmowanie AgNPs wraz z wodą pitną lub zanieczyszczonymi organizmami wodnymi. Konieczne jest więc poznanie farmakokinetyki AgNPs, aby zapobiegać ich nadmiernej kumulacji w organizmach zwierząt i człowieka.

Mało jest badań dotyczących wchłaniania AgNPs z przewodu pokarmowego. Park i in. (2011a) obserwowali, że biodostępność AgNPs o wielkości 7,9 nm po podaniu ich szczurom drogą pokarmową wynosiła tylko kilka procent (1,2% – 4,2% w zależności od dawki), przy czym nie jest pewne w jakiej postaci są one wchłaniane. Po przeniknięciu do układu krążenia, AgNPs są transportowane głównie do wątroby i śledziony (Xue i in., 2012; Lee i in., 2013c). Jednak ich obecność stwierdzono również w innych narządach i tkankach, m.in. we krwi, płucach, nerkach, sercu, mózgu i narządach rozrodczych (Sung i in., 2009; Kim i in., 2010; Loeschner i in., 2011; Park i in., 2011a; Xue i in., 2012; Lee i in., 2013a; Lee i in., 2013c). Badania nad farmakokinetyką AgNPs wykazały również, że większość tkanek i narządów jest zdolna do ich usunięcia po zaprzestaniu ekspozycji, z wyjątkiem narządów rozrodczych i mózgu, które wykazują zwiększoną ich retencję (Zande i in., 2012; Lee i in., 2013a). W badaniach, w których zastosowano model narażenia na AgNPs drogą pokarmową wykazano, że ulegają one biodystrybucji do licznych narządów. Podawanie szczurom dużych dawek AgNPs o wielkości 56 nm przez 90 dni skutkowało ich obecnością we krwi, wątrobie, nerkach, płucach, jądrach i mózgu badanych zwierząt (Kim i in., 2010). Po 28-dniowym narażeniu szczurów na stabilizowane poliwinylpirolidonem (PVP) AgNPs o wielkości 14 ± 4 nm (w dawce 9 mg/kg m.c.) stwierdzono ich obecność w osoczu, wątrobie, nerkach, żołądku, płucach, mięśniach, mózgu i jelicie cienkim (Loeschner i in., 2011). Również podawanie AgNPs (o wielkości 22, 42 lub 71 nm) myszom przez 14 dni w dawce 1 mg/kg m.c. prowadziło do ich biodystrybucji w wątrobie, nerkach, płucach, mózgu i jądrach (Park i in., 2010a). Podsumowując, przedłużona ekspozycja szczurów na AgNPs w różnej dawce i o różnej

wielkości prowadziła do kumulowania się srebra w większości narządów oraz we krwi. Ponadto pomiar stężenia Ag, wykonany po 4 miesiącach od zaprzestania ekspozycji na AgNPs wykazał, że jedynie w mózgu i narządach rozrodczych nie zmniejszyło się ono, w porównaniu do wcześniejszych punktów czasowych (Lee i in., 2013a).

Możliwość wnikania AgNPs do organizmu drogą wziewną (np. poprzez inhalację kurzu lub pyłów je zawierających) lub też kontaktową dotyczy głównie pracowników zatrudnionych przy produkcji nanocząstek oraz produktów je zawierających. Z tego powodu pojawiają się wytyczne dotyczące dopuszczalnych wartości narażenia na nanocząstki srebra w miejscu pracy (OEL, ang *occupational exposure limit*). Dane literaturowe wskazują, że OEL dla AgNPs w przypadku subchronicznej ekspozycji drogą wziewną powinien wynosić $0,19 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Weldon i in., 2016). Chroniczna ekspozycja na AgNPs drogą wziewną może również prowadzić do ich obecności w układzie krążenia. Wykazano, że u szczurów narażonych tą drogą na AgNPs o wielkości 18 – 19 nm (przez 13 tygodni, 5 dni tygodniowo, 6 godzin dziennie), kumulują się one głównie w wątrobie i płucach, a w mniejszym stopniu w nerkach, opuszce węchowej, mózgu i we krwi (Sung i in., 2009). Zaobserwowano również, że jednorazowe podanie donosowe myszom dużej dawki (100 lub 500 mg/kg m.c.) AgNPs o wielkości 25 nm skutkuje nagromadzeniem się nanogranul w jamie nosowej, płucach, śledzionie, nerkach i mózgu (Genter i in., 2012).

Osoby cierpiące na łuszczycę, atopowe zapalenie skóry czy mające uszkodzenia skóry mogą być narażone na przenikanie AgNPs drogą dermalną, obecnych w kosmetykach, ubraniach czy bieliznie do układu krążenia (Monteiro–Riviere, 2014).

Porównanie biodystrybucji AgNPs niestabilizowanych ($< 20 \text{ nm}$) i stabilizowanych PVP ($< 15 \text{ nm}$) wykazało podobny profil lokalizacji u szczurów, tzn. ich obecność stwierdzono w wątrobie, nerkach, płucach, sercu, śledzionie, mózgu, pęcherzu moczowym, jądrach, jelicie, żołądku oraz we krwi, przy czym poziom srebra w mózgu i jądrach nie zmieniał się w ciągu 8 tygodni od podania (Zande i in., 2012). Sposób wydalania nanocząstek z organizmu został również zbadany. Stwierdzono, że AgNPs są usuwane z organizmu głównie z kałem, a w niewielkim stopniu z moczem. Oznacza to, że AgNPs są przede wszystkim wydalane wraz z żółcią do światła jelita (Park i in., 2011a; Lee i in., 2013c; Jimenez–Lamana i in., 2014).

1.4. Toksyczność nanocząstek srebra

Wykorzystanie właściwości przeciwdrobnoustrojowych nanometrycznego srebra stało się bardzo ważnym aspektem, a zarazem wyzwaniem dla nanotechnologii.

Doświadczenia nad oceną wpływu AgNPs na drobnoustroje chorobotwórcze wskazują wiele korzyści z ich stosowania, ale nie powinno się zapominać o możliwych zagrożeniach i niepożądanych skutkach ich masowego zastosowania. Stosowanie nanocząstek metali niesie za sobą nieprzewidywalne skutki dla środowiska. Naukowcy ostrzegają, że wzrastająca ilość odpadów zawierających nanocząstki może spowodować ich przedostawanie się do środowiska naturalnego i oddziaływanie na żyjące w nim organizmy. Ich toksyczność może zagrażać organizmom zarówno środowisk wodnych, jak i lądowych. Biorąc pod uwagę przeciwdrobnoustrojowe działanie nanocząstek Ag i towarzyszącego im jonu Ag^+ , ważne jest zrozumienie oceny ryzyka ekologicznego ich występowania w glebie i ekosystemie wodnym (Eckelman i in., 2007).

1.4.1. Toksyczność względem mikroorganizmów

W licznych badaniach wykazano, że Ag ma znaczący wpływ na funkcjonowanie i strukturę mikroorganizmów glebowych, które wydają się być wrażliwym „receptorem” ekosystemu. Zdecydowana większość tych badań koncentrowała się na produkowanych AgNPs i była prowadzona w ciągu ostatniej dekady. Było to spowodowane obawami dotyczącymi nanocząstek Ag pochodzących z tekstyliów i innych produktów konsumenckich przedostających się do ścieków, rozdzielających się na osady ściekowe i ostatecznie wykorzystywanych na gruntach jako biosolidy. Wiele z tych badań obejmuje również $AgNO_3$ jako produkt kontrolny lub transformacyjny AgNPs, głównie do Ag_2S (Carbone i in., 2014; Chunjaturas i in., 2014; Grün i in., 2019).

Inne badania obejmowały Ag_2S -NPs lub biosolidy, w których Ag został przekształcony w Ag_2S (Colman i in., 2013; Doolette i in., 2016; Courtois i in., 2019). Siarczowanie Ag wydaje się zmniejszać toksyczność względem drobnoustrojów (Doolette i in., 2016). Jednak nawet wtedy, gdy cząstki są w dużym stopniu zsiarczowane, można zaobserwować zmiany w liczebności i strukturze drobnoustrojów. Na przykład Colman i in. (2013) zaobserwowali zmiany w liczebności i funkcjonowaniu drobnoustrojów przy niskich stężeniach Ag na poziomie $\mu g/kg$ w osadach, które były inkubowane z Ag^+ i AgNPs, co skutkowało siarczowaniem. Efekty były bardziej widoczne w przypadku AgNPs i obejmowały zwiększoną emisję N_2O , silnego gazu cieplarnianego (Colman i in., 2013). Ponadto Doolette i in. (2016) zaobserwowali zmiany w nityfikacji oraz w kluczowych genach nityfikacyjnych u bakterii w glebach zanieczyszczonych Ag^+ , AgNPs i Ag_2S . W tym badaniu wartości progowe dla zmian drobnoustrojów na podstawie danych z sekwencjonowania były podobne między Ag^+

i AgNPs przy około 1,4 mg Ag/kg; jednak podobne odpowiedzi obserwowano tylko przy 5,9 mg/kg dla Ag₂S. Zmiany nityfikacji zaobserwowane przez Doolette i in. (2016) mogą odnosić się do wzrostu N₂O obserwowanego przez Colmana i in. (2013). Forstner i in. (2019) podobnie zaobserwowali zmiany w liczebności i strukturze drobnoustrojów w siarczkwanych AgNPs oraz wykazali, że rosnące zasolenie gleby zwiększa zmiany składu drobnoustrojów. Wykazano także, że zanieczyszczenie gleby Ag⁺, AgNPs i Ag₂S niekorzystnie wpływa na kolonizację roślin przez bakterie nityfikacyjne (Judy i in., 2015a). Dowiedziono także, że wysokie stężenie różnych form Ag w glebie selekcjonuje bakterie odporne na metale (Vasileiadis i in., 2015). Zatem wpływ Ag na społeczności drobnoustrojów glebowych może powodować różne niekorzystne skutki, z których niektóre mogą niekorzystnie wpływać na podstawowe usługi ekosystemowe świadczone przez glebę, w tym obieg azotu.

Rosnąca oporność drobnoustrojów na dostępne antybiotyki i chemioterapeutyki zmusza do trwających od lat poszukiwań produktów lub strategii, które stworzyłyby nowe możliwości terapeutyczne. Szczególnym zainteresowaniem badaczy cieszą się nanocząstki, a największy nacisk położony jest na nanocząstki srebra (Niemirowicz i in., 2012). Przypuszczano, że srebro w formie nanometrycznej będzie jeszcze bardziej skutecznym środkiem przeciwdrobnoustrojowym niż stosowane dotychczas związki srebra. Wykazano, że AgNPs mogą być stosowane zarówno w zakażeniach spowodowanych przez bakterie Gram-dodatnie, jak np. *Staphylococcus aureus* oraz bakterie Gram-ujemne, takie jak *Pseudomonas aeruginosa* czy *Escherichia coli* (Sondi i in., 2004; Morones i in., 2005; Tamboli i in., 2013). Intensywne badania trwają szczególnie nad ich skutecznością względem szczepów bakterii wielolekoopornych (Allahverdiyev i in., 2011; Ge i in., 2014), a także próbuje się je wykorzystywać jako środek niszczący biofilm bakteryjny lub zapobiegający jego powstawaniu (Kalishwaralal i in., 2010; Palanisamy i in., 2014).

Sam mechanizm przeciwdrobnoustrojowego działania AgNPs nie został jednoznacznie określony. Niektórzy badacze uważają, że jest on ściśle związany z jonami srebra uwolnionymi wewnątrz komórek mikroorganizmów (Lok i in., 2007; Hachicho i in., 2014), aczkolwiek pojawiają się również opinie, że same nanocząstki oddziałują bezpośrednio na mikroorganizmy (Joshi i in., 2015). Jak dotąd najlepiej poznano mechanizmy działania przeciwbakteryjnego nanosrebra. AgNPs bezpośrednio lub za pośrednictwem uwolnionych z ich powierzchni Ag⁺ powodują uszkodzenia błon biologicznych. Srebro przylega do ściany komórkowej bakterii i powoduje następnie

zmiany strukturalne w białkach błony komórkowej, co w konsekwencji prowadzi do ich inaktywacji i uwalniania oraz izomeryzacji cis–trans nienasyconych kwasów tłuszczowych. Wspomniane procesy przyczyniają się do zwiększenia przepuszczalności błony komórkowej bakterii, co w konsekwencji powoduje, że komórka staje się bardziej podatna na działanie szkodliwych czynników środowiskowych (Sondi i in., 2004; Hachicho i in., 2014). Uważa się, że szczególnie wrażliwe na działanie AgNPs lub Ag⁺ są białka strukturalne i enzymy zawierające liczne grupy tiolowe (Shrivastava, 2007). Wykazano, że w wyniku oddziaływania srebra z grupami –SH enzymów *Staphylococcus epidermidis* dochodzi do zaburzenia funkcji niektórych z nich (Gordon i in., 2010). Ponadto obie formy srebra mogą oddziaływać na materiał genetyczny, co skutkuje zaburzeniem procesu replikacji w konsekwencji prowadzi do zahamowania podziału komórki (Feng i in., 2000; Shrivastava, 2007). Wykazuje się także, że zdolność generowania wolnych rodników pod wpływem AgNPs, może być również istotnym elementem ich działania przeciwbakteryjnego (Lee i in., 2014a; Joshi i in., 2015).

AgNPs wykazują także działanie przeciwwirusowe oraz przeciwgrzybicze. Wykazano ich skuteczność względem *Cladosporium cladosporoides*, *Aspergillus niger* (Pulit i in., 2013), *Trichophyton rubrum* (Pereira i in., 2014) oraz *Candida sp.* (Monteiro i in., 2015). Badania nad ich działaniem przeciwwirusowym wykazały, że AgNPs są skuteczne w zwalczaniu takich wirusów jak: HIV–1 (Lara i in., 2010), wirus zapalenia wątroby typu B (Lu i in., 2008), wirus opryszczki typu 1 (Baram–Pinto i in., 2009) i typu 2 (Orłowski i in., 2014) oraz wirus grypy (Xiang i in., 2013). Mechanizm ich działania przeciwwirusowego jest wciąż badany. Uważa się, że AgNPs oddziałują z receptorami glikoproteinowymi wirusa (Lara i in., 2010), jego otoczką (Xiang i in., 2013) lub nicią DNA/RNA (Lu i in., 2008), co w konsekwencji hamuje replikację materiału genetycznego wirusa i uniemożliwia wiązanie się z komórkami gospodarza.

1.4.2. Toksyczność względem ssaków

Powszechne stosowanie nanocząstek srebra zwiększa narażenie na ich działanie ludzi i zwierząt różnymi drogami (Du i in., 2018). Główne drogi przenikania AgNPs do organizmu zwierząt i człowieka obejmują układ oddechowy, przewód pokarmowy i skórę (Korani i in., 2015). Potwierdzają to eksperymenty *in vitro* i *in vivo* przeprowadzane w celu oceny toksyczności AgNPs przy użyciu różnych systemów biologicznych, w tym ludzi i zwierząt (Ghosh i in., 2012). Cytotoksyczność i genotoksyczność AgNPs zależą od czasu trwania ekspozycji, dawki oraz wielkości nanocząstek (Cho i in., 2018; Liao

i in., 2019). Po wnikięciu do układu krążenia, nanocząstki przenikają do tkanek i narządów, gdzie przejawiają działanie toksyczne. Dane literaturowe pokazują, że systematyczna i chroniczna ekspozycja na AgNPs prowadzi do rozwoju stanów zapalnych i efektów cytotoksycznych w obrębie wielu narządów (Liao i in., 2019).

Ocena toksyczności AgNPs z zastosowaniem eksperymentów *in vitro* z ludzkimi limfocytami wykazała genotoksyczny efekt przy dawce 25 µg/ml. Nanocząstki srebra powodowały również pęknięcia DNA i znaczny wzrost powstawania ROS przy różnych dawkach (25–200 µg/ml) (Ghosh i in., 2012). Zaobserwowano, że długotrwała ekspozycja drogą wziewną u szczurów prowadziła do uszkodzeń płuc, m.in. stwierdzono znaczący spadek objętości oddechowej oraz zmiany histopatologiczne w nabłonku (Sung i in., 2008).

Dane literaturowe dowodzą również, że AgNPs wywołują efekt nefrotoksyczny. Badania przeprowadzone na szczurach wykazały obecność zmian histopatologicznych w obrębie nerek oraz podwyższenie stężenia mocznika i kreatyniny we krwi (Feng i in., 2014; Sarhan i in., 2014). Ponadto dożylne podanie AgNPs prowadziło do gromadzenia się glikoaminoglikanów w błonie podstawnej nerek, co skutkowało upośledzeniem ich czynności (Feng i in., 2014). Zwraca się również uwagę na upośledzenie procesu spermatogenezy i znaczny spadek liczby plemników w najądrzach (Gromadzka–Ostrowska i in., 2012; Sleiman i in., 2013) oraz zmiany histopatologiczne w śledzionie i węzłach chłonnych (Jong i in., 2013) pod wpływem ekspozycji na AgNPs u szczurów.

Szczególnie ważnym aspektem badań jest ocena wpływu AgNPs na wątrobę, która ze względu na pełnienie funkcji detoksykacyjnych organizmu narażona jest w największym stopniu na działanie nanocząstek. U gryzoni narażonych na AgNPs zaobserwowano szereg zmian w wątrobie, m.in. zmiany histopatologiczne w postaci wakuolizacji cytoplazmy hepatocytów, hiperplazji nabłonka przewodów żółciowych i obrzęku wokół naczyń krwionośnych oraz zmiany nekrotyczne i zapalne (Kim i in., 2010; Lee i in., 2013b; Al Gurabi i in., 2015; El Mahdy i in., 2015; Patlolla i in., 2015). Ponadto wykazano wzrost aktywności enzymów wątrobowych, takich jak fosfataza alkaliczna, aminotransferaza alaninowa i asparaginianowa (Park i in., 2010a; Al Gurabi i in., 2015; Heydrnejad i in., 2015) oraz hipercholesterolemię, która objawiała się zbyt wysokim poziomem cholesterolu całkowitego i frakcji LDL w surowicy (Kim i in., 2010; Ebabe Elle i in., 2013). AgNPs powodowało również nadprodukcję wolnych rodników i stan zapalny w tym narządzie (Park i in., 2010a; Jong i in., 2013; Ebabe Elle i in., 2013; Patlolla i in., 2015). Pojawiły się także informacje na temat nasilenia procesów autofagii

i apoptozy, które odgrywają ważną rolę w mechanizmach hepatotoksyczności tych nanocząstek (Lee i in., 2013b).

Innym sposobem narażenia ludzi i zwierząt na Ag jest transfer troficzny. Troficzna dostępność metali wyrażana jest jako troficzny współczynnik transferu (TTF), opisywany matematycznie jako stosunek stężenia metalu u drapieżnika do jego stężenia w ciele ofiary. Wyniki badań sugerują, że TTF dla AgNPs wynosi <1 w łańcuchach pokarmowych, co wskazuje na brak postępu akumulacji Ag wraz ze wzrostem poziomów troficznych (Dang i in., 2021). Istnieje jednak wiele luk w badaniach związanych z mechanizmami toksyczności, procesami oraz czynnikami kontrolującymi przenoszenie troficzne Ag z upraw prowadzonych na terenach, na których stosowano biosolidy do organizmów ludzi i zwierząt oraz powiązań między nimi, a scenariuszami narażenia i skutkami toksykologicznymi.

Pewną trudność w usystematyzowaniu wiedzy na temat efektów toksycznych wywołanych przez AgNPs u ssaków, sprawia różnorodność nanocząstek, zastosowanych w poszczególnych badaniach. Nie tylko dawka, czas i droga narażenia mają znaczenie, ale również wielkość nanocząstek czy typ ich pokrycia.

1.4.3. Toksyczność względem bezkręgowców

Badania prowadzone nad toksycznością nanosrebra względem organizmów bezkręgowych dotyczą głównie zwierząt żyjących w glebie, takich jak nicianie, dżdżownice, wazonkowce, skoczogonki i mączniki. Doświadczenia mające na celu porównanie toksyczności jonów Ag^+ i AgNPs wykazały, że jest ona zależna od gatunku i rodzaju gleby. W większości przypadków jony Ag^+ wykazywały większą toksyczność niż AgNPs (Velicogna i in., 2016). Występują jednak wyjątki, na przykład u dżdżownicy *Eisenia andrei*, gdzie zaobserwowano spadek reprodukcji tylko w odpowiedzi na gleby wzbogacone AgNPs, a nie $AgNO_3$. Stało się tak dlatego, że część nanocząstek Ag w badaniu pozostała w postaci cząstek dyspergowalnych, a większość z nich była częściowo zasiarczona, co umożliwiło uwolnienie Ag^+ w glebie i skutkowało większymi ekstrahowanymi frakcjami Ag^+ w porównaniu z $AgNO_3$ (Jesmer i in., 2017). Istnieją również gatunki, takie jak mącznik młynarek (*Tenebrio molitor*), które są narażone głównie na Ag poprzez wodę porową w glebie, połykają tylko niewielką ilość gleby i mają wysoki współczynnik eliminacji Ag, co skutkuje ogólnie niską toksycznością w wyniku narażenia na jony Ag^+ i AgNPs (Khodaparast i in., 2021). Zatem w przypadku bezkręgowców, w zależności od gatunku, toksyczność AgNPs może się

różnić ze względu na różnice we wskaźnikach wychwyty i eliminacji Ag oraz drodze narażenia.

Wiele badań nad oceną mechanizmu toksyczności Ag⁺ i AgNPs o różnej wielkości i powłokach w obecności materii organicznej i po przemianach środowiskowych wykorzystuje *Caenorhabditis elegans* jako organizm modelowy. Zaobserwowano m.in., że ekspozycja na AgNPs z różnymi powłokami skutkowałą wpływem na wzrost *C. elegans* ze względu na różnice w szybkości ich rozpuszczania, przy czym najbardziej toksyczne i mniej stabilne były AgNPs w osnowie z gumy arabskiej, a następnie poliwinylpirolidonu (PVP) i powlekane cytrynianem (Yang i in., 2012). Wykazano także różnicę w wychwycie i dystrybucji Ag po ekspozycji na AgNPs w osnowie z cytrynianem i PVP, gdzie tylko AgNPs z powłoką cytrynianową wykryto w zarodkach za pomocą hiperspektralnej mikroskopii ciemnego pola (Meyer i in., 2010; Yang i in., 2014).

Różnica w wychwycie Ag była największa w przypadku AgNPs po transformacji. Badano siarczkowane AgNPs (sAg NPs), gdzie przy równo toksycznych stężeniach LC30 wykryto znacznie mniej Ag w nicieniach za pomocą synchrotronowej mikroskopii rentgenowskiej, w porównaniu z tymi eksponowanymi na działanie Ag⁺ lub PVP–AgNPs (Starnes i in., 2015). Otrzymane wyniki dowodzą, że w porównaniu z niestabilizowanymi AgNPs, mniejsza ilość Ag kumulowana jest wewnątrz organizmu podczas narażenia *C. elegans* na transformowane AgNPs i wydaje się wywoływać podobny poziom toksyczności. Potrzebne są jednak dalsze analizy na innych organizmach, ponieważ ostatnie badania podkreślają, że biodostępność AgNPs może być podobna do Ag⁺ (Dang i in., 2020). Podstawowym procesem przemiany AgNPs po przedostaniu się do ścieków, biosolidów i gleb jest siarczkowanie. Wykazano, że toksyczność nietransformowanych AgNPs jest wyższa, w porównaniu z transformowanymi, bardziej stabilnymi AgNPs, przy czym EC50 dla reprodukcji wynosi 566 µg/l dla AgNPs w porównaniu z 4011 µg /l dla AgNPs (Starnes i in., 2015). W badaniu transkryptomycznym, przeprowadzonym przez Starnes i in. (2016), zbadano wpływ ekspozycji modelowych nicieni glebowych *Caenorhabditis elegans* na nietransformowane AgNPs i Ag⁺. Zweryfikowano ekspresję 4 genów (numr-1, rol-8, col-158 i grl-20) i wykazano kilka wspólnych odpowiedzi związanych ze stresem, co wskazuje, że toksyczność była przynajmniej częściowo spowodowana rozpuszczaniem. Jednak transformowane AgNPs wykazywały całkowicie odrębne sygnatury transkryptomiczne od nietransformowanych lub jonów Ag⁺, których nie wyjaśniono rozpuszczaniem (Starnes i in., 2016).

Obecność srebra może również wpływać na jego toksyczność w środowiskach glebowych innych materiałów, takich jak włókna mikroplastiku. Współekspozycja dżdżownic *Eisenia andrei* na mikroplastik i AgNPs spowodowała 3-krotny wzrost toksyczności reprodukcyjnej, w porównaniu z indywidualną ekspozycją AgNPs (Khodaparast i in., 2021; Tourinho i in., 2021). Co ciekawe, nie zaobserwowano zwiększenia toksyczności dla łącznego narażenia na mikroplastiki z jonowym Ag^+ , co sugeruje efekt cząstek stałych. Dodatkowo, u innego gatunku, *Enchytraeus crypticus*, nie wykazano różnicy w toksyczności obserwowanej między indywidualnymi i połączonymi ekspozycjami na AgNPs i włókna mikroplastiku. Wskazuje to, że łączone ekspozycje, w zależności od organizmu, mogą nasilać lub łagodzić toksyczność obserwowaną w przypadku nanocząstek Ag. Wiele produktów zawierających nanosrebro, które są opracowywane dla różnych aplikacji (np. nanosensory), oprócz AgNPs, często zawierają również inne materiały (nanokompozyty) lub metale (nanostopy) i ich stabilność może wpływać na toksyczność przez obecność innych materiałów. W ocenie interakcji między AgNPs i AuNPs, wykazano, że te NPs mogą tworzyć stabilny bimetaliczny stop $\text{Ag}\backslash\text{Au}$, a zatem mogą redukować toksyczność AgNPs. Jednakże, gdy AgNPs wchodziły w interakcje z TiO_2 NPs, szczególnie w ciemności nastąpiłby wzrost uwalniania jonów Ag^+ , co wskazuje na to, że te interakcje mogą potencjalnie zwiększać toksyczność (Sharma i in., 2019). Badania, w których oceniano toksyczność Ag w połączeniu z innymi nanocząstkami lub materiałami, przeprowadzono głównie na bezkręgowcach wodnych. Zatem wiedza na temat tego, jak interakcje, a nawet współwystępowanie nanocząstek Ag z innymi nanocząstkami metali (stopami), nanomateriałami 2D (tlenek grafenu z Ag) czy zaawansowanymi nanomateriałami wpływają na ich toksyczność dla bezkręgowców glebowych jest ograniczona.

1.5. Mechanizmy toksyczności nanocząstek srebra

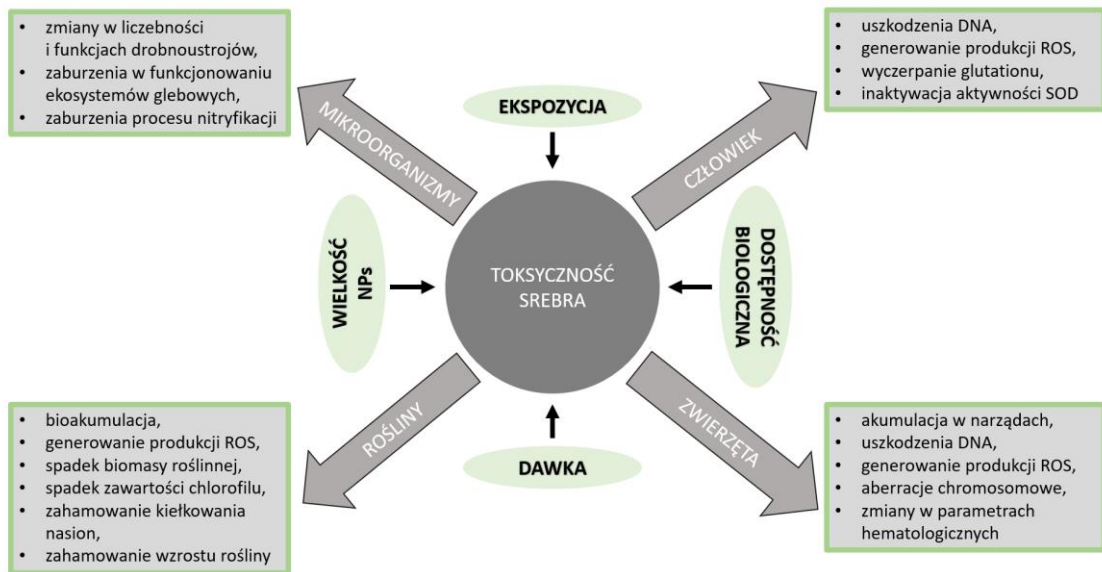
Toksyczność nanocząstek Ag dla układów biologicznych wynika głównie z przyłączania nanocząstek do jednostek biologicznych, po czym następują reakcje. Potencjalne reakcje obejmują rozpad błony komórkowej, wytwarzanie ROS, wychwytywanie komórkowy i późniejszą genotoksyczność, utlenianie białek, zakłócenie transdukcji energii i uwalnianie toksycznych pierwiastków (Yuan i in., 2018). Park i in. (2010b) podali, że AgNPs indukują cytotoxycznosc poprzez mechanizm typu konia trojańskiego, tj. AgNPs są internalizowane w komórkach, a następnie jonizowane, aby uwolnić wysoki poziom toksycznych jonów Ag^+ . Hsiao i in. (2015) stwierdzili, że H_2O_2 , który jest

kluczowym wewnątrzkomórkowym ROS, reaguje z AgNPs, tworząc Ag^+ . Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że AgNPs indukują stres oksydacyjny w systemach biologicznych (Das i in., 2017; Du i in., 2018). Stres oksydacyjny wyzwała powstawanie ROS, które zaburzają równowagę potencjału redoks komórek, tj. mechanizmy antyoksydacyjne komórek nie są w stanie zwalczyć toksycznych związków (Patlolla i in., 2015).

Na przemianę AgNPs w środowisku wodnym wpływa wiele czynników, w tym rodzaj zewnętrznych powłok, pH, rodzaj elektrolitów, siła jonowa, ligandy organiczne, materia organiczna, warunki redoks i światło (Sharma i in., 2014). Proponowane mechanizmy związane z genotoksycznością AgNPs obejmują dezintegrację DNA, kondensację jądrową, powstawanie hipodiploidalnych jąder DNA i apoptozę komórek (Du i in., 2018). W kilku badaniach opisano cytotoksyczność i genotoksyczność biologicznie i chemicznie syntetyzowanych AgNPs w komórkach ludzkich (AshRrani i in., 2009; Lima i in., 2012). Możliwy mechanizm toksyczności AgNPs dla komórek ludzkich wynika z przerywania mitochondrialnego łańcucha oddechowego, co prowadzi do powstawania ROS i zakłócenia syntezy ATP, co z kolei może spowodować uszkodzenie DNA (AshRrani i in., 2009).

Literatura dotycząca biodostępności AgNPs jest ograniczona, a większość badań to kontrolowane badania laboratoryjne, przeprowadzane głównie na szczurach, myszach lub organizmach wodnych z wykorzystaniem podania dożylnego, wkraplania lub inhalacji, jako środków kontrolowanego narażenia (Behra i in., 2013; Tortella i in., 2020). Park i in. (2011) podali, że biodostępność doustnie podanych AgNPs wynosiła 1,2% u szczurów eksponowanych na 1 mg/kg AgNPs i 4,2% u zwierząt eksponowanych na 10 mg/kg AgNPs. W innym badaniu stwierdzono, że Ag był obecny we wszystkich badanych narządach szczurów narażonych na nanocząstki Ag, a ekspozycja doustna wydawała się być podobna do ekspozycji na sole Ag (Zande i in., 2012). W swoich badaniach autorzy stwierdzili, że stężenie Ag w narządach było silnie skorelowane z ilością Ag^+ w zawieszynie AgNPs, co wskazuje, że głównie Ag^+ , a w znacznie mniejszym stopniu AgNPs przechodziły przez jelita u narażonych szczurów (Zande i in., 2012). Podobnie niedawno opublikowana praca Gao i in. (2021) wskazała bezpośrednie dowody na to, że toksyczność indukowana AgNPs pochodzi głównie z rozpuszczonego Ag^+ , utworzonego z pierwotnych AgNPs. Jednak mechanizmy toksyczności AgNPs są nadal niejasne, ponieważ ich właściwości i rozpuszczanie Ag^+ wydają się dyktować ich biodostępność (Tortella i in., 2020).

Podsumowując, najnowsza literatura wskazuje, że AgNPs mogą być internalizowane i gromadzone w organizmach wodnych i lądowych poprzez różne mechanizmy, a po wejściu do organizmu AgNPs mogą uwalniać Ag^+ i promować wytwarzanie ROS. Jednak opinie naukowe i wyniki nadal różnią się w odniesieniu do tego, czy toksyczność jest spowodowana rozpuszczonym Ag^+ , czy samymi AgNPs. Wiedza o mechanizmach toksyczności AgNPs wciąż jest niepełna i wymaga dalszej weryfikacji, a zwłaszcza wskazane są badania nad ich toksycznością z zastosowaniem modelu *in vivo*. Kluczowym pytaniem badawczym dotyczącym oceny ryzyka nanocząstek Ag jest to, czy ich toksyczność wynika z tego samego mechanizmu działania toksycznego, co Ag^+ . Aby odpowiedzieć na to pytanie konieczne są dalsze badania toksykologiczne w celu oceny takich parametrów jak genotoksyczność, immunotoksyczność, oznaki stresu oksydacyjnego i neurotoksyczność. Na Ryc. 1 przedstawione zostały skutki toksyczności AgNP dla roślin, drobnoustrojów, ludzi i zwierząt.



Ryc. 1. Toksyczność srebra dla drobnoustrojów, roślin, zwierząt i ludzi (na podstawie: Ale i in., 2024).

1.5.1. Parametry fizykochemiczne wpływające na toksyczność nanocząstek srebra

1.5.1.1. Wielkość i typ pokrycia

Dane literaturowe dowodzą, że największy wpływ na toksyczność nanocząstek ma ich wielkość, a im mniejsza nanocząstka, tym jest ona bardziej toksyczna (Cho i in., 2018; Liao i in., 2019). Zależność tą wykazano głównie dzięki ekspozycji różnych linii komórek ssaczych na AgNPs o różnej średnicy. AgNPs o średnicy mniejszej niż 10 nm wykazywały wyższą toksyczność w porównaniu z większymi nanocząstkami. Dodanie 4,7 nm AgNPs (dawka: 3,36–13,45 µg/ml) do pożywki dla ludzkiej linii komórek nowotworowych wątrobiaka (HepG2) wykazały przeżywalność komórek między 4 a 14 %, podczas gdy przeżywalność komórek narażonych na działanie AgNPs o średnicy 42 nm (dawka: 6,72–26,9 µg/ml) była wyższa (80–90 %) (Avalos i in., 2014). Również inkubacja linii komórkowej L929 fibroblastów z AgNPs o wielkości 20, 80 i 113 nm wykazała, że nanocząstki 20 nm były bardziej cytotoksyczne, genotoksyczne i prozapalne niż pozostałe (Park i in., 2011b). Podobne wnioski uzyskano w badaniach prowadzonych na ludzkich komórkach płuc linii BEAS-2B (Gliga i in., 2014), makrofagach pęcherzyków płucnych (Carlson i in., 2008), linii komórkowej nowotworu wątrobowokomórkowego HepG2, linii komórkowej A549 niedrobnokomórkowego raka płuc (Liu i in., 2010). Ponadto wykazano, że mniejsze nanocząstki łatwiej przenikają do wnętrza komórki niż większe, a w związku z tym wywołują również silniejsze efekty cytotoksyczne. Najmniejsze AgNPs powodowały największy spadek przeżywalności komórek, nasilały produkcję ROS oraz uwalnianie mediatorów stanu zapalnego (Carlson i in., 2008; Liu i in., 2010; Gliga i in., 2014).

Typ pokrycia jest kolejnym czynnikiem, który w znacznym stopniu może wpływać na toksyczność nanocząstek srebra. Powierzchnia AgNPs jest często modyfikowana dzięki wprowadzaniu różnych grup funkcyjnych, co ma na celu zapobieganie tworzenia agregatów oraz zwiększenie ich stabilności w środowisku. Najczęściej wykorzystywane związki do stabilizacji AgNPs to cytryniany, chitosan, poliwinylpirolidon (PVP), polisacharydy, peptydy i związki węgla (Kim i in., 2013). Charakter toksyczności AgNPs może zmieniać się wraz ze zmianą stosowanych środków stabilizujących. W badaniu linii ludzkich komórek HepG2, porównującym toksyczność AgNPs pokrytych osnową z poliwinylpirolidonu (PVP) i bez osnowy, wykazano silniejsze efekty pod względem uszkodzenia DNA w przypadku AgNPs bez osnowy. Ponadto ekspozycja na PVP-AgNPs wywołała aberrację chromosomową

w przeciwieństwie do komórek eksponowanych na AgNPs bez osnowy (Wang i in., 2019). Vazquez–Muñoz i in. (2017), którzy prowadzili badania nad oceną toksycznego działania nanocząstek Ag w osnowie z PVP (rozmiar: 30 nm) na różne układy biologiczne – wirusy, bakterie, mikroalgi, grzyby, komórki zwierzęce oraz ludzkie (komórki rakowe), zaobserwowali jego cytotoksyczny wpływ na wszystkie analizowane układy biologiczne przy stężeniu wynoszącym 10 µg/ml. Badanie to wskazuje, że PVP–AgNPs wykazują działanie toksyczne na wszystkie typy organizmów, niezależnie od ich poziomu złożoności (np. grupy taksonomicznej) (Vazquez–Muñoz i in., 2017). AgNPs mające różne ładunki powierzchniowe wykazują różny wpływ na ludzkie komórki skóry. Ocena ekspozycji ludzkiej skóry na trzy różne typy AgNPs (rozmiar: 20 nm) wykazała, że AgNPs, które były obojętne (stabilizowane glikolem polietylenowym) i dodatnio naładowane (stabilizowane rozgałęzioną polietylenoiminą) penetrują ludzką skórę po podaniu w wyższych stężeniach niż ujemnie naładowane AgNPs (stabilizowane cytrynianem). Zawartość Ag w skórze ludzkiej wynosiła 3,14, 8,88 i 41,18 µg Ag/g skóry odpowiednio dla ujemnie, obojętnie i dodatnio naładowanych AgNPs (Kraeling i in., 2018). Nieliczne badania mające na celu porównanie toksyczności AgNPs w zależności od typu pokrycia sugerują, że ten parametr odgrywa dość istotną rolę. Stwierdzono m.in., że AgNPs pokryte związkami węgla nie wpływają tak znacząco na ograniczenie przeżywalności komórek, jak pozbawione grup funkcyjnych AgNPs o podobnej wielkości (Nishanth i in., 2011). Z kolei AgNPs stabilizowane polisacharydami okazały się być bardziej toksyczne niż nanocząstki bez pokrycia (Ahamed i in., 2008). W kolejnych doniesieniach pokazano, że nanocząstki srebra pokryte PVP (Kim i in., 2013) lub peptydami (Haase i in., 2011) są bardziej toksyczne od AgNPs stabilizowanych cytrynianem, które z kolei przewyższają toksycznością nanocząstki stabilizowane glikolem polietylenowym (Bastos i in., 2016).

1.5.1.2. Uwalnianie jonów Ag⁺ z powierzchni

Część badaczy uważa, że za toksyczność AgNPs odpowiadają wyłącznie jony srebra uwolnione z ich powierzchni wewnątrz komórki. Ten mechanizm działania określono jako „efekt konia trojańskiego” (Park i in., 2010b; Haase i in., 2011). Co więcej udowodniono, że ilość uwalnianych jonów jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości nanocząstek (Gliga i in., 2014). Uwalnianie Ag⁺ jest związane z reakcją utleniania zachodzącą na powierzchni AgNPs, przy czym proces ten zachodzi z około 50–krotnie większą wydajnością wewnątrz komórek, niż w czystej wodzie (Singh i in., 2012).

Najkorzystniejsze warunki do utleniania AgNPs występują wewnątrz lizosomów, ze względu na występujące tam niskie pH (około 4,8) (Setyawati i in., 2014; De Matteis i in., 2015).

Z drugiej strony pojawiają się również doniesienia, że za toksyczność AgNPs odpowiadają zarówno jony uwolnione z ich powierzchni, jak i same nanocząstki (Chae i in., 2009; Powers i in., 2011; Garcia-Reyero i in., 2014). Garcia-Reyero i in. (2014) porównali toksyczność AgNPs stabilizowanych PVP oraz jonów srebra w modelu narażenia ryb. Obydwie formy srebra prowadziły do powstania stresu oksydacyjnego i zaburzenia homeostazy jonów sodowych, potasowych i wodorowych. Niekorzystne skutki AgNPs były związane z aktywacją kilku receptorów jądrowych i zablokowaniem wiązania ligandów do receptorów dopaminergicznych, a u ryb narażonych na jony srebra zaobserwowano zablokowanie wiązania ligandów do receptorów adrenergicznych typu $\alpha 1$ i $\alpha 2$ oraz do receptora kannabinoidowego CB1. Wykazano ponadto, że kwas askorbinowy skutecznie chroni neuronalne komórki PC12 przed stresem oksydacyjnym indukowanym przez jony srebra, ale jest nieskutecznym antyoksydantem, w przypadku narażenia tych komórek na AgNPs (Powers i in., 2011). Z kolei Chae i in. (2009) zaobserwowali, że profil ekspresji genów związanych ze stresem oksydacyjnym, w wątrobie ryb z gatunku ryżanka japońska (*Oryzias latipes*) jest inny dla Ag^+ i AgNPs. Jony srebra nasilały głównie ekspresję genów związanych ze stanem zapalnym, podczas gdy ekspozycja ryb na formę nanometryczną spowodowała wzmożoną ekspresję genów związanych z uszkodzeniami DNA, kancerogenezą i stresem oksydacyjnym.

1.6. Pająki w badaniach ekotoksykologicznych

Postępujący rozwój przemysłu i rolnictwa oraz urbanizacja, doprowadziły do uwolnienia wielu zanieczyszczeń do środowiska naturalnego. Jednym z najpowszechniej występujących są zanieczyszczenia metalami, które ze względu na zdolność do transferu wzdłuż łańcuchów troficznych ekosystemów wodnych i lądowych, wysoką reaktywność oraz stabilność w środowisku naturalnym, wywierają toksyczny wpływ zarówno na poziomie pojedynczych organizmów, jak i całych populacji. Potwierdzono, że obecność metali w środowisku może prowadzić również do zmniejszenia bioróżnorodności, a także tempa wzrostu populacji (Eraly i in., 2011).

Pająki to powszechnie występujące bezkręgowce, będące ważną częścią łańcuchów pokarmowych w ekosystemach lądowych. Drapieżniki te spotykane są licznie zarówno na obszarach czystych, jak i zanieczyszczonych działalnością przemysłu,

aczkolwiek obserwuje się wyraźne różnice w składzie gatunkowym arachnocenoz. Będąc kluczowymi drapieżnikami wielu gatunków owadów, są coraz częściej wykorzystywane jako bioindykatory zanieczyszczenia środowisk metalami, w szczególności tych przekształconych antropogenicznie. W porównaniu do innych bezkręgowców, pająki bioakumulują metale w wysokich stężeniach, podobnych do tych, które rejestrowane są u organizmów detrytosożernych i wielokrotnie wyższych, w porównaniu z roślinożercami. (Hunter i in., 1987; Hendrickx i in., 2003; Wilczek i in., 2003; 2004; 2005; 2008). Uwzględniając wartości współczynników bioakumulacji metali (BAF), drapieżniki te zaliczono do grupy makrokoncentratorów tych elementów (Dallinger, 1993). Badania porównawcze zawartości metali u różnych gatunków pajaków wskazują, że poziomy metali w ich ciele zależą od strategii i intensywności polowania oraz sposobu neutralizacji tego typu elementów (Hendrickx i in., 2003; Wilczek i in., 2003; 2004; 2005; 2008; Stalmach i in., 2015a). W warunkach wysokiego zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi potwierdzono też u pajaków nasilenie procesów enzymatycznej biotransformacji ksenobiotyków, w tym aktywację układów antyoksydacyjnych (Wilczek i in., 2004; 2008; 2013; 2014).

Badania ekotoksykologiczne poświęcają wiele uwagi komórkowym efektom skażenia metalami u owadów, podczas gdy u pajaków, mechanizmy warunkujące tolerancję na wzrastające stężenia metali w organizmie są nadal słabo poznane (Chen i in., 2011). W dostępnej literaturze brakuje informacji na temat reakcji obronnych u tych drapieżników w warunkach działania tego typu zanieczyszczeń, a w szczególności zanieczyszczeń nanocząstkami metali. Poznanie kondycji układów tej grupy bezkręgowców w odpowiedzi na chroniczny kontakt z nanocząstkami metali może być pomocne w wyjaśnieniu mechanizmów determinujących tolerancję pajaków na wysokie stężenia pierwiastków w organizmie oraz pozwoli prognozować zdolność tych drapieżników do kolonizacji terenów zdegradowanych.

Dla wielu gatunków pajaków sieć łowna stanowi niezbędne narzędzie do zdobywania pokarmu (Eberhard, 1990), dlatego zmiana właściwości chemicznych oraz zaburzenie struktury budujących ją włókien może skutkować poważnymi konsekwencjami, zarówno na poziomie osobnika, jak i ekosystemu. W dostępnej literaturze brak jest jednak danych czy ksenobiotyki, w tym metale w formie nanocząstek, które dostają się do organizmu pająka drogą pokarmową (jako naturalną dla tych drapieżników drogą ekspozycji na zanieczyszczenia), mogą zmieniać właściwości chemiczne i strukturalne włókien jedwabiu pajęczonego. We wcześniejszych badaniach

dotyczących toksycznych efektów kadmu i miedzi u samic i samców *S. grossa* wskazano na możliwość przenikania kadmu z przewodu pokarmowego do komórek gruczołów jelita środkowego oraz hemolimfy, gdzie pierwiastek ten wywierał efekt genotoksyczny (Stalmach i in., 2015a). Podobne działanie wykazano także u pająka nie budującego sieci *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) w odniesieniu do takich czynników stresogennych jak pestycydy fosforoorganiczne czy głodzenie (Wilczek i in., 2016).

Nie można wykluczyć, że metale pobrane wraz z pokarmem mogą docierać także do innych narządów, w tym gruczołów przędnych i oddziaływać (bezpośrednio lub pośrednio) na jakość produkowanych włókien przędzy pajęczej. W odniesieniu do tej grupy drapieżnych bezkręgowców wiedza na temat oddziaływania nanocząstek metali na komórki gruczołów przędnych oraz jakość przędzy jest niewielka. Z ekotoksykologicznego punktu widzenia sieci pajęczęce rozpatrywane były głównie jako skuteczne i dostępne narzędzie do monitorowania zanieczyszczenia środowiska metalami ciężkimi (Hose i in., 2002; Xiao-li i in., 2006; Ayedun i in., 2013). W takim ujęciu uwzględniano jednak tylko metale, które pochodziły z pyłu osadzającego się na powierzchni sieci. Nieliczne są także badania efektów powierzchniowego oddziaływania metali na włókna sieci pajęczej w warunkach *in vitro*. Wykorzystując natywny jedwab pozyskiwany od pająków z rodzaju *Pholcus sp.* wykazano, że materiał ten ze względu na bogatą strukturę białek może służyć jako skuteczny biosorbent dla wybranych jonów metali (Pelit i in., 2011). Głównie z badań na kręgowcach wynika, że metale dostają się do komórek na drodze dyfuzji prostej i przy udziale układów transportujących metale biogenne (Bridges i Zalups, 2005; Martelli i in., 2006), gdzie łatwo wiążą się z białkami występującymi zarówno w cytozolu, jak i w jądrze komórkowym oraz błonach mitochondrialnych (Bertin i Averbek, 2006). Jednak czy i w jakim stopniu możliwe jest wiązanie metali, zwłaszcza w formie nanocząstek przez białka jedwabiu pajęczego w warunkach *in vivo* wymaga badań, podobnie jak konieczne jest rozpoznanie mechanizmów pobierania/oddziaływania tego typu form metali na komórki gruczołów przędnych.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Pająki jako obligatoryjne drapieżniki, stanowią ważny element łańcuchów pokarmowych w ekosystemach lądowych, a jako makrokoncentratory metali (Dallinger, 1993) są także w większym stopniu niż inne organizmy narażone na toksyczne działanie pierwiastków. Dotychczasowe analizy zawartości metali w tkankach pajaków odnoszą się jednak wyłącznie do form cząsteczkowych związków metali. Brak jest danych na temat kumulacji i komórkowych efektów nanocząstek metali (w tym nanosrebra) u tych bezkręgowców.

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie, czy i do jakiego stopnia srebro w postaci AgNO_3 oraz w dwóch różnych formach nanometrycznych (PVP–AgNPs – nanosrebro w osnowie poliwinylpirolidonu i AgNPs – nanosrebro koloidalne ultraczyste jonowe), podawane pająkom *Steatoda grossa* (Theridiidae) w uproszczonym modelu łańcucha pokarmowego (pożywka suplementowana różnymi formami srebra → muchy *Drosophila hydei* → pająk), mogą powodować efekty cytotoksyczne w wybranych narządach lub tkankach (gruczoły przedne, gruczoły jelita środkowego, hemolimfa) oraz modyfikować właściwości fizykochemiczne przędzy łownej. Prowadzenie badań w aspekcie krótko– i długoterminowej intoksykacji pozwoliło, także ocenić stopień zmian degeneracyjnych w wymienionych narządach.

Zasadniczym celem pracy było:

1. Sprawdzenie, czy i w jakim stopniu wybrane formy srebra podawane wraz z pokarmem, zmieniają parametry antyoksydacyjne w hemolimfie, gruczole jelita środkowego oraz w ampułkowatych gruczołach przednych pająka w zależności od czasu ekspozycji.
2. Zbadanie, czy i w jakim stopniu obecność zastosowanych form metalu w diecie powoduje wystąpienie zmian cytotoksycznych w tkankach analizowanych narządów w zależności od zadanego czasu ekspozycji.
3. Ocena właściwości fizykochemicznych przędzy łownej samic analizowanego gatunku pająka w zależności od zastosowanej formy srebra i czasu narażenia.
4. Porównanie poziomu białek metalotioneinopodobnych w badanych tkankach w warunkach krótko– i długoterminowej ekspozycji na wybrane formy srebra.

Uwzględniając powyższe cele główne, sformułowano następujące hipotezy badawcze:

H 1.0.: Zmiany cytotoksyczne oraz charakter i stopień nasilenia zmian degeneracyjnych w ultrastrukturze hemocytów, komórek gruczołu jelita środkowego i komórek ampułkowatych gruczołów przędných zależą od zastosowanej formy srebra i zadanego czasu ekspozycji.

H 1.1.: Związki srebra w zastosowanych stężeniach, zarówno w formie jonowej, jak i nanocząstek, w podobnym stopniu wywołują zmiany cytotoksyczne oraz modyfikują ultrastrukturę analizowanych komórek, w kolejnych czasach ekspozycji.

H 2.0.: Niezależnie od czasu ekspozycji na subletalne stężenia wybranych form srebra następuje nasilenie reakcji antyoksydacyjnych w tkankach samic pająka *S. grossa*, Oznacza to, że forma metalu nie różnicuje stopnia zmian analizowanych wskaźników stresu oksydacyjnego.

H 2.1.: Sprawność obrony antyoksydacyjnej w komórkach hemolimfy, gruczołów jelita środkowego i ampułkowatych gruczołów przędných ulega osłabieniu wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji na metal, a skala zmian wielkości analizowanych wskaźników jest zależna od formy metalu.

H 2.2.: Poziom wskaźników antyoksydacyjnych w hemolimfie, gruczołach jelita środkowego i ampułkowatych gruczołach przędných nie zmienia się wskazując, że niezależnie od czasu ekspozycji, subletalne stężenia zastosowanych form srebra są dobrze tolerowane przez organizm i nie wykazują działania prooksydacyjnego.

H 3.0.: Ekspozycja na wybrane formy srebra nie skutkuje zmianą właściwości fizykochemicznych sieci łożnych samic pająka *S. grossa*, w zastosowanych czasach intoksykacji.

H 3.1.: Właściwości fizykochemiczne sieci łożnych pająka *S. grossa* ulegają zmianie, zależnie od zastosowanej formy srebra i zadanego czasu ekspozycji.

H 4.0.: Zdolność pająków do produkcji białek metalotioneinopodobnych w warunkach krótko- i długotrwałej ekspozycji na wybrane formy srebra jest podobna we wszystkich grupach badawczych.

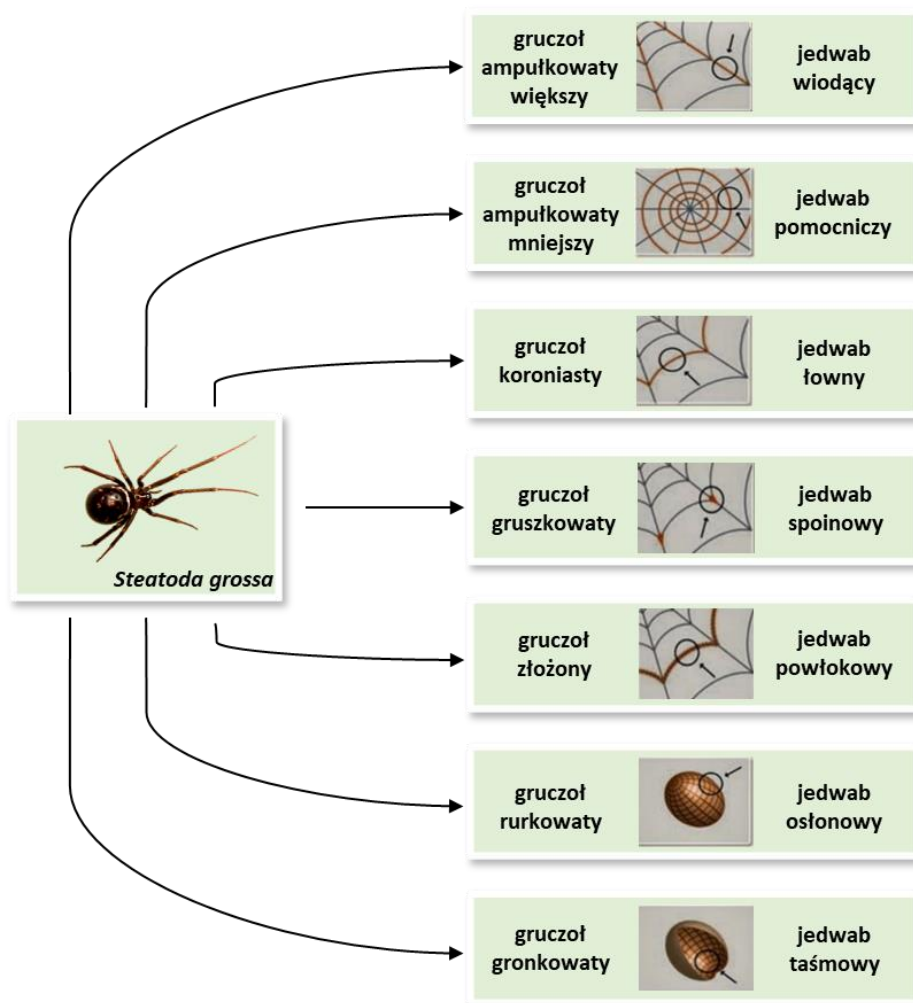
H 4.1.: Czas ekspozycji i forma metalu różnicuje stopień nasilenia produkcji białek metalotioneinopodobnych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Charakterystyka gatunku

Steatoda grossa (C. L. Koch, 1838) jest gatunkiem pająka z rodziny omatnikowatych (Theridiidae). Przez swoje morfologiczne podobieństwo do rodzaju *Latrodectus spp.* jest często określany nazwą „fałszywa czarna wdowa” (ang. false black widow) (Graudins i in., 2002; Richard i in., 2018). Jad pająków tego gatunku zawiera również α -latrotoksynę, ale w mniej niebezpiecznej formie niż u *Latrodectus spp.* Ukąszenie przez *S. grossa* może być przez to dotkliwe, ale nie jest tak zagrażające, jak ukąszenie czarnej wdowy (Graudins i in., 2002; Vetter, 2017; Richard i in., 2018). *S. grossa* jest gatunkiem kosmopolitycznym i synantropijnym, przez co występuje w bardzo szerokim zasięgu geograficznym, obejmującym różne strefy klimatyczne i ekologiczne. Osobniki najczęściej można spotkać w najbliższym otoczeniu człowieka, lecz w odosobnionych, spokojnych miejscach takich jak piwnice, przestrzenie między szafami, stopy drewna, pod skałami i mostami.

Podobnie jak inni przedstawiciele rodziny Theridiidae, pająki tego gatunku, budują silnie splecione, trójwymiarowe i nieregularne sieci łowne przymocowane do podłoża za pomocą lepkich nici, które zawierają u podstawy lepkie krople, co umożliwia im łapanie ofiar, którymi są głównie owady oraz inne gatunki pająków (Benjamin i Zschoke, 2002). U samic *S. grossa* w wytwarzaniu jedwabiu bierze udział kilka typów gruczołów przędných: gruczoły ampułkowate większe, ampułkowate mniejsze, gruczoły koroniaste, gruszkowate, złożone, rurkowate i gronkowate, podczas gdy u samców nie występują gruczoły rurkowate i gronkowate. Każdy typ gruczołu wytwarza jedwab o właściwościach odpowiednich dla jego specyficznej funkcji (Moon i An, 2006; Correa–Garhwal i in., 2017) (Ryc. 3.1.).



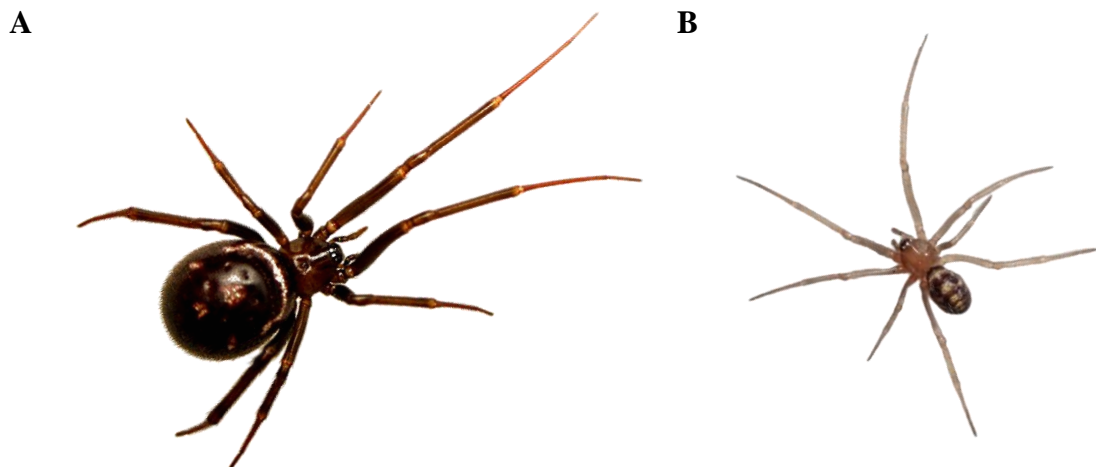
Ryc. 3.1. Rodzaje jedwabiu pajęczego produkowane przez samice *S. grossa* (na podstawie: Römer i Scheibel, 2008).

Omawiany gatunek charakteryzuje całoroczny okres reprodukcyjny, dlatego zarówno osobniki dorosłe, jak i młodociane można spotkać w tym samym czasie, niezależnie od pory roku. Dymorfizm płciowy u tego gatunku jest bardzo wyraźny. Samice, które osiągnęły dojrzałość płciową (Fot. 3.1 A) są znacznie większe niż samce (Fot. 3.1 B). Długość ich ciała mieści się w zakresie od 6 – 11 mm (bez odnóży), a masa od 88 – 160 mg¹. Odwłok stanowi około 80% ciała dorosłej samicy i przybiera barwę oleiście czarną lub ciemnobrązową z jasnoszarym, wąskim, księżycowatym wzorem w jego górnej części (niektóre osobniki mogą nie posiadać wzoru na odwłoku). Głowotułów jest znacznie mniejszy i jednolicie ubarwiony w kolorze podobnym do opistosomy. Dorosła samica w sprzyjających warunkach może żyć aż 5 lat, a po zapłodnieniu złożyć od 5 do 6 kokonów, w których jest średnio 90 jaj. Dojrzałe płciowo

¹ Masa pajaków może ulegać zmianie w zależności od dostępności pokarmu, stopnia nawodnienia organizmu oraz gotowości do rozrodu.

Samce są dużo mniejsze i smuklejsze od samic, osiągając rozmiary od 4 – 7 mm (bez odnóży) i masę od 12 – 39 mg. Odwłok i głowotułów mają zbliżone rozmiary oraz są jednolicie ubarwione. Zazwyczaj są ciemnobrązowe, a na odwłoku w części grzbietowej posiadają wyraźny kremowy wzór. Odnóża samców są natomiast jasnobrązowe lub żółtawe. W odróżnieniu od samic, samce żyją krótko, około 1,5 – 2 lat. Różnica ta wynika z tego, że po osiągnięciu dojrzałości płciowej niektóre osobniki mogą przestać żerować, koncentrując się głównie na znalezieniu partnerki i zazwyczaj po kopulacji giną, najczęściej zostając zjedzone przez samice (Hann, 1994; obserwacje własne autora).

Cykl rozwojowy pająków z gatunku *S. grossa* trwa około sześciu miesięcy od opuszczenia młodych z osłon jajowych do osiągnięcia dojrzałości płciowej. Pająki te przechodzą 7 – 8 wylinek. Rozwój jaj od momentu złożenia kokonu do chwili opuszczenia kokonu przez formy larwalne, trwa około 30 dni, przy czym pierwsze stadium rozwojowe pozostaje przez około 7 do 14 dni w jego wnętrzu, gdzie następuje pierwsza wylinka. Po opuszczeniu oprzędu formy larwalne przez jakiś czas żyją w grupie i są tolerowane przez samice, które dopuszczają je do złapanej ofiary. Osobniki młodociane mogą też wspólnie polować i grupowo zjadać ofiarę, co może być uznawane za przejaw zachowań społecznych. Jednak im pająki są starsze, tym częściej zaczynają wykazywać coraz wyraźniejsze zachowania kanibalistyczne (Khandelwal i Sharma, 2013; obserwacje własne autora).



Fot. 3.1. *Steatoda grossa* (C. L. Koch, 1838): A – dojrzała płciowo samica; B – dojrzały płciowo samiec (fotografie własne autora).

3.2. Warunki hodowli

Hodowla pajaków *S. grossa* prowadzona jest w Laboratorium Hodowli Pajaków Instytutu Biologii, Biotechnologii i Ochrony Środowiska, Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach nieprzerwalnie od 2013 roku. Od tego czasu z powodzeniem uzyskiwane są kolejne stadia rozwojowe badanego gatunku pająka. Osobniki przetrzymywane są w komorach hodowlanych posiadających standardowe warunki oświetlenia (12L:12D), temperatury (L:24 °C, D:18 °C) i wilgotności (70% ± 10%). Takie warunki ułatwiają pająkom osiągnięcie kolejnych stadiów rozwojowych i pozwalają optymalizować długość cyklu reprodukcyjnego. Ze względu na silny kanibalizm poszczególne osobniki są izolowane w plastikowych pojemnikach o wymiarach 10,5 x 8 x 5,5 cm. Każdy pojemnik zaopatrzone jest w drewniany stelaż ułatwiający budowanie sieci łownych oraz ich zbiór do analiz. Samice składają kokony najczęściej na sieci, co ogranicza możliwość ich przemieszczania oraz zmniejsza narażenie na potencjalne rozerwanie. W prawidłowo złożonym kokonie widoczne są białe jaja, które na poszczególnych etapach rozwoju zmieniają kolor i w końcowej fazie stają się czarne, co świadczy o tym, że larwy opuściły już osłonki jajowe i w najbliższym czasie powinny także opuścić oprzęd. Młode pająki bezpośrednio po opuszczeniu kokonu mogą być pozostawiane w grupie przez kilka dni, ponieważ ich szczękoczułki są jeszcze słabo rozwinięte, co wyklucza wzajemne ataki i przeciwdziała kanibalizmowi. Następnie młode osobniki przenoszone są, po 3 – 4 sztuki, do osobnych, mniejszych pojemników, co ułatwia im polowanie i żerowanie, a także sprzyja wyselekcjonowaniu osobnika, który jako najsilniejszy ma potencjalnie największe szanse na osiągnięcie dojrzałości płciowej. Po przejściu 4 – 5 wylinek pająki są izolowane do większych pojemników i w nich hodowane, aż do osiągnięcia dojrzałości płciowej.

Pająki karmiono dwa razy w tygodniu, w 3 dniowych odstępach, co pokrywało ich zapotrzebowanie energetyczne. Skład jakościowy diety zależny był od wieku pajaków i dostosowany do ich rozmiarów. Stadia larwalne bezpośrednio po opuszczeniu kokonu zwykle nie żerują, co jest prawdopodobnie związane z tym, że wykorzystują jeszcze zgromadzone zapasy żółtka. Kiedy zaczynają żerować (około dwa tygodnie później) ze względu na swoje małe rozmiary (1 – 1,5 mm) otrzymują muchy *Drosophila melanogaster*. Kolejne stadia rozwojowe karmione są muchami *Drosophila hydei*, a najstarsze osobniki dokarmiane są dodatkowo larwami muchy domowej

*Musca domestica*². Takie zróżnicowanie diety umożliwi optymalny rozwój pajaków, a w konsekwencji utrzymanie hodowli w dobrej kondycji, z dostępem do osobników obu płci w różnych stadiach rozwojowych.

Pająki jako obligatoryjne drapieżniki, wymagają dostarczania im ofiar, dlatego równoległe do hodowli pajaków prowadzono hodowlę much z rodzaju *Drosophila sp.* dostosowane do wieku poszczególnych stadiów rozwojowych. Wnętrza pojemników hodowlanych dla pajaków regularnie zwilżano wodą, w celu utrzymania odpowiedniej wilgotności otoczenia.

3.3. Charakterystyka grup doświadczalnych

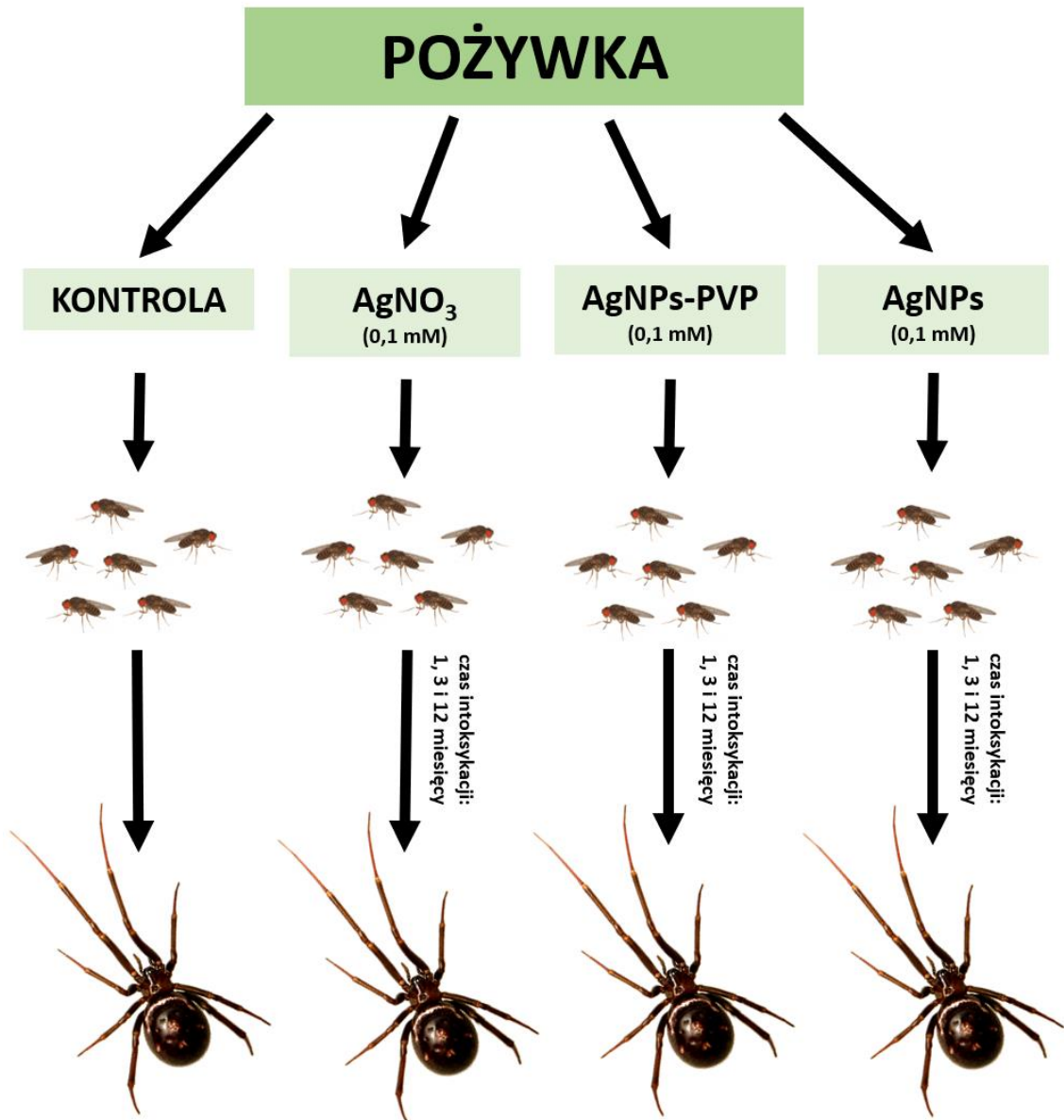
W niniejszej pracy samice *S. grossa* eksponowano na subletalne stężenia wybranych form srebra, które podawano drogą pokarmową w ciele ofiar (*D. hydei*). W badaniach zastosowano komercyjnie dostępny azotan srebra (AgNO_3) (POCH S.A. Gliwice, Polska) oraz dwie formy nanocząstek srebra:

- nanosrebro koloidalne ultraczyste jonowe (AgNPs) (NTW Wrocław, Polska) o średnicy cząstek 20 ± 5 nm,
- nanosrebro w osnowie poliwinylpirolidonu (AgNPs–PVP) (SliverCon, Polska) o średnicy cząstek 60 ± 5 nm.

W celu przeprowadzenia eksperymentu, zaprojektowano prosty model łańcucha pokarmowego, w którego skład wchodziły: pożywka nieskażona (kontrola) lub skażona srebrem w różnych formach: AgNO_3 , AgNPs, PVP–AgNPs \rightarrow *D. hydei* \rightarrow dorosłe samice *S. grossa*. Ekspozycja na wybrane formy srebra podawane drogą pokarmową trwała 1, 3 i 12 miesięcy. Wcześniej uzyskane wyniki badań obrazujące poziom zanieczyszczeń środowiska oraz efekt ekspozycji organizmów na nanosrebro, pozwoliły ustalić takie stężenie zastosowanych form tego metalu, które było wystarczające do wywołania wykrywalnego stężenia srebra w ciele osobników, lecz nie zwiększało śmiertelności pajaków oraz ich ofiar (Demir i in., 2011; Ávalos i in., 2015; Alaraby i in., 2019). Wszystkie z badanych form srebra stosowano w stężeniu 0,1 mM, osiągając wyżej wymienione warunki. Pająki z grupy kontrolnej karmiono muchami *D. hydei* hodowanymi na standardowej, niezanieczyszczonej pożywce (Shukla i in. 2011). Niezależnie od grupy doświadczalnej pająki miały nieograniczony dostęp do wody.

² Larwy much dostępne z hodowli komercyjnych.

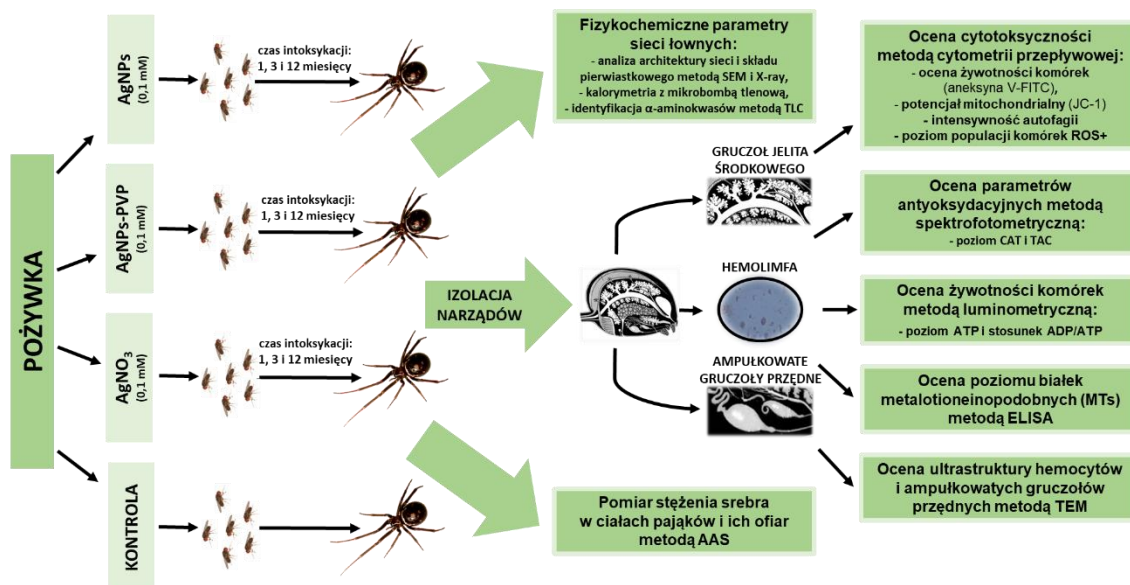
Wszystkie wyróżnione grupy badawcze przedstawiono na poniższym schemacie (Ryc. 3.2.).



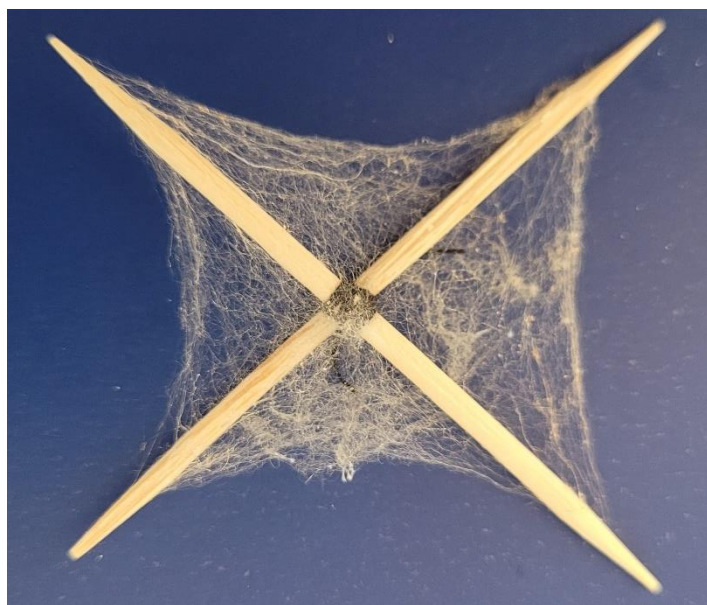
Ryc. 3.2. Schemat łańcucha pokarmowego zastosowanego w badaniach

W niniejszej pracy materiał badawczy wykorzystywany do analiz stanowiła hemolimfa, gruczoł jelita środkowego, ampułkowate gruczoły przędnice oraz sieci łowne pozyskiwane od samic pająka *S. grossa* (Ryc. 3.3.). W celu pobrania tkanek i organów pająka anestezjowano na lodzie, co spowalniało ich ruch i tym samym umożliwiało sprawne pobranie materiału. Hemolimfę pobierano w miejscu połączenia odnóży z głowotułowiem, przez nacięcie. Gruczoł jelita środkowego oraz ampułkowate gruczoły przędnice pobierano z opistosomy. Bezpośrednio po pobraniu, tkanki zawieszano

w buforze PBS (pH 7,4). Sieci zostały zebrane z drewnianych stelaży, umieszczonych w pojemnikach hodowlanych, które samice wykorzystywały jako podpory dla swoich pułapek łownych (Fot. 3.2.).



Ryc. 3.3. Schemat obrazujący materiał biologiczny wykorzystywany w badaniach oraz oceniane parametry.



Fot. 3.2. Stelaż użyty do zbioru sieci łownych.

3.4. Analizy wybranych parametrów komórkowych, fizykochemicznych właściwości przędzy łownej oraz poziomu metalu w ciele badanego gatunku pająka

W odpowiednio przygotowanym materiale wykonywane zostały analizy następujących parametrów (Tab. 3.1.):

Tabela 3.1. Analizowane parametry i stosowane techniki/metody

Parametr	Metoda/ technika
Stężenie srebra w ciałach pajaków i ich ofiar	Absorpcyjna spektrometria atomowa (AAS)
Parametry stresu oksydacyjnego: CAT, TAC	Spektrofotometria, cytometria przepływowa
Ilościowa ocena komórek autofagicznych, apoptotycznych i nekrotycznych	Cytometria przepływowa
Ilościowa ocena komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami	Cytometria przepływowa
Stosunek ADP/ATP i stężenie ATP	Luminometria
Ilościowa ocena białek metalotioneinopodobnych (MTs)	Test immunoenzymatyczny (ELISA)
Ocena ultrastruktury hemocytów i ampułkowatych gruczołów przędnych	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)
Ilościowa i jakościowa ocena składu aminokwasów w przędzy łownej	Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (TLC) z densytometrią
Ocena architektury sieci	Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)
Analiza składu pierwiastkowego sieci łownych	Analiza rentgenowska z dyspersją energii (EDX)
Ocena kaloryczności sieci łownych	Kalorymetria z mikrobombą tlenową typu MBC-3

CAT– katalaza; TAC – całkowita pojemność antyoksydacyjna

3.4.1. Pomiar stężenia srebra w ciałach pajaków oraz ich ofiar

Analizę stężenia srebra w materiale biologicznym przeprowadzono techniką absorpcyjnej spektrometrii atomowej (AAS). Do przygotowania próbek wykorzystano całe ciała pajaków (2–3 osobniki na próbę) oraz ich ofiary – muchy *Drosophila hydei* (~120 much na próbę).

Przygotowane próby najpierw dokładnie wysuszono i zważono, a następnie poddano mineralizacji w kwasie azotowym (ok. 65%, Suprapur, Merck KgaA Darmstadt, Niemcy). Ten etap procedury składał się z dwóch faz. Na początku odważone próby zalewano kwasem azotowym i pozostawiano do maceracji na 12 h w temperaturze pokojowej, następnie próby mineralizowano w temperaturze 150 °C do uzyskania klarownego roztworu. Zmineralizowane próby studzono i uzupełniano wodą

redestylowaną do objętości 2 ml. Pomiary wykonano z wykorzystaniem absorpcyjnego spektrometru atomowego Solaar Unicam 939. Stężenie metalu obliczano w oparciu o standardy firmy Merck. Dokładność oznaczeń kontrolowano w oparciu o wzorzec, jakim była wątroba bydlęca BRC-185 (IRMM, Geel, Belgia). Stężenia metali wyrażono jako $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ suchej masy.

3.4.2. Parametry stresu oksydacyjnego

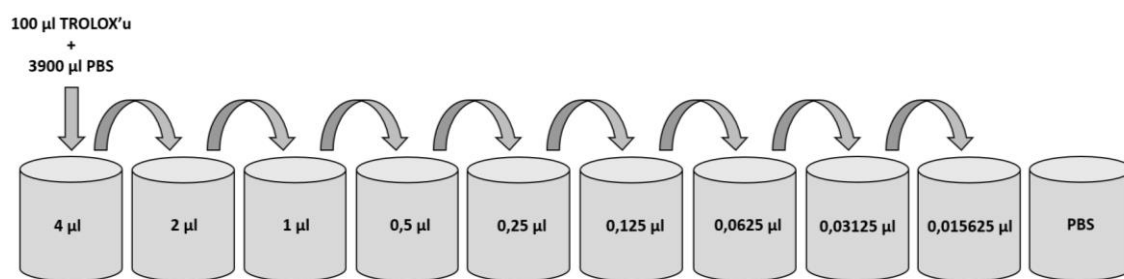
3.4.2.1. Katalaza (CAT; EC 1.11.1.6)

Aktywność katalazy oznaczano w hemolimfie, gruczole jelita środkowego oraz w ampułkowatych gruczołach przednich metodą opracowaną przez Orra (1970), w której wykorzystuje się zjawisko katalitycznego rozkładu nadtlenu wodoru przez enzym. Do oznaczenia aktywności CAT użyto 50 μl 0,05 M buforu fosforanowego ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--KH}_2\text{PO}_4$) o pH 7,4, zawierającego 10 mM H_2O_2 (30%, Sigma). Reakcję inicjowano przez dodanie 100 μl próby przygotowanej przez zawieszenie 5 μl wyjściowego homogenatu w 495 μl 0,05 M buforu Sörensena o pH 7,4. Pomiaru dokonywano wobec próby ślepej (woda zamiast H_2O_2), przy długości fali $\lambda=230$ nm w spektrofotometrze Tecan Infinite® R200. Jednorazowo pomiar trwał 30 sekund w miarę obniżania się ekstynkcji. Aktywność enzymu obliczano używając wartości molowego współczynnika ekstynkcji $40 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ i wyrażano $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka (Orr, 1970).

3.4.2.2. Pomiar całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC)

Całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC – Total Antioxidant Capacity) oceniana była z wykorzystaniem reakcji redukcji kationowych rodników ABTS^+ pochodzących z ABTS (2,2-azynobis (3etylobenzotiazolino-6-sulfonian)). Rodnik ABTS^+ przygotowano według metody Re i in. (1999). W tym celu w 19,5 mg ABTS oraz 3,3 mg nadsiarczanu potasu ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) rozpuszczono w 7 ml 0,1 M buforu sodowo-fosforanowego o pH 7,4. Roztwór pozostawiono w ciemności, w temperaturze pokojowej na 16 h. Następnie roztwór rozcieńczono czterokrotnie i do czasu oznaczeń przetrzymywano w temperaturze -20 °C. Oznaczenia TAC zostały przeprowadzone w 96-dołkowych płytkach polistyrenowych przy wykorzystaniu czytnika TECAN Infinite® M200. Do każdego dołka płytki dodawano 10 μl odpowiednio rozcieńczonej próby (hemolimfy, gruczołu jelita środkowego i ampułkowatych gruczołów przednich) oraz 90 μl roztworu rodnika ABTS^+ . Przygotowaną mieszaninę inkubowano przez

5 minut w ciemności w temperaturze pokojowej, po tym czasie wykonano pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda=734$ nm. Wyniki odczytywano z niezależnie sporządzonej krzywej wzorcowej dla troloxu (97%, Sigma, Aldrich) (analog witaminy E). W tym celu przygotowano 16 μM alkoholowy roztwór troloxu, a następnie sporządzono szereg rozcieńczeń, przez dodanie do 3900 μl PBS 100 μl roztworu wyjściowego, otrzymując roztwór o stężeniu 4 μM . Kolejne stężenia otrzymywano według poniższego schematu (Ryc. 3.4.). Jako próbę ślepą wykorzystano bufor PBS. Pojemność przeciwutleniającą prób wyrażono w postaci ekwiwalentu potencjału antyoksydacyjnego troloxu (analogu tokoferolu rozpuszczalnego w wodzie) – TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) w reakcji z rodnikiem ABTS^+ i wyrażano w $\mu\text{M} \cdot \text{mg białka}^{-1}$ (Re i wsp., 1999).



Ryc. 3.4. Schemat przygotowywania krzywej wzorcowej wykorzystywanej do obliczenia całkowitej pojemności antyoksydacyjnej badanych prób.

3.4.3. Ocena żywotności komórek w wybranych narządach

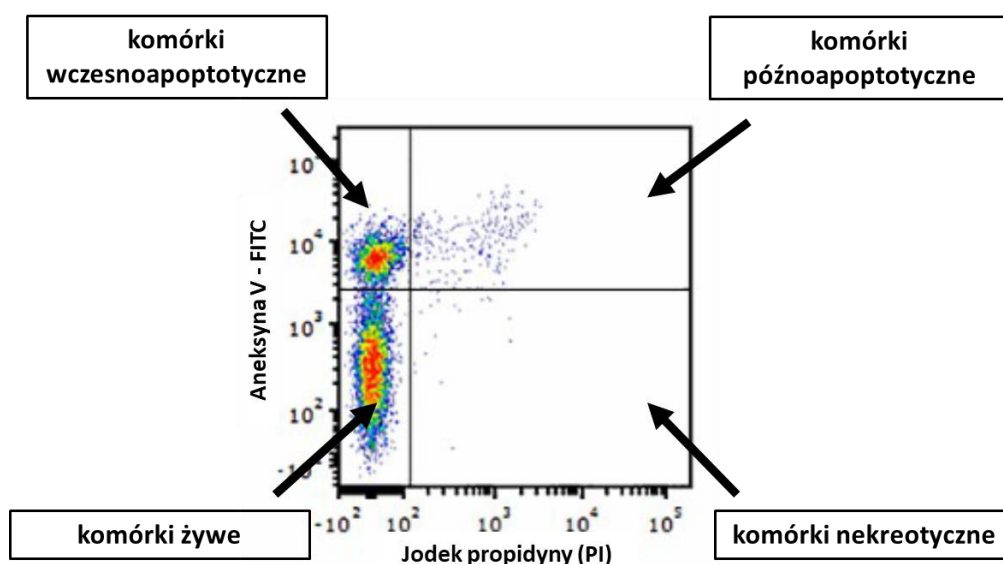
3.4.3.1. Pomiar poziomu komórek apoptotycznych i nekrotycznych

Ilościowej oceny komórek apoptotycznych i nekrotycznych w hemolimfie, gruczole jelita środkowego oraz w ampułkowatych gruczołach przędnym badanych pajaków dokonano przy użyciu testu z aneksyną V (Annexin V–FITC Apoptosis Detection Kit ab14085, Abcam). W komórkach późnoapoptotycznych, ujemne grupy fosfatydyloseryny (PS) ulegają translokacji ze strony wewnętrznej na powierzchnię zewnętrzną błony komórkowej. Aneksyna V jest białkiem wiążącym fosfolipidy zależnym od jonów wapnia (Ca^{2+}). Posiada duże powinowactwo do PS i wiąże się tylko do komórek posiadających odsłonięty fosfolipid na swojej powierzchni (Wilczek i wsp., 2014). Komórki łączące się z aneksyną V, znakowaną barwnikiem FITC (izotiocyanina fluoresceiny), emitują zieloną fluorescencję. Równoczesne zastosowanie drugiego barwnika PI (jodek propidyny), emitującego czerwoną fluorescencję, pozwala na rozróżnienie komórek nekrotycznych i późnoapoptotycznych

od wczesnoapoptotycznych, z zachowaną integralnością błony komórkowej (Tab. 3.2., Ryc. 3.5.).

Tabela. 3.2. Powinowactwo wiązania się barwników fluorescencyjnych stosowanych w teście do komórek o różnej kondycji fizjologicznej.

barwnik fluorescencyjny	komórki żywe	komórki wczesnoapoptotyczne	komórki późnoapoptotyczne	komórki nekrotyczne
aneksyna V-FITC	-	+	+	-
jodek propidyny (PI)	-	-	+	+



Ryc. 3.5. Przykładowa cytometryczna analiza komórek apoptotycznych i nekrotycznych przy zastosowaniu aneksyny V znakowanej FITC (Aneksyna V-FITC) i jodku propidyny (PI) (Annexin V-FITC kit; Abcam, zmodyfikowane).

W celu przeprowadzenia ilościowej oceny komórek apoptotycznych, do wcześniej przygotowanego materiału składającego się z hemolimfy, gruczołu jelita środkowego i/lub ampułkowatych gruczołów przednich oraz buforu PBS (o łącznej objętości około 210 μ l), dodano 5 μ l aneksyny V-FITC oraz 5 μ l PI. Całość inkubowano przez 15 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. W celu ustalenia zakresu regionu negatywnego przygotowano kontrolę negatywną, którą stanowiła zawiesina komórek z buforem reakcyjnym bez dodatku barwników. Przygotowane w ten sposób próbki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego Beckman Coulter Instrument FC

500 z laserem argonowym, o długości fali 488 nm. Korzystając z programu do analizy danych cytometrycznych CXP Analysis, uzyskano wyniki na podstawie pomiaru poziomu fluorescencji.

3.4.3.2. Ilościowa ocena komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami

Zmiany transmembranowego potencjału mitochondrialnego ($\Delta\Psi_m$) śledzono dzięki zastosowaniu zestawu MitoPT® JC-1 Assay firmy ImmunoChemistry Technologies z barwnikiem kationowym JC-1 (jodek 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraetylo-benzimidazolo-karbocyaninowy), który w zależności od wielkości potencjału mitochondrialnego w różnym stopniu akumuluje się w mitochondriach. Barwnik ten różnicuje komórki z wysokim potencjałem mitochondrialnym, widoczna pomarańczowa fluorescencja (mitochondria spolaryzowane) oraz te z niskim potencjałem mitochondrialnym – zielona fluorescencja (mitochondria zdepolaryzowane) (Wilczek i wsp., 2014). Im wyższy stosunek pomarańczowej do zielonej fluorescencji, tym większa polaryzacja błony mitochondrialnej. W komórkach z niskim $\Delta\Psi_m$, barwnik JC-1 pozostaje w formie monomerycznej, natomiast u tych posiadających wysoki potencjał mitochondrialny tworzy tak zwane „J-agregaty”.

Postępując zgodnie z dołączoną do zestawu procedurą, do zawiesiny komórek dodano 10 μ l 1,5 mM JC-1 i całość inkubowano przez 15 minut w ciemności, w temperaturze pokojowej. Przygotowane w ten sposób próbki analizowano przy użyciu cytometru przepływowego Beckman Coulter Instrument FC 500. Rezultaty przeprowadzonego testu prezentowano jako odsetek komórek ze zdepolaryzowanymi mitochondriami.

3.4.3.3. Autofagia

Autofagię oceniano za pomocą dwóch parametrów: średniej intensywności autofagii i współczynnika indukcji autofagii, uzyskanych metodą cytometrii przepływowej, przy użyciu cytometru przepływowego Muse Cell Analyzer (EMD Millipore Corporation) i zestawu Muse Autophagy LC3-Antibody Based Kit, zgodnie z protokołem producenta. Oznaczenia wykonywano w probówkach typu eppendorf o pojemności 1,5 ml. Komórki zawieszono w buforze PBS odwirowano (300 x g, 5 min, temperatura 4 °C), następnie zlano supernatant i dodano 5 μ l Alexa Fluor oraz 10 μ l 1x Autophagy Reagent B. W kolejnym kroku próbki inkubowano przez 30 min. na lodzie

i po tym czasie poddano je wirowaniu. W następnej kolejności przepłukano próbki 100 μ l buforu i ponownie odwirowano, po czym dodano do nich 100 μ l buforu i przeprowadzono natychmiastowy pomiar. Muse® Autophagy Assay Kit, wykorzystuje przeciwciało monoklonalne anty-LC3 skoniugowane z Alexa Fluor®555, używane do pomiaru i śledzenia poziomów LC3 w komórce.

Dane wygenerowane za pomocą analizatora komórek Muse® Cell Analyzer wraz z odpowiednim modułem oprogramowania Muse® umożliwiają pomiar średniej wartości autofagii (zarówno dla próbek kontrolnych, jak i testowych), współczynnika indukcji autofagii (fluorescencja badanej próbki w stosunku do kontroli) oraz odsetka komórek ze zwiększoną autofagią (próbka testowa vs. kontrola).

3.4.3.4. Stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny poddano ocenie za pomocą kitu Muse® Oxidative Stress Kit, który pozwala na ilościowe pomiary reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach poddawanych stresowi oksydacyjnemu w oparciu o wewnątrzkomórkowe wykrywanie rodników ponadtlenkowych. Badanie pozwoliło określić w analizowanym materiale względny odsetek komórek ROS ujemnych (ROS⁻) i dodatnich (ROS⁺) uzyskanych metodą cytometrii przepływowej przy użyciu analizatora komórek Muse (EMD Millipore Corporation) zgodnie z protokołem producenta. W celu przeprowadzenia ilościowej oceny komórek ROS⁺, do wcześniej przygotowanego w probówkach typu eppendorf materiału składającego się z wybranych tkanek i buforu PBS (o łącznej objętości 20 μ l), dodano 80 μ l odczynnika stresu oksydacyjnego Muse® opartego na dihydroetydynie (DHE), która jest szeroko stosowana do wykrywania reaktywnych form tlenu w populacjach komórkowych. DHE po przejściu do wnętrza komórki w reakcji z anionami ponadtlenkowymi ulega utlenieniu, tworząc wiążący DNA fluorofor, który interkaluje z DNA, powodując czerwoną fluorescencję (Bindokas i in., 1996). Następnie analizowany materiał poddano inkubacji w temperaturze 37 °C przez 30 minut, po czym dokładnie wymieszano i przeprowadzono odczyt. W badaniu wyróżniono dwie populacje komórek: ROS⁻ – żywe komórki i ROS⁺ – komórki wykazujące cechy stresu oksydacyjnego.

3.4.3.5. ATP, ATP/ADP

Stosunek ADP do ATP mierzono przy użyciu kitu ApoSENSORTM ADP/ATP Ratio Assay Kit (BioVision), który bazuje na wykrywaniu różnic w bioluminescencji zależnie od poziomu ADP i ATP. Zmiany wartości ADP/ATP służą do jednoczesnego określania i rozróżnienia komórek apoptotycznych, nekrotycznych, z zahamowanym wzrostem oraz tych intensywnie proliferujących (Tab.3.3). Test wykorzystuje enzym lucyferazę, który katalizuje reakcję z lucyferyną i AMP, prowadzącą do emisji światła mierzonego przy użyciu luminometru. Poziom ADP mierzony jest przez jego konwersję do ATP, którą wykrywano przy użyciu tej samej reakcji (Ryc.3.6.).



Ryc.3.6. Reakcja emisji światła z wykorzystaniem enzymu lucyferazy (BioVision, zmienione).

Oznaczenie ADP/ATP w próbkach prowadzono stosując 96-dołkowe mikroplątki polistyrenowe. Do każdego dołka przeznaczonego do pomiaru dodano 100 µl mieszaniny reakcyjnej, składającej się z 10 µl lucyferazy (ATP Monitoring Enzyme) i 90 µl buforu uwalniającego nukleotydy (Nucleotide Releasing Buffer) i odczytano luminescencję tła (Data A). Następnie do odpowiednich dołków dodawano 10 µl supernatantu i po dokładnym wymieszaniu reagentów, po upływie 2 minut, luminometrycznie mierzono intensywność emitowanego światła, wyrażoną we względnych jednostkach świetlnych RLU (Relative Light Units) (Data B). Aby określić poziom ADP w komórkach, po upływie 10 minut, powtórzono mierzenie próbek (Data C), po czym dodano 1 µl enzymu konwertującego ADP (ADP Converting Enzyme). Po upływie 2 minut, ponownie luminometrycznie mierzono intensywność emitowanego światła (Data D). Wielkość ADP/ATP wyznaczono w oparciu o wzór :

$$\frac{\text{Data D} - \text{Data C}}{\text{Data B} - \text{Data A}}$$

Tab.3.3. Interpretacja wyników analizy dołączona przez producenta zestawu (BioVision, zmienione).

Los komórek	Poziom ADP	Poziom ATP	ADP/ATP
Proliferacja	bardzo niski	wysoki	bardzo niski
zahamowanie wzrostu	Niski	nieznacznie wzrasta	Niski
Apoptoza	Wysoki	niski	Wysoki
Nekroza	znacznie wyższy	bardzo niski	z wyższy

Można przyjąć, że gdy stosunek ADP/ATP przyjmuje wartości poniżej 0,1 świadczy to o przewadze procesów proliferacji, którym sprzyja wysokie stężenie ATP; wartości 0,1 – 1, wskazują na zmiany apoptotyczne, tym większe im wyższa wartość wskaźnika. Wartości powyżej 1 świadczą o wyczerpaniu zapasów ATP i rozwijających się procesach nekrotycznych (Nentwig, 2013).

Stężenie ATP mierzono przy użyciu kitu ApoSENSOR™ Cell Viability Assay Kit (BioVision), którego mechanizm działania opiera się na tej samej reakcji, którą opisano wyżej. Oznaczenie stężenia ATP w badanych próbach prowadzono stosując mikro płytki 96-dołkowe. Do odpowiednich dołków podawano 10 µl supernatantu, 100 µl buforu uwalniającego nukleotyd (Nucleotide Releasing Buffer) i 10 µl lucyferazy (ATP Monitoring Enzyme). Po dokładnym wymieszaniu reagentów, po upływie 1–2 minut, luminometrycznie mierzono intensywność emitowanego światła wyrażoną we względnych jednostkach świetlnych RLU (Relative Light Units). Dla każdej serii pomiarów sporządzano niezależną krzywą wzorcową, uwzględniającą intensywność wydzielonych kwantów światła dla serii rozcieńczeń czystego ATP (m.cz. 551) w zakresie $1,8 \cdot 10^{-3}$ – $1,8 \cdot 10^{-10}$ mmola. Stężenie ATP w badanych próbach wyrażono w jednostce nmol · mg⁻¹ białka.

3.4.4. Ilościowa ocena metalotionein metodą immunoenzymatyczną ELISA

W celu ilościowego oznaczenia poziomu MT użyto pośredniego testu ELISA (ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), który przeprowadzono według standardowego protokołu (Crowther, 2009), zoptymalizowanego dla analizowanego materiału pajęczego (Babczyńska i in., 2011).

Oznaczenie wykonano na transparentnych, płaskodennych, 96-dołkowych płytkach Corning (Bionovo®), w których umieszczono próbki zawierające 70 µg białka. Ścisłe określone stężenia białka dla każdej próbki dostosowano przez rozcieńczenie supernatantów odpowiednią objętością buforu homogenizacyjnego. Po inkubacji (16h w 4 °C) supernatant usunięto i próbki płukano czterokrotnie po 5 minut roztworem PBS z Tween20 (Polyethylene glycol sorbitan monolaurate 20; Sigma-Aldrich®) (0,1 M; pH 7,4). Płukanie miało na celu zapobiec tworzeniu się niespecyficznego tła reakcji poprzez eliminację pozostałych niezwiązanych przeciwciał (antygenów). W kolejnym etapie dodano bufor blokujący (5% roztwór albuminy bydlęcej w buforze homogenizacyjnym) celem zablokowania niezwiązanych z białkiem miejsc na powierzchni dołków i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 1 godzinę. Płytki

ponownie przepłukano 2-krotnie po 5 minut roztworem Tween-PBS. Następnym krokiem była inkubacja z roztworem przeciwciała I-rzędowego specyficznym dla metalotionein – Metallothionein (UC1MT) mAb produced in mouse (Enzo Life Sciences; 1:1000) przez 2 godziny w temperaturze 37 °C. Ponownie płytki przepłukano roztworem Tween-PBS 4-krotnie po 5 minut. Następnie dodano przeciwciała II-rzędowe specyficzne dla globuliny zwierzęcia, z którego pochodzi przeciwciała I-rzędowe. Przeciwciałem II-rzędowym w przypadku metalotionein było anti-mouse IgG pAb (Enzo Life Sciences; 1:1000). Przeciwciała drugorzędowe sprzężone jest z fosfatazą alkaliczną, która po dodaniu odpowiedniego substratu katalizuje reakcję barwną. Po godzinnej inkubacji w temperaturze 37 °C ponownie przepłukano płytkę 4-krotnie po 5 minut roztworem Tween-PBS. Ostatnim etapem było dodanie substratu fosfatazy: pNpp (p-nitrophenyl phosphate, Termo Fisher Scientific, USA) w 10 mM buforze dietanoloaminowym (MgCl₂, woda dejonizowana, dietanoloamin; pH 9,5) oraz inkubacja w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po upływie tego czasu intensywność zabarwienia mierzono w czytniku mikroplatek przy $\lambda=405$ nm z wykorzystaniem spektrofotometru UV-Vis (TECAN Infinite M200, Austria).

Taką samą procedurę oznaczenia zastosowano dla serii roztworów metalotioneiny wzorcowej (metallothionein-1H; FL-61; Santa Cruz Biotechnology). Poziom MTs oszacowano na podstawie krzywej wzorcowej i wyrażono jako procent (%) białka całkowitego. Całkowite stężenie białka w próbkach oznaczono metodą Bradford (1976) stosując jako wzorzec albuminę surowicy bydlęcej (zawartość białka >95%, Fluka).

3.4.5. Pomiar całkowitego stężenia białka

Stężenie białka w próbach mierzono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem metody opracowanej przez Bradford (1976). Metoda ta opiera się na zjawisku wiązania w środowisku kwaśnym cząsteczek barwnika Coomasie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) z białkiem, co powoduje zmianę zabarwienia roztworu z brązowo-czerwonej na niebieską.

Przygotowany wcześniej odczynnik Bradford składający się z: 0,01% CBB G-250; 4,7% etanolu oraz 8,5% kwasu ortofosforowego przed rozpoczęciem oznaczeń należy rozcieńczyć w stosunku 1:4 z wodą destylowaną. Pomiar wykonywano z wykorzystaniem 96-dołkowych mikroplatek Corning (Bionovo®). Do każdego dołka wprowadzano 5 μ l próby, a następnie 250 μ l rozcieńczonego odczynnika Bradford. Tak przygotowaną mieszaninę pozostawiano na 10 minut w ciemności. Po tym czasie

wykonywano pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda=595$ nm, przy użyciu czytnika płytek TECAN Infinite M200.

Stężenie białka obliczano w oparciu o krzywą białkową wykonaną na podstawie szeregu rozcieńczeń wyjściowego roztworu albuminy bydlęcej (BSA), sporządzonego przez rozpuszczenie 10 mg BSA w 10 ml buforu PBS (pH 7,4) (Tab. 3.4.). Wyniki pomiarów stężenia białka wykorzystano do obliczeń aktywności opisanych powyżej enzymów oraz poziomu białek metalotioneinopodobnych.

Tabela 3.4. Szereg rozcieńczeń albuminy bydlęcej (BSA) do krzywej wzorcowej.

BSA [μ l]	–	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
PBS [μ l]	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	–

3.4.6. Mikroskopowa ocena ultrastruktury komórek w wybranych narządach

W celu oceny ultrastruktury hemocytów oraz komórek budujących ampułkowate gruczoły przedne samic pająka *S. grossa*, próby zawierające całe osobniki, utrwalono w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym (PBS) (pH 7,4) w temperaturze 4 °C przez 24 godziny. Po przepłukaniu próbek 0,1 M PBS, materiał został ponownie utrwalony 2% roztworem tlenku osmu (OsO_4) w 0,1 M buforze PBS, przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie próby odwodniono przy użyciu serii wzrastających stężeń etanolu (50%, 70%, 90%, 96% i 100%) w czterokrotnym powtórzeniu, każde po 10 minut w temperaturze pokojowej oraz acetonie (dwukrotne powtórzenie, każde po 10 minut w temperaturze pokojowej). Po odwodnieniu materiał zatopiono w żywicy epoksydowej (Epoxy Embedding Medium Kit; Sigma). Skrawki półcienkie i ultracienkie pocięto na ultramikrotomie Leica ultracut UCT25. Skrawki ultracienkie (50 nm grubości) wybarwiono octanem uranylu i cytrynianem ołowiu. Wybrane próby analizowano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) Hitachi H500.

3.4.7. Ilościowa i jakościowa ocena składu aminokwasów w przędzy łownej metodą chromatografii cienkiej warstwy (TLC) z densyometrią

Ilościową i jakościową ocenę składu aminokwasów w analizowanej przędzy łownej przeprowadzono z zastosowaniem chromatografii cienkiej warstwy (TLC)

i densytometrii. 1 mg próbki oczyszczonych sieci, pochodzące od pajaków z grupy kontrolnej i grup eksponowanych na różne formy srebra, zostały odpowiednio potraktowane 1 ml 6 M kwasu solnego (PPH POCh, Gliwice, Polska) i były inkubowane w temperaturze 110 °C przez 2 do 3 godzin, aż do całkowitego rozpuszczenia i hydrolizy białek i peptydów. Na koniec kwas solny został przynajmniej częściowo usunięty z próbek strumieniem azotu. Roztwory wzorcowe przygotowano przez odważenie ± 1 mg α -aminokwasów: alaniny, glicyny, histydyny i fenyloalaniny do butelek o pojemności 2 ml i rozpuszczono w roztworze woda : metanol 7:3 (v/v) i umieszczono w łaźni ultradźwiękowej przez 15 minut, w temperaturze 40 °C. Chromatografia cienkowarstwowa była prowadzona w komorach chromatograficznych w temperaturze 22 ± 1 °C. Przed analizą komory były nasycone parami fazy ruchomej przez okres 30 min. Hydrolizaty jedwabiu pajęczego zostały naniesione na szklane płytki chromatograficzne pokryte żelazem krzemionkowym (20 cm x 20 cm; Merck, Darmstadt, Niemcy; nr kat. 1.05721) w porcjach po 3 μ l. Jako fazę ruchomą wykorzystano mieszaninę 2-butanol : aceton : kwas octowy : woda, 7:7:2:4 (v/v). Wszystkie analizowane próbki oraz roztwory wzorcowe były aplikowane w odległości 1,5 cm powyżej dolnej krawędzi płytki, 1 cm od lewej i prawej strony płytki oraz w odległości 1 cm od siebie. Chromatogramy wywoływano na odległość 16 cm, a czas wywoływania wynosił ok. 4 godz. Wywołane i wysuszone chromatogramy wizualizowano za pomocą 0,5% roztworu ninhydryny w metanolu i podgrzewano w temperaturze 100–110°C przez ok. 10 min, aby odsłonić charakterystyczne fioletowe plamki aminokwasów na żółtym tle. Zwizualizowane chromatogramy skanowano densytometrycznie przy użyciu densytometru Desaga (Heidelberg, Niemcy) model CD 60 wyposażonego w oprogramowanie ProQuant. Profile stężeń ścieżek rozwojowych zostały zarejestrowane w trybie reflektancji, przy starannie dobranej długości fali $\lambda=500$ nm i przy użyciu geometrii prostokątnej wiązki światła równej 0,2 mm \times 1,0 mm. Uzyskane wyniki dodatkowo rejestrowano aparatem cyfrowym.

3.4.8. Ocena architektury sieci metodą skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM)

Badania materiału przeprowadzono przy użyciu wysokorozdzielczego skaningowego mikroskopu elektronowego z zimną emisją polową UHR FE-SEM Hitachi SU 8010 z mikrosondą rentgenowską EDX oraz systemem mrozącym. Umożliwiło to

jednoczesne badanie zarówno właściwości strukturalnych, jak i fizykochemicznych przędzy pajęczej w zależności od rodzaju stosowanego stresora. Zastosowanie techniki SEM, umożliwiło szczegółową analizę struktury włókien na poziomie mikro- i nanometrycznym. Analizie poddane zostały następujące elementy sieci: układ i rozmieszczenie włókien – wzór struktury przestrzennej pajęczyny, typy morfologiczne włókien i częstość ich występowania – włókna pojedyncze, podwójne i wielokrotne wraz z pomiarem ich średnicy.

Etapy przygotowania materiału do badań SEM były następujące:

- wybranie reprezentatywnych próbek przędzy pajęczej,
- umieszczenie badanych próbek pajęczyny (przy pomocy binokularu) na aluminiowych stolikach mikroskopowych, pokrytych adhezyjną taśmą węglową,
- napylenie próbki warstwą przewodzącą (złotem technicznym) o grubości 15 nm w napylarce próżniowej Safematic CCU-010 HV (Safematic GmbH),
- obrazowanie mikrostruktury włókien przędzy pajęczej w warunkach regulowanej próżni, wykorzystując sygnały elektronów wtórnych (kontrast topograficzny próbki), wstecznie rozproszonych (kontrast kompozycyjny) i transmisyjnych badanej próbki przy napięciu przyspieszającym 10 kV,
- identyfikacja jakościowa i ilościowa pierwiastków w mikroobszarach próbki przędzy pajęczej (analizy punktowe, liniowe, rozkład powierzchniowy pierwiastków) wykorzystując metodę SEM-EDX z zastosowaniem spektrometra rentgenowskiego z dyspersją energii (EDS) NORAN System 7 (Thermo Fisher Scientific), w pełni zintegrowanego mikroskopem.

3.4.9. Kalorymetria

Energię próbek mierzono w kalorymetrze z mikrobombą tlenową typu MBC-3 (Wilczek i in., 2017; Wilczek i in., 2018), wyposażonym w oprogramowanie digitalizujące sygnały elektryczne z termopar. Próbki zawierały od 1 do 6 pojedynczych sieci utkanych przez samice *S. grossa*. Nici zostały umieszczone w zważonej, małej platynowej kapsule, a następnie ponownie zważone z dokładnością do 0,1 mg i połączone drutem stalowym z elektrodami mikrobomby. Całkowite spalanie nastąpiło poprzez zapłon pod wysokim ciśnieniem tlenu (2,8 MPa). Ciepło uwalniane z próbki rejestrowano cyfrowo w wysokiej rozdzielczości, a wartość kaloryczną obliczano w $\text{J}\cdot\text{mg}^{-1}$ suchej

masy w stosunku do krzywej kalibracji. Kalorymetr został skalibrowany kwasem benzoesowym, jako wzorcem termochemicznym, przy użyciu zakresu mas próbek. Po spaleniu platynowe kapsuły zostały wysuszone i ponownie zważona w celu zmierzenia możliwej zawartości popiołu. Pozwoliło to na obliczenie zawartości energii w przeliczeniu na masę materii organicznej w próbce. Wartość opałowa (y) wszystkich próbek została obliczona na podstawie krzywej kalibracji otrzymanej z odpowiednich naważek kwasu benzoesowego.

3.4.10. Analizy statystyczne i prezentacja graficzna wyników

Analizy statystyczne przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica 13.3 (StatSoft Polska). Dla każdego z badanych parametrów policzono statystyki opisowe obejmujące wartości: średniej, odchylenia standardowego, medianę, wartość minimalną, wartość maksymalną oraz kwartyla dolnego (Q25) i górnego (Q75) (Aneks 1). Otrzymane dane w poszczególnych grupach poddano ocenie normalności rozkładu za pomocą testu Shapiro–Wilka oraz Kołomogorowa–Smirnowa z poprawką Lillieforsa. Wartość funkcji testowych (W , d) oraz otrzymane prawdopodobieństwo wskazywały, że w przypadku większości analizowanych parametrów rozkład danych odbiegał od normalnego. W odniesieniu do wybranych parametrów, również test Levene’a, wskazał na niehomogeniczność wariancji w grupach uwzględniających formę metalu, czas ekspozycji na metale oraz rodzaj tkanki. Dla sprawdzenia istotności różnic między grupami w kolejnych punktach czasowych zastosowano test Kruskala–Wallisa oraz test U Manna–Whitney’a dla dwóch prób niezależnych, przyjmując za istotny poziom $p < 0,05$.

W przypadku danych dotyczących stężenia metali w ciałach ofiar i osobników analizowanego gatunku pająka, średnicy włókien jedwabnych oraz kaloryczności sieci potwierdzono zarówno rozkład normalny oraz homogeniczność wariancji w grupach, co upoważniło do zastosowania parametrycznych testów statystycznych. Istotność różnic między grupami w kolejnych punktach czasowych sprawdzano stosując test Tukey’a ($p < 0,05$) dla nierównych liczebności grup oraz test t–Studenta ($p < 0,05$).

Prezentację graficzną wyników przygotowano w postaci wykresów, tablic oraz fotografii. Wykresy wykonano w programie Statistica 13.3.

4. WYNIKI

4.1. Stężenie srebra w ciałach pająków *Steatoda grossa* oraz ich ofiar

Stężenie srebra w ciałach samic pająków po ekspozycji na pokarm suplementowany zastosowanymi formami metalu istotnie wzrastało, w porównaniu do kontroli, wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji. Miesięczna suplementacja pokarmu AgNO_3 , PVP–AgNPs i AgNPs skutkowała odpowiednio 39–krotnym ($p=0,0002$), 21–krotnym ($p=0,0008$) i 25–krotnym ($p=0,0003$) zwiększeniem stężenia srebra w tkankach, w odniesieniu do kontroli. Z kolei trzymiesięczne narażenie samic na działanie wymienionych form srebra spowodowało istotny względem kontroli wzrost stężenia tego metalu w ciele osobników odpowiednio 45–krotny ($p=0,0002$), 28–krotny ($p=0,0002$) i 33–krotny ($p=0,0002$). W przypadku rocznej ekspozycji wykazano 65–krotny ($p=0,0002$) wzrost stężenia srebra w ciele w przypadku AgNO_3 , 43–krotny ($p=0,0002$) po podaniu PVP–AgNPs i 53–krotny ($p=0,0002$) dla AgNPs. Zastosowane formy nanosrebra wykazywały słabszą zdolność do kumulacji srebra w organizmie samic pająka niż AgNO_3 (Tab. 4.1.; Aneks, Tab. A.1. i Tab. A.2.).

Tab. 4.1. Stężenie srebra w ciałach much *Drosophila hydei* oraz samic pająków *Steatoda grossa* eksponowanych na metal w wybranych formach przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b, c) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami otrzymującymi zastosowane związki srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Tukey’a; $p<0,05$; test t–Studenta; $p<0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO_3 , PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Tukeya; $p<0,05$); A, B, C oznaczono różnice istotne statystycznie w wybranych grupach badawczych względem grupy kontrolnej wyłącznie w przypadku *D. hydei* (test Tukey’a; $p<0,05$); n=8–10.

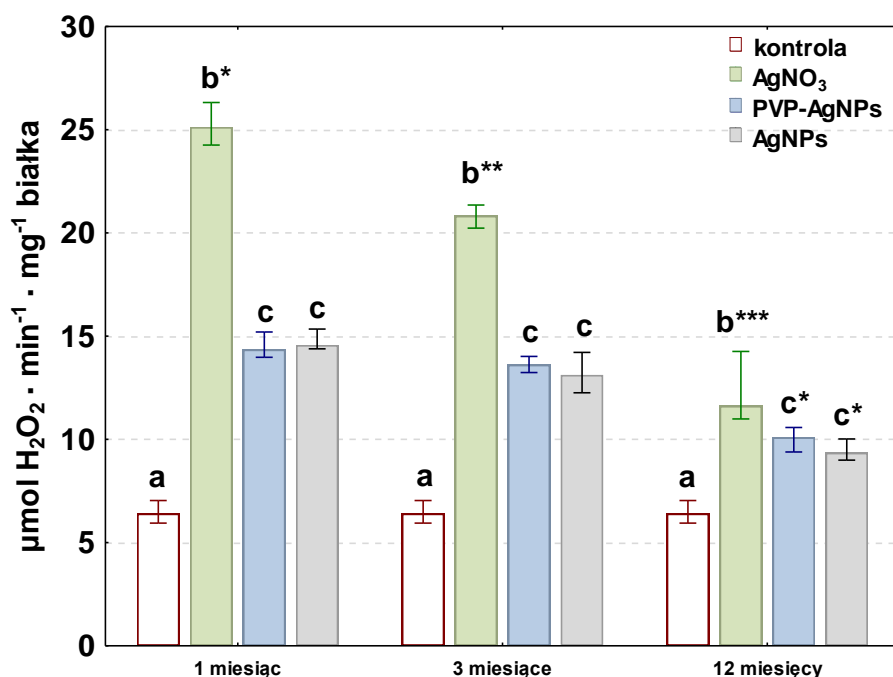
Grupa	<i>Steatoda grossa</i>			<i>D. hydei</i>
	1 miesiąc	3 miesiące	12 miesięcy	
	[$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ suchej masy]			
Kontrola	0,19±0,12 ^a	0,19±0,12 ^a	0,19±0,12 ^a	0,21±0,02 ^A
AgNO₃	7,48±0,98 ^b	8,64±0,70 ^b	12,37±0,96 ^{b*}	2,02±0,41 ^B
PVP–AgNPs	3,99±1,21 ^c	5,27±1,22 ^c	8,63±1,50 ^{c*}	0,954±0,04 ^C
AgNPs	4,72±1,12 ^c	6,23±1,01 ^c	10,07±0,69 ^{c*}	1,38±0,24 ^{BC}

4.2. Poziom wybranych parametrów antyoksydacyjnych w analizowanych tkankach pająka *S. grossa*

4.2.1. Katalaza [CAT; EC 1.11.1.6]

Ekspozycja osobników na zastosowane formy srebra doprowadziła do nasilenia aktywności katalazy w analizowanych narządach względem kontroli. Najwyższą aktywność CAT wykazano w gruczole jelita środkowego. Wśród zastosowanych form srebra, najwyższą aktywność tego enzymu indukował AgNO_3 we wszystkich analizowanych tkankach i interwałach czasowych. W przypadku obu zastosowanych rodzajów nanosrebra aktywność katalazy utrzymywała się na porównywalnym poziomie (Ryc. 4.1., 4.2., 4.3.; Aneks, Tab. A.3.).

W hemolimfie pajaków eksponowanych na AgNO_3 w pokarmie, aktywność katalazy wzrosła prawie 4-, 3- i 2-krotnie kolejno w czasie 1, 3 i 12 miesięcy, względem kontroli. Poziom aktywności CAT w tej tkance różnił się istotnie statystycznie między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy: odpowiednio $p=0,0002$, $p=0,0002$, $p=0,0003$). Z kolei ekspozycja na metal w postaci PVP-AgNPs i AgNPs spowodowała ponad 2-krotny wzrost po 1 i 3 miesiącach ekspozycji, a po 12 miesiącach 1,5-krotny wzrost aktywności tego enzymu względem kontroli (1, 3 i 12 miesięcy: odpowiednio $p=0,0002$, $p=0,0002$, $p=0,0003$). Jednak poziom aktywności CAT w hemolimfie osobników narażonych na nanosrebro w postaci PVP-AgNPs i AgNPs przez okres 12 miesięcy obniżył się istotnie, w porównaniu do wartości aktywności uzyskanych dla pozostałych czasów ekspozycji na te związki (1 i 3 miesiące) (odpowiednio PVP-AgNPs: $p=0,002$; AgNPs: $p=0,002$). Niezależnie od czasu ekspozycji na metal w pokarmie najwyższą aktywność CAT notowano w hemolimfie osobników poddanych działaniu AgNO_3 . Po pierwszym miesiącu trwania eksperymentu różnica między poziomem aktywności CAT w wymienionej grupie, a grupami otrzymującymi PVP-AgNPs i AgNPs wynosiła średnio 44% ($p=0,0002$), podczas gdy po 3 miesiącach 39% ($p=0,0002$), a po 12 miesiącach tylko 17% ($p=0,0003$) (Ryc. 4.1.; Aneks, Tab. A.3.).

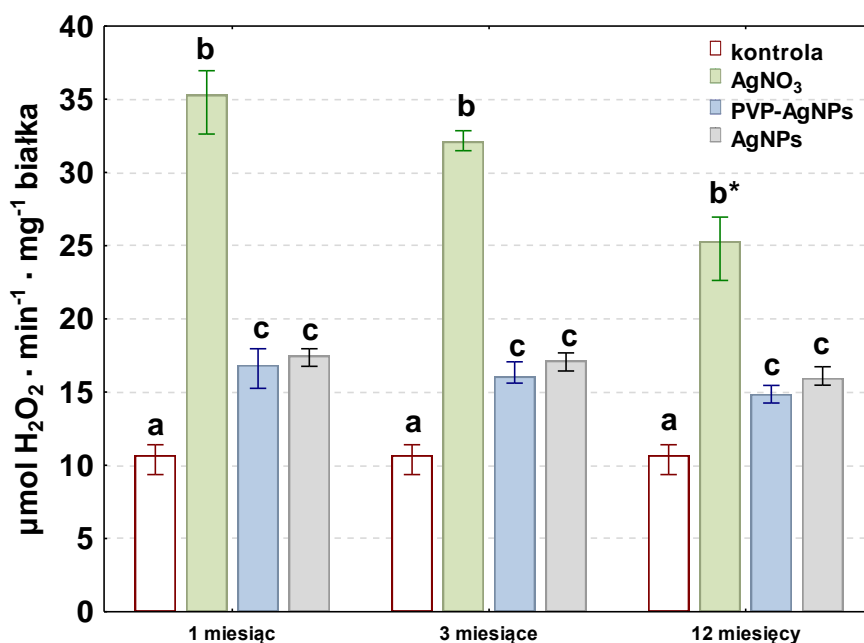


Ryc. 4.1. Aktywność katalazy (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w hemolimfie samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b, c) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); *, **, *** oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

Poziom aktywności katalazy w gruczole jelita środkowego po suplementacji pokarmu AgNO₃ wzrósł 3–krotnie w czasie 1 i 3 miesięcy ekspozycji, natomiast po 12 miesiącach 2–krotnie względem kontroli (1, 3 i 12 miesięcy odpowiednio $p = 0,01$; $p = 0,01$; $p = 0,003$). Jednak tylko w przypadku osobników poddanych ekspozycji 12 miesięcznej na AgNO₃, poziom aktywności CAT różnił się istotnie statystycznie od wartości uzyskanych dla krótszych czasów ekspozycji ($p = 0,02$). W przypadku suplementacji pokarmu wybranymi formami nanosrebra we wszystkich interwałach czasowych aktywność katalazy wzrosła około 1,5–krotnie, w porównaniu do kontroli (1, 3 i 12 miesięcy odpowiednio $p = 0,01$; $p = 0,01$; $p = 0,003$) (Ryc. 4.2.; Aneks, Tab. A.3.).

Podobnie jak w przypadku hemolimfy, niezależnie od czasu ekspozycji na srebro w pokarmie, najwyższą aktywność CAT notowano w gruczołach jelita środkowego osobników narażonych na AgNO₃. Po pierwszym miesiącu trwania eksperymentu różnica między poziomem aktywności CAT w grupie otrzymującej srebro w postaci tego związku, a grupami narażonymi na PVP–AgNPs i AgNPs w pokarmie wynosiła średnio

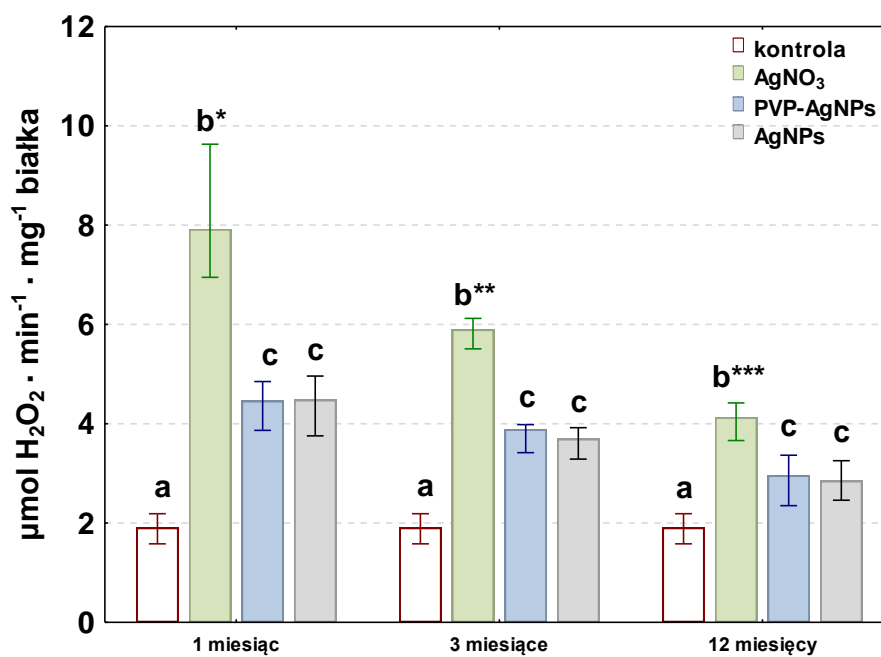
53% ($p=0,02$), podczas gdy po 3 miesiącach 47% ($p=0,02$), a po 12 miesiącach 40% ($p=0,003$) (Ryc. 4.2.; Aneks, Tab. A.3.).



Ryc. 4.2. Aktywność katalazy (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w gruczole jelita środkowego samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b, c) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji i w odniesieniu do kontroli (1, 3 lub 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$; test U Manna–Whitneya; $p<0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$); $n=6-10$.

Niezależnie od stosowanej formy srebra i czasu trwania narażenia na metal w pokarmie, wzorzec zmian aktywności katalazy w ampułkowatych gruczolach przednich badanych osobników był podobny jak w hemolimfie i gruczole jelita środkowego. Nie mniej jednak poziom aktywności tego enzymu w gruczolach przednich był średnio czterokrotnie niższy, niż w pozostałych tkankach. W grupie samic narażonych przez 1, 3 i 12 miesięcy na AgNO₃ aktywność katalazy w gruczolach ampułkowatych wzrosła kolejno 4-, 3- i 2-krotnie względem kontroli (odpowiednio: $p=0,005$; $p=0,005$; $p=0,01$). Podanie PVP–AgNPs i AgNPs spowodowało natomiast 2-krotny wzrost enzymu w czasie 1 i 3 miesięcy ekspozycji ($p=0,005$; $p=0,005$), a po 12 miesiącach wzrost 1,5-krotny ($p=0,013$), w porównaniu do kontroli. W każdym czasie trwania eksperymentu aktywność enzymu u osobników poddanych działaniu AgNO₃ istotnie przewyższała wartości aktywności CAT notowane w grupach otrzymujących srebro w postaci nanocząstek. Po pierwszym miesiącu trwania eksperymentu różnica między

poziomem aktywności CAT w grupie otrzymującej srebro w postaci związku AgNO_3 , a grupami narażonymi na PVP–AgNPs i AgNPs w pokarmie wynosiła średnio 44% ($p=0,02$), podczas gdy po 3 miesiącach 52% ($p=0,02$), a po 12 miesiącach tylko 38% ($p=0,048$) (Ryc. 4.3.; Aneks, Tab. A.3.).

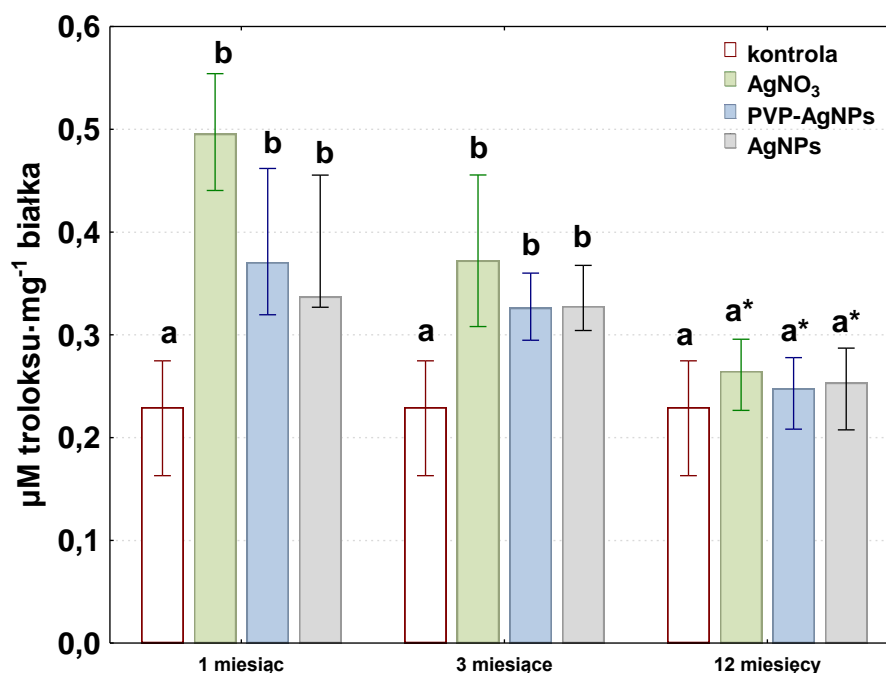


Ryc. 4.3. Aktywność katalazy (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w ampułkowatych gruczołach przednich samic pajaka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b, c) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$; test U Manna–Whitneya; $p<0,05$); *, **, *** oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO_3 , PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$); $n=6-10$.

4.2.2. Całkowita pojemność antyoksydacyjna (TAC)

Zastosowane formy srebra spowodowały istotny statystycznie wzrost poziomu całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) w komórkach hemolimfy po 1 i 3 miesiącach ekspozycji w odniesieniu do osobników kontrolnych. W przypadku ekspozycji na AgNO_3 wzrost ten był 2,3–krotny (po 1 miesiącu) i 1,5–krotny (po 3 miesiącach), natomiast podanie nanosrebra w formie PVP–AgNPs i AgNPs spowodowało porównywalny, 1,5–krotny, wzrost wielkości TCA w hemolimfie po wymienionych wyżej czasach ekspozycji, względem wartości kontrolnych (dla 1 i 3 miesięcy odpowiednio: $p=0,017$; $p=0,037$). Niezależnie od zastosowanego związku poziom TAC w hemolimfie osobników po 12 miesiącach narażenia na srebro w pokarmie

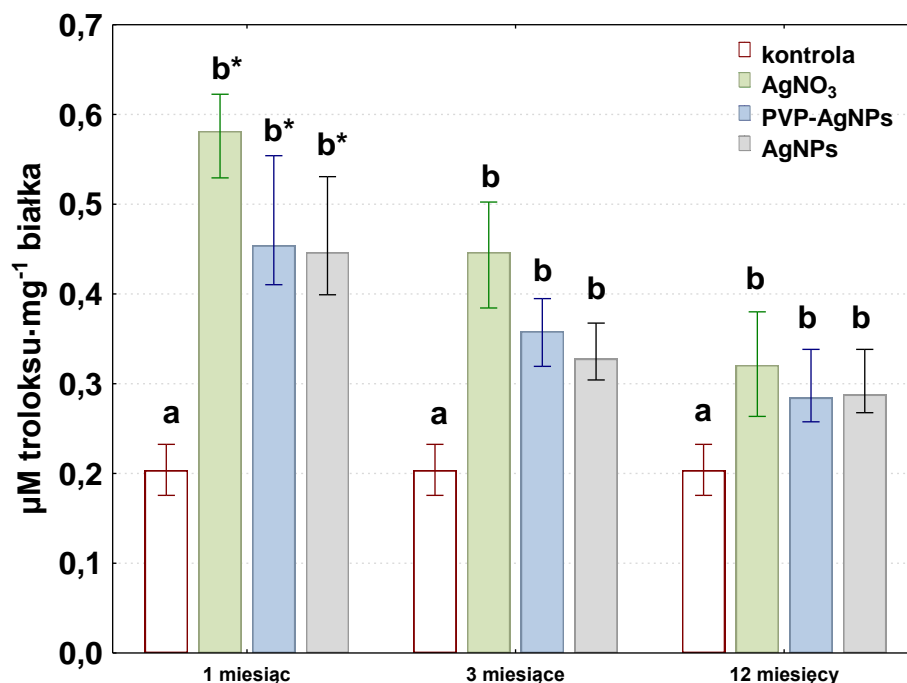
utrzymywała się na porównywalnym poziomie, jednak istotnie niższym, średnio o 40%, 29%, 26% (odpowiednio dla AgNO_3 : $p=0,02$; PVP–AgNPs: $p=0,03$; AgNPs: $p=0,03$), w porównaniu z wartościami dla tego parametru uzyskanymi w pozostałych czasach ekspozycji (Ryc. 4.4.; Aneks, Tab. A.4.).



Ryc. 4.4. Zmiany poziomu całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach hemolimfy samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$; test U Manna–Whitneya; $p<0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO_3 , PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$); $n=6-10$.

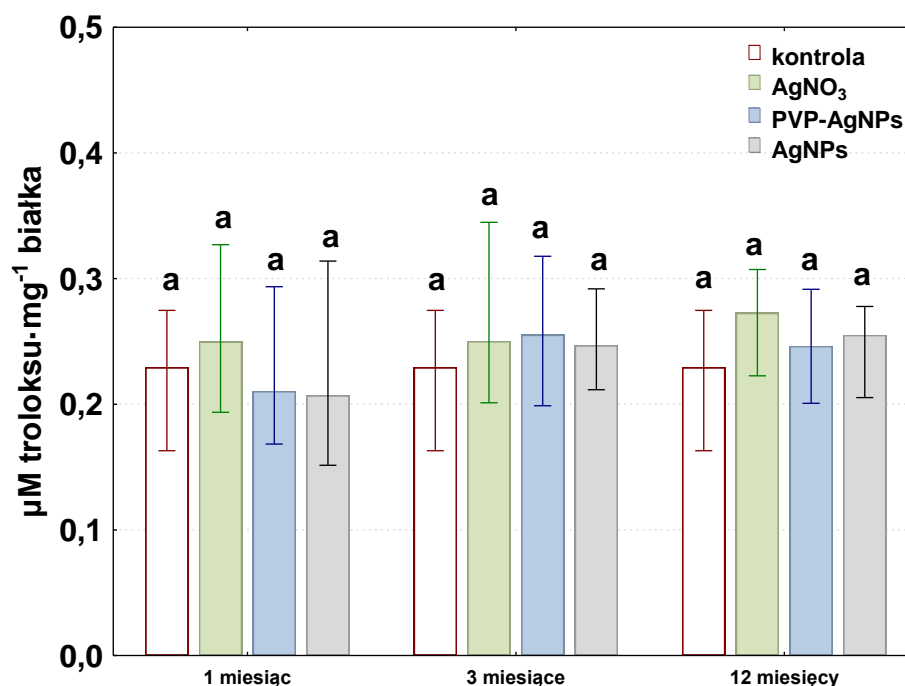
W komórkach gruczołu jelita środkowego nastąpił istotny względem kontroli wzrost poziomu aktywności TAC we wszystkich punktach czasowych ekspozycji na zastosowane formy metalu. Najwyższy poziom tego parametru obserwowano po miesięcznym narażeniu osobników na AgNO_3 , który blisko 3–krotnie przewyższał poziom kontrolny. Z kolei 3– i 12–miesięczna ekspozycja na AgNO_3 spowodowała odpowiednio ponad 2–krotny i 1,5–krotny wzrost poziomu całkowitej pojemności antyoksydacyjnej, względem kontroli (odpowiednio dla 1, 3 i 12 miesięcy: $p=0,015$; $p=0,012$; $p=0,035$). W przypadku form nanometrycznych srebra odnotowano ponad 2–krotny wzrost analizowanego parametru po miesięcznej intoksykacji ($p=0,015$) i około 1,5–krotny wzrost po trzymiesięcznej i dwunastomiesięcznej ekspozycji w odniesieniu

do grupy kontrolnej (odpowiednio 3 i 12 miesiącach: $p=0,012$; $p=0,035$) (Ryc. 4.5.; Aneks, Tab. A.4.).



Ryc. 4.5. Zmiany poziomu całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach gruczołu jelita środkowego samic pająka *S. grossa* ekspozowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$; test U Manna–Whitneya; $p<0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$); n= 6 – 10.

W komórkach ampułkowatych gruczołów przędných nie wykazano istotnych statystycznie różnic w poziomie całkowitej pojemności antyoksydacyjnej w odniesieniu do kontroli, po uwzględnieniu zarówno czasu ekspozycji, jak i zastosowanych form metalu (Ryc. 4.6.; Aneks, Tab. A.4.).

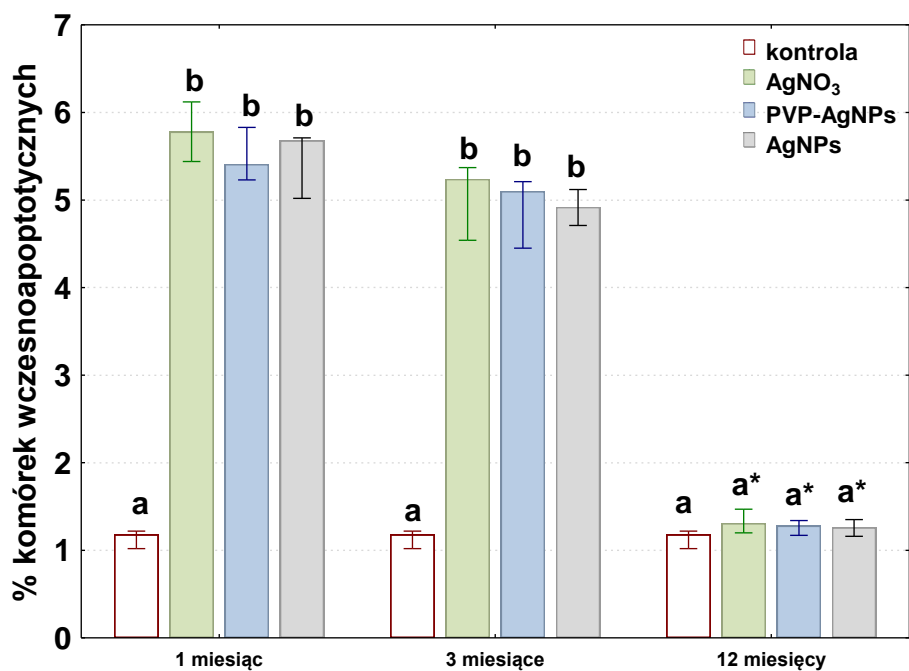


Ryc. 4.6. Zmiany poziomu całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach ampułkowatych gruczołów przednich samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Te same litery (a,) oznaczają brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

4.3. Ilościowa ocena żywotności komórek w wybranych narządach

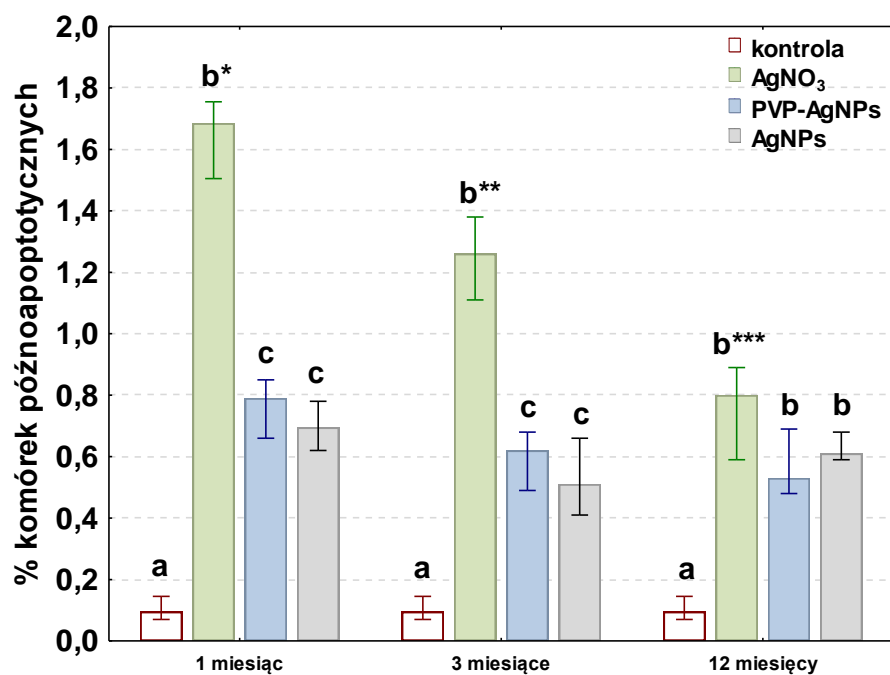
4.3.1. Hemolimfa

Niezależnie od podawanej formy srebra, w hemolimfie osobników z grup otrzymujących metal przez okres 1 i 3 miesięcy rejestrowano istotny względem kontroli wzrost odsetka komórek wczesnoapoptotycznych. W przypadku wszystkich analizowanych grup po miesiącu ekspozycji wzrost odsetka komórek we wczesnej apoptozie był ponad 5-krotny, natomiast w przypadku 3 miesięcznej ekspozycji notowano wzrost ponad 4-krotny, w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio dla 1 i 3 miesięcy: $p = 0,036$; $p = 0,04$). Z kolei po 12 miesiącach ekspozycji nie obserwowano istotnych zmian tego parametru względem kontroli (Ryc. 4.7.; Aneks, Tab. A.5.).



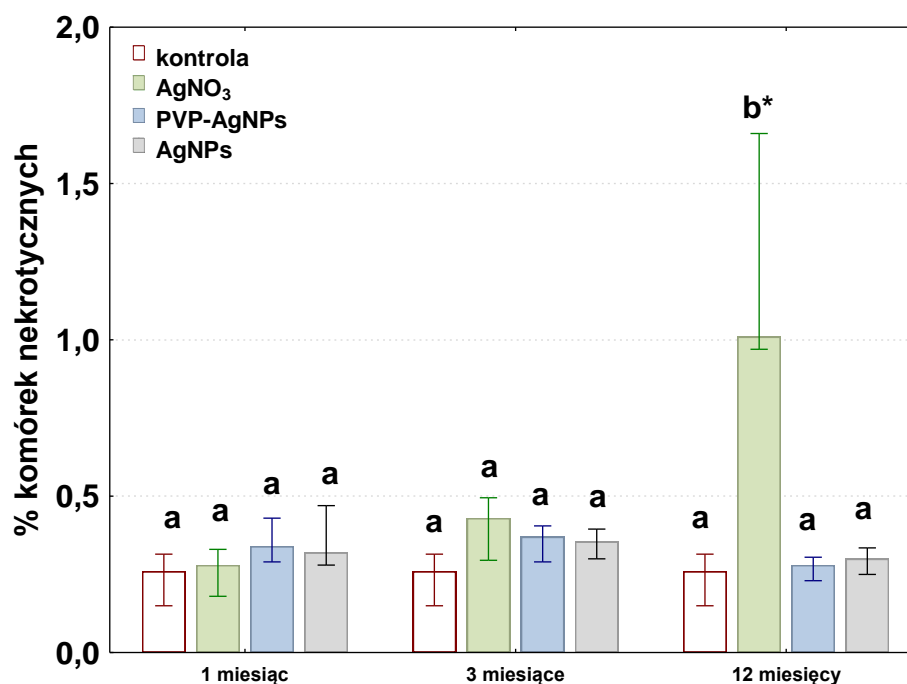
Ryc. 4.7. Poziom komórek wczesnoapoptycznych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w hemolimfie samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

Odsetek komórek późnoapoptycznych w hemolimfie był istotnie wyższy we wszystkich analizowanych grupach i zadanych punktach czasowych ekspozycji, w porównaniu do kontroli. Największy odsetek komórek pozostających w późnej apoptozie odnotowano w przypadku grupy narażonej na działanie AgNO₃, który ponad 14-, 11- i 6-krotnie przewyższał wartości kontrolne, kolejno po 1, 3 i 12 miesiącach ekspozycji (odpowiednio $p = 0,006$, $p = 0,015$, $p = 0,03$). Nie mniej jednak wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji na tą formę metalu obserwowano istotne zmniejszenie odsetka komórek późnoapoptycznych w hemolimfie o 26% po 3 miesiącach i 53% po 12 miesiącach. Poziom tego parametru różnił się istotnie statystycznie między badanymi czasami ekspozycji ($p = 0,026$). Narażenie na formy nanometryczne srebra spowodowało natomiast ponad 6-krotny wzrost odsetka komórek późnoapoptycznych po miesięcznej ekspozycji ($p = 0,006$) i około 5-krotny wzrost odsetka po 3 i 12 miesiącach narażenia, w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio $p = 0,015$ i $p = 0,03$) (Ryc. 4.8.; Aneks, Tab. A.6.).



Ryc. 4.8. Poziom komórek późnoapoptycznych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w hemolimfie samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b, c) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); *, **, *** oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

Nasilenie procesów nekrotycznych w komórkach hemolimfy obserwowano tylko po dwunastu miesiącach ekspozycji na AgNO₃ i było ono 5–krotnie wyższe niż w kontroli ($p = 0,039$) (Ryc. 4.9.; Aneks, Tab. A.7.).

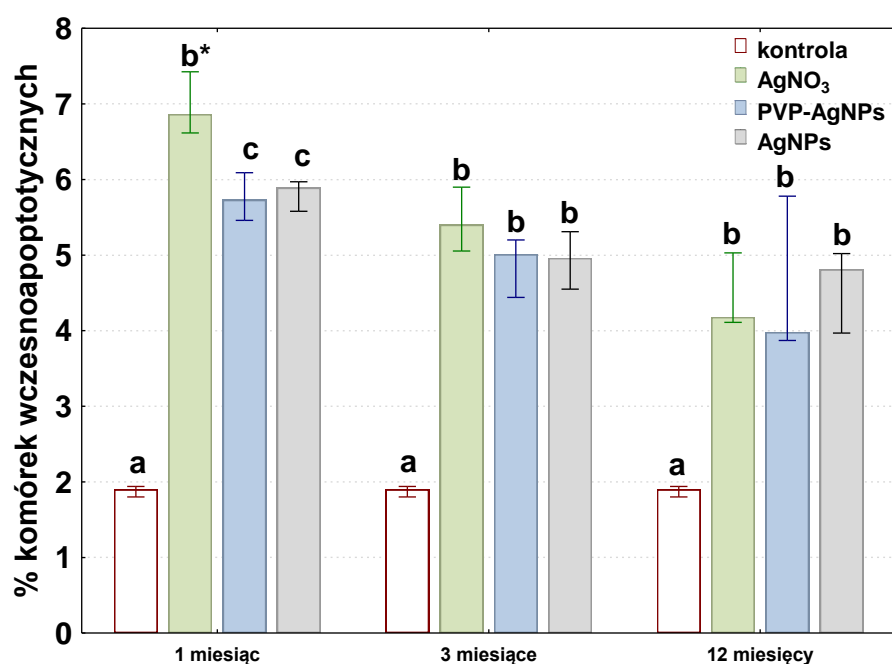


Ryc. 4.9. Poziom komórek nekrotycznych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w hemolimfie samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

4.3.2. Gruczoł jelita środkowego

Niezależnie od podanego związku srebra, w gruczole jelita środkowego odsetek komórek wczesnoapoptotycznych był istotnie wyższy we wszystkich analizowanych grupach i zadanych czasach ekspozycji, w porównaniu do kontroli. Po miesięcznej ekspozycji był on na poziomie prawie 4–krotnie wyższym w grupie osobników narażonych na AgNO₃ ($p = 0,02$) w pokarmie i ponad 3–krotnie wyższy w grupach narażonych na PVP–AgNPs ($p = 0,02$) i AgNPs ($p = 0,02$) w stosunku do grupy kontrolnej. W najkrótszym czasie eksperymentu największy odsetek komórek wczesnoapoptotycznych rejestrowano w gruczołach osobników narażonych na AgNO₃, który istotnie przewyższał poziom analizowanego parametru w grupach poddanych działaniu srebra w postaci nanocząstek (PVP–AgNPs; o 18%, $p = 0,04$; AgNPs o 15%, $p = 0,04$). Trzymiesięczna ekspozycja na AgNO₃ spowodowała 2,8–krotny ($p = 0,06$) wzrost odsetka komórek wczesnoapoptotycznych, z kolei ekspozycja na srebro w formach nanometrycznych spowodowała ponad 2,6–krotny wzrost w odniesieniu do kontroli (PVP–AgNPs: $p = 0,06$, AgNPs: $p = 0,06$). We wszystkich analizowanych grupach

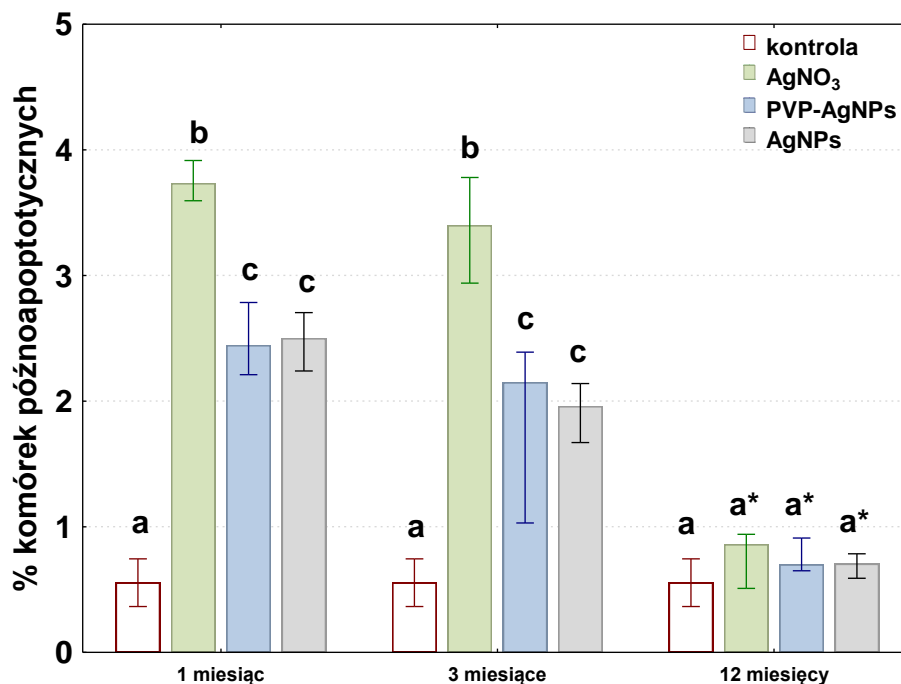
po 12 miesiącach ekspozycji obserwowano istotny i średnio 2–krotny wzrost liczby komórek we wczesnej apoptozie względem kontroli ($p=0,002$) (Ryc. 4.10.; Aneks, Tab. A.5.). Dodatkowo odsetek komórek wczesnoapoptotycznych po 1 miesiącu ekspozycji na AgNO_3 był istotnie wyższy od wartości notowanych w grupach komplementarnych dla pozostałych czasów, w których obserwowano obniżenie odsetka tych komórek. Różnica ta wynosiła 22% ($p=0,03$) po 3 miesiącach i 39% ($p=0,04$) po 12 miesiącach (Ryc. 4.10.; Aneks, Tab. A.5.).



Ryc. 4.10. Poziom komórek wczesnoapoptotycznych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w gruczole jelita środkowego samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b, c) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$; test U Manna–Whitneya; $p<0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO_3 , PVP-AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$); $n=6-10$.

W gruczole jelita środkowego obserwowano wzrost odsetka komórek w późnej apoptozie po 1 i 3 miesiącach po podaniu srebra w pokarmie w wybranych formach. W przypadku AgNO_3 w wymienionych czasach nastąpił porównywalny, ponad 6–krotny wzrost liczby komórek późnoapoptotycznych w odniesieniu do kontroli (1 miesiąc, $p=0,005$; 3 miesiące $p=0,01$). Podanie nanosrebra spowodowało po miesiącu wzrost ponad 4–krotny ($p=0,005$), a po 3 miesiącach ponad 3–krotny wzrost ($p=0,01$) względem grupy kontrolnej. Najniższy odsetek komórek późnoapoptotycznych, zbliżony

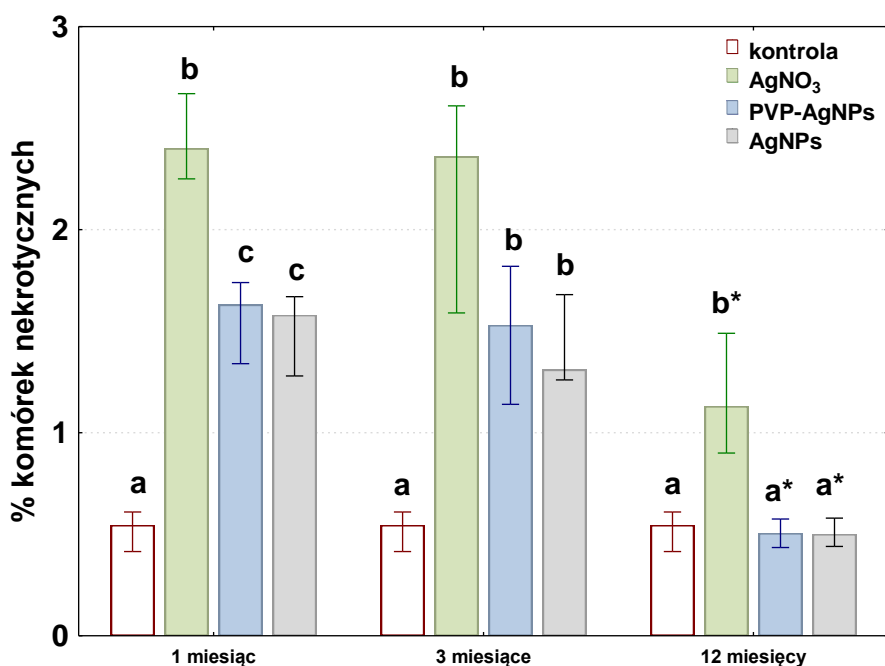
do wartości kontrolnych, rejestrowano w gruczołach jelita środkowego osobników po 12-miesięcznej ekspozycji, niezależnie od stosowanych związków srebra. Wartości uzyskane w najdłuższym czasie eksperymentu różniły się istotnie od wartości omawianego parametru w pozostałych czasach badania (Ryc. 4.11.; Aneks, Tab. A.6.).



Ryc. 4.11. Poziom komórek późnoapoptycznych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w gruczole jelita środkowego samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b, c) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

Niezależnie od rodzaju zastosowanego związku srebra, po 1 i 3 miesiącach ekspozycji wykazano istotny statystycznie wzrost odsetka komórek nekrotycznych w gruczołach jelita środkowego osobników. Wzrost ten był ponad 4-krotny w przypadku suplementacji AgNO₃ i prawie 3-krotny w przypadku suplementacji nanosrebrem w stosunku do kontroli (odpowiednio dla 1 i 3 miesięcy: $p = 0,01$ i $p = 0,03$). Po 12 miesiącach ekspozycji, istotne podwyższenie odsetka komórek nekrotycznych, względem grupy kontrolnej, ponad 2-krotne, odnotowano tylko w grupie eksponowanej na AgNO₃ ($p = 0,04$). Tym nie mniej, niezależnie od stosowanych związków srebra, odsetek komórek nekrotycznych rejestrowany w gruczołach jelita środkowego osobników był najniższy po ekspozycji 12 miesięcznej. Wartości uzyskane

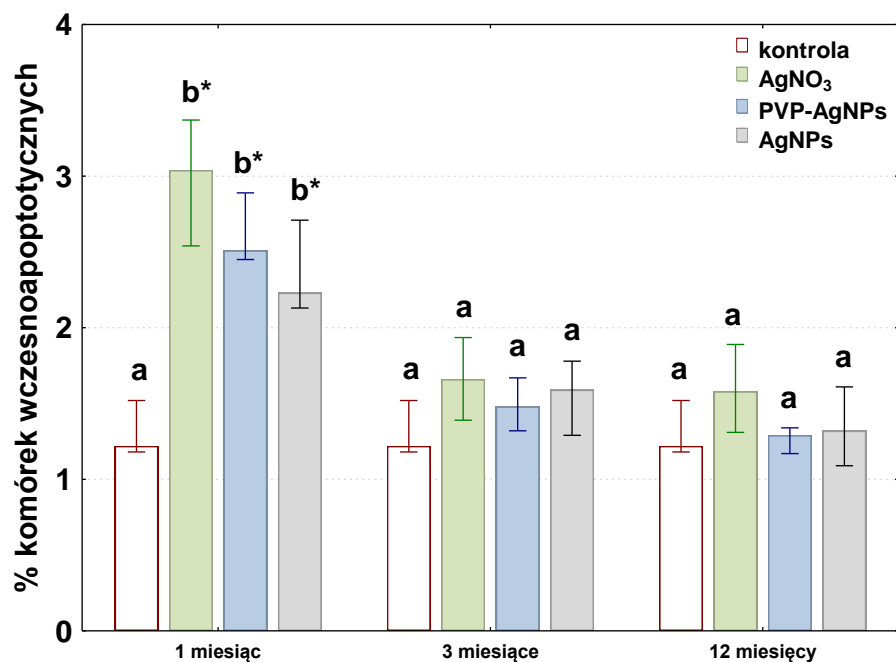
w najdłuższym czasie eksperymentu różniły się istotnie od wartości omawianego parametru w pozostałych czasach badania (Ryc. 4.12., Aneks, Tab. A.7.).



Ryc. 4.12. Poziom komórek nekrotycznych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w gruczole jelita środkowego samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b, c) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

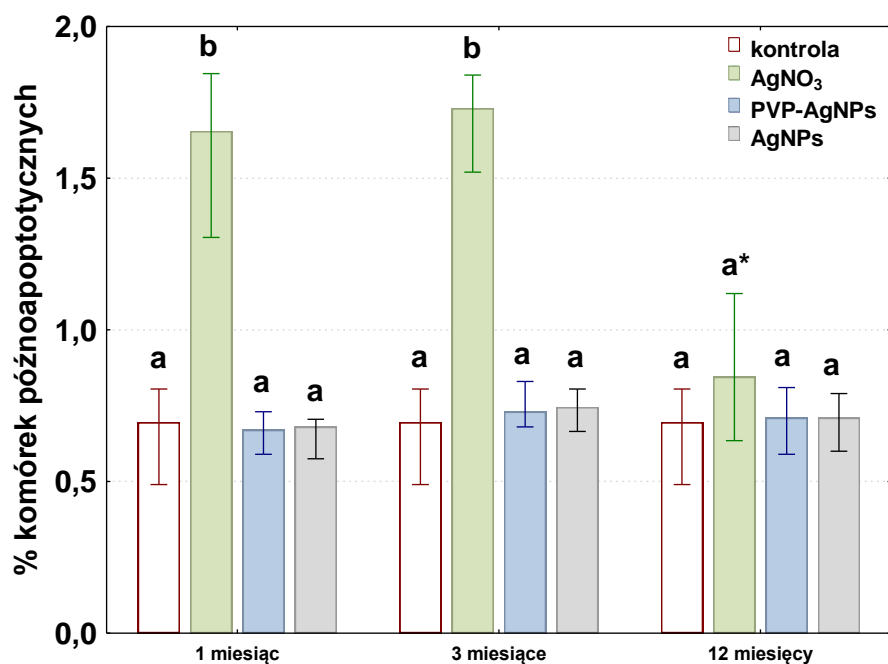
4.3.3. Gruczoł przedny

Niezależnie od podawanej formy srebra, zmiany wczesnoapoptotyczne w gruczołach przednich notowano wyłącznie po najkrótszym czasie ekspozycji (Ryc. 4.13.). W przypadku analizowanych grup po miesiącu ekspozycji wzrost odsetka komórek we wczesnej apoptozie był średnio 2–krotny we wszystkich analizowanych grupach (odpowiednio dla AgNO₃: $p = 0,04$; PVP–AgNPs: $p = 0,04$ i AgNPs: $p = 0,04$), w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei po 3 i 12 miesiącach ekspozycji nie obserwowano istotnych zmian w liczbie komórek wczesnoapoptotycznych względem kontroli (Ryc. 4.13.; Aneks, Tab. A.5.).



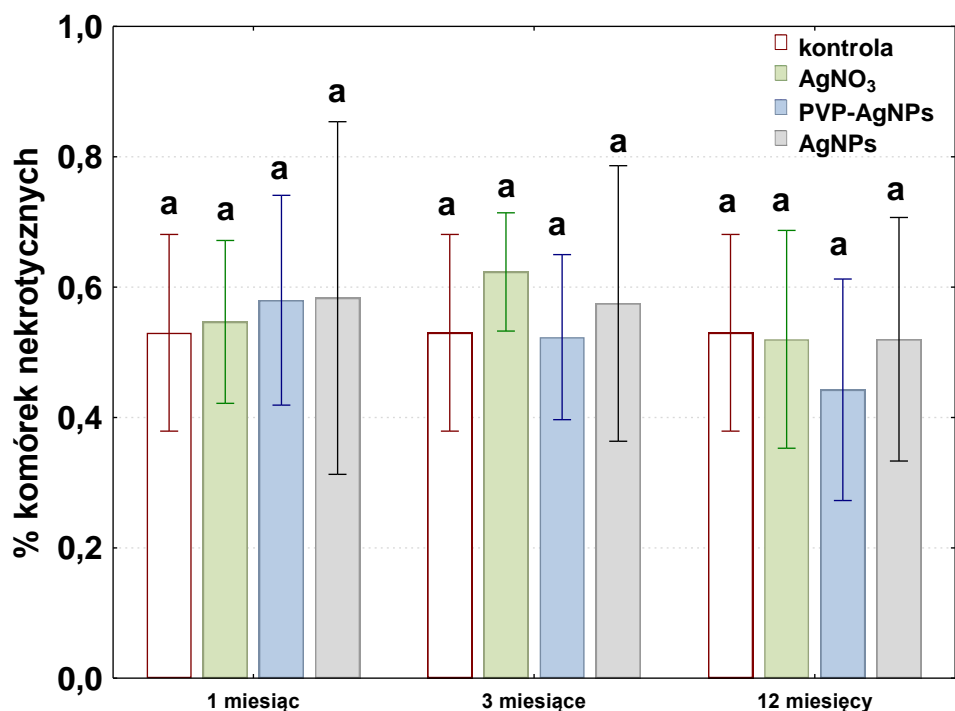
Ryc. 4.13. Poziom komórek wczesnoapoptycznych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w ampułkowatych gruczołach przędnych samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

Wzrost poziomu odsetka komórek w późnej apoptozie zaobserwowano tylko po 1 i 3 miesiącach wyłącznie w grupie eksponowanej na AgNO₃ i był on ponad 2–krotny w stosunku do kontroli (1 miesiąc, $p = 0,03$; 3 miesiące, $p = 0,04$) (Ryc. 4.14.; Aneks, Tab. A.6.).



Ryc. 4.14. Poziom komórek późnoapoptycznych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w ampułkowatych gruczołach przędnym samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

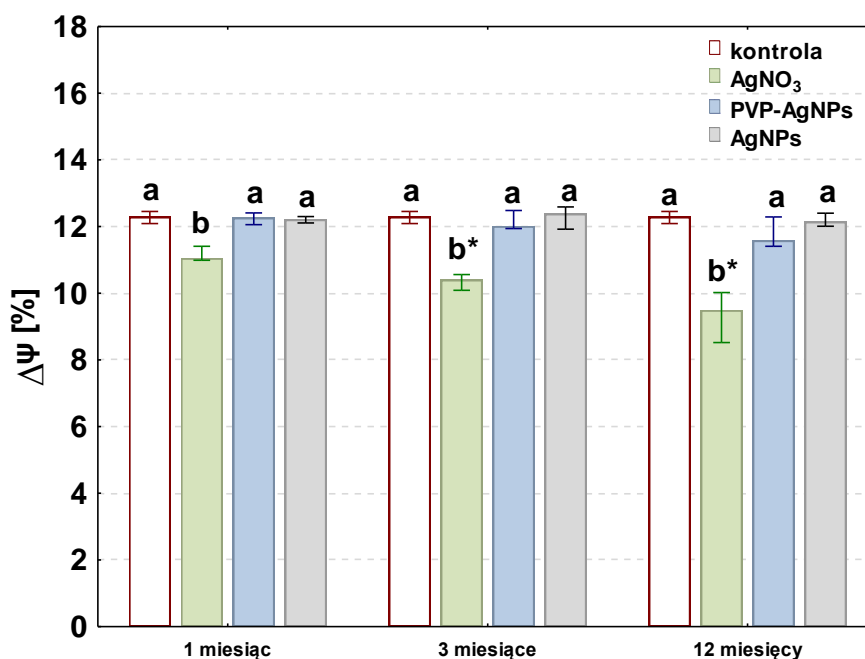
Nie wykazano istotnych różnic względem kontroli w odsetku komórek nekrotycznych w gruczołach przędnym pająków po zastosowaniu różnych związków srebra w zadanych czasach eksperymentu (Ryc. 4.15.; Aneks, Tab. A.7.).



Ryc. 4.15. Poziom komórek nekrotycznych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w ampułkowatych gruczołach przednich samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Te same litery (a) oznaczają brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

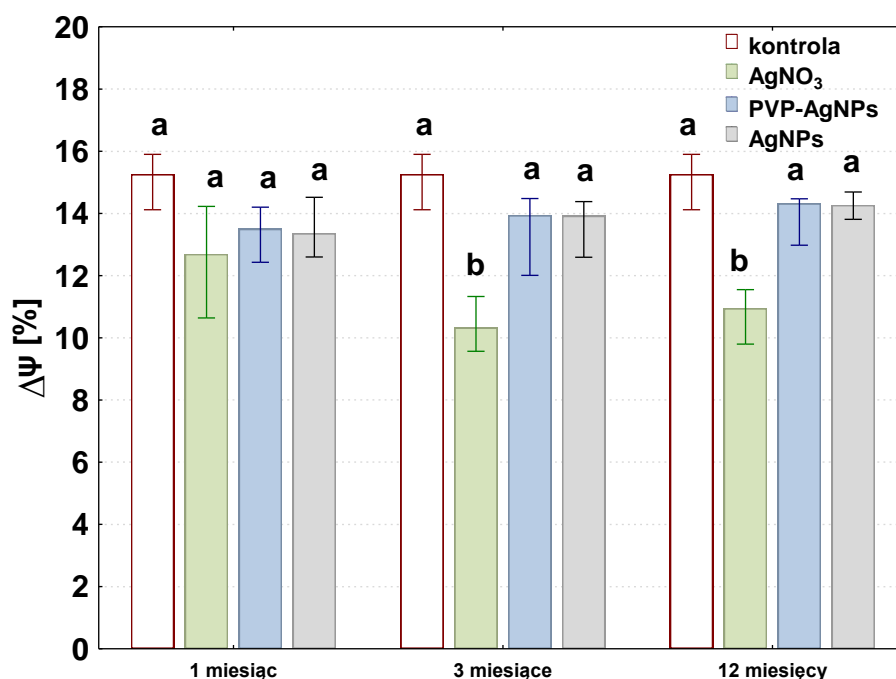
4.3.4. Ilościowa ocena poziomu potencjału mitochondrialnego

Wyłącznie w przypadku grup, którym pokarm suplementowano srebrem w postaci AgNO₃ wykazano istotne względem kontroli, obniżenie wielkości potencjału mitochondrialnego w komórkach hemolimfy we wszystkich zastosowanych interwałach czasowych. Różnice te w odniesieniu do kontroli dla kolejnych punktów czasowych wynosiły: 10% ($p = 0,04$), 16% ($p = 0,03$) i 22% ($p = 0,03$) (Ryc. 4.16.; Aneks, Tab. A.8.).



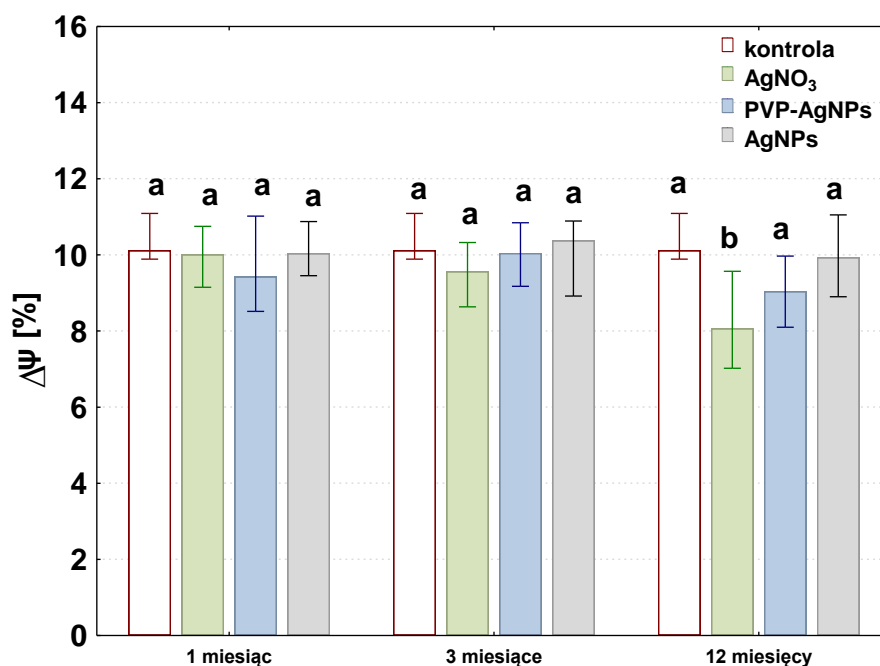
Ryc. 4.16. Zmiany poziomu potencjału mitochondrialnego (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach hemolimfy samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

Podobnie w komórkach gruczołu jelita środkowego, w przypadku wyłącznie AgNO₃ odnotowano istotne obniżenie potencjału mitochondrialnego, lecz dopiero po 3 i 12 miesiącach ekspozycji, w porównaniu z kontrolą. Różnice te w odniesieniu do kontroli dla kolejnych punktów czasowych wynosiły: 32% ($p = 0,03$) i 37% ($p = 0,03$) (Ryc. 4.17.; Aneks, Tab. A.8.).



Ryc. 4.17. Zmiany poziomu potencjału mitochondrialnego (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach gruczołu jelita środkowego samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

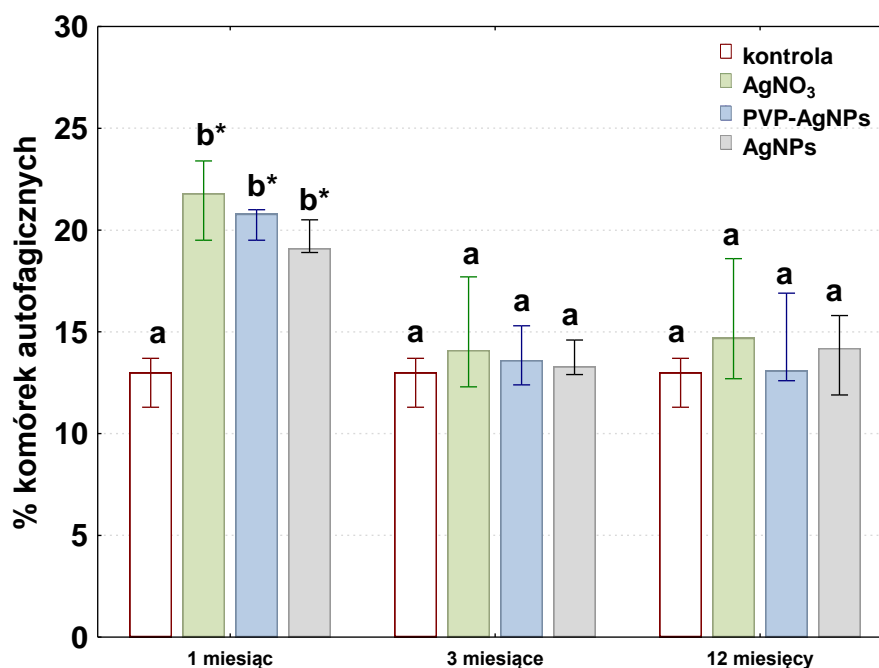
Z kolei w przypadku komórek ampułkowatych gruczołów przednich istotne względem grupy kontrolnej zmiany wielkości potencjału mitochondrialnego rejestrowano wyłącznie po 12 miesiącach ekspozycji osobników tylko na AgNO₃. Różnica ta w odniesieniu do kontroli dla wymienionego punktu czasowego wynosiła: 21% ($p = 0,04$). Ekspozycja na formy nanosrebra nie wywołała istotnych zmian w poziomie analizowanego parametru, zarówno w komórkach hemolimfy, gruczołu jelita środkowego, jak i ampułkowatych gruczołów przednich (Ryc. 4.18.; Aneks, Tab. A.8.).



Ryc. 4.18. Zmiany poziomu potencjału mitochondrialnego (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach ampułkowatych gruczołów przednich samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

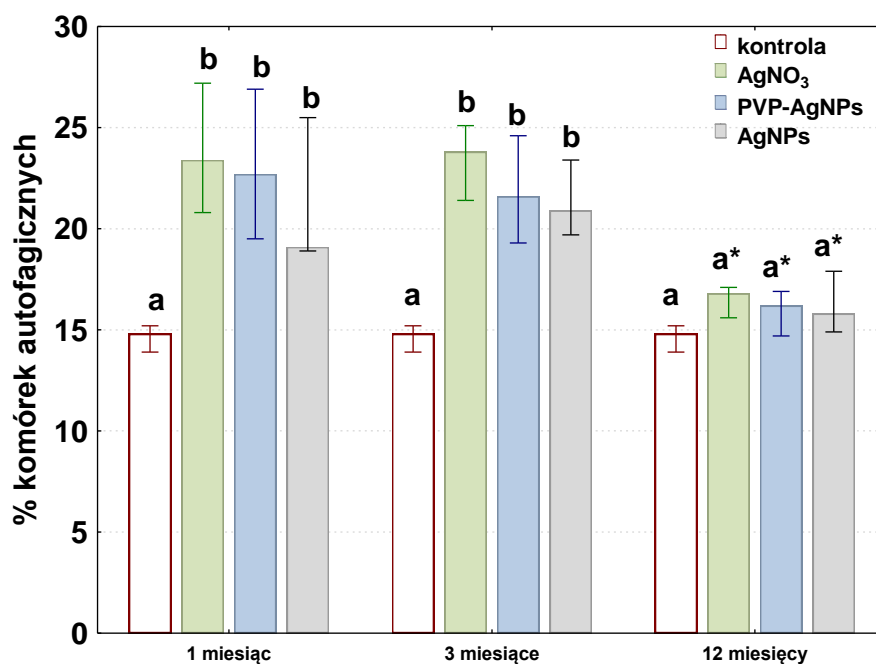
4.3.5. Ilościowa ocena intensywności autofagii

Niezależnie od podawanej formy srebra, zmiany poziomu intensywności autofagii w hemolimfie notowano wyłącznie po najkrótszym czasie ekspozycji. Po miesiącu ekspozycji wzrost odsetka komórek autofagicznych w hemolimfie był 1,7-, 1,6- i 1,5-krotny, odpowiednio dla AgNO₃ ($p = 0,039$), PVP–AgNPs ($p = 0,039$) i AgNPs ($p = 0,041$), w porównaniu do grupy kontrolnej. Z kolei po 3 i 12 miesiącach ekspozycji nie obserwowano istotnych zmian w intensywności autofagii względem kontroli (Ryc. 4.19.; Aneks, Tab. A.9.).



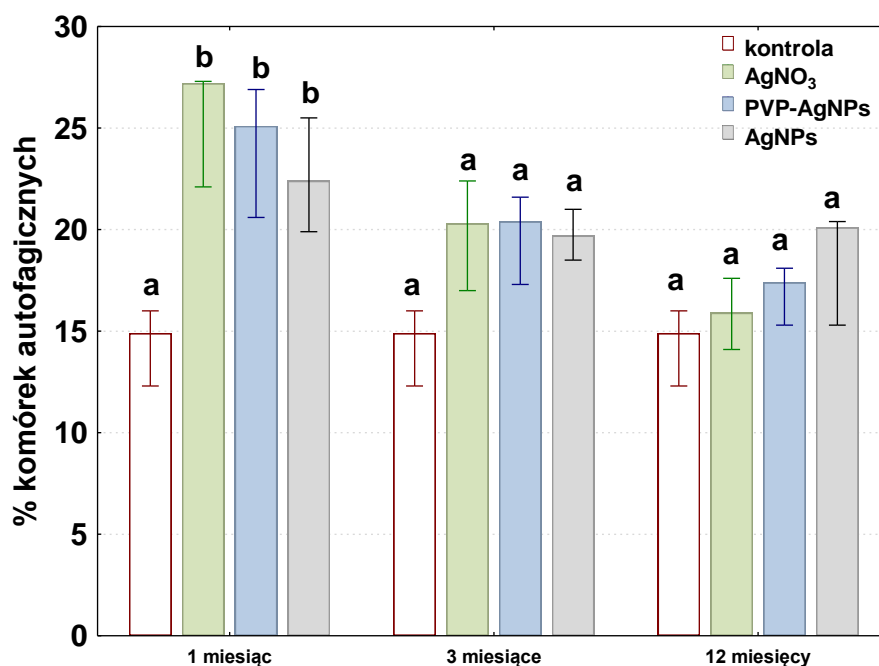
Ryc. 4.19. Poziom intensywności autofagii (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w hemolimfie przednich samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

W gruczole jelita środkowego rejestrowany odsetek komórek autofagicznych był istotnie wyższy, niż w kontroli u osobników po 1 i 3 miesiącach intoksykacji w przypadku wszystkich zastosowanych form metalu. Po miesiącu ekspozycji wzrost odsetka komórek autofagicznych w gruczole jelita środkowego był 1,6-, 1,5- i 1,3-krotny (odpowiednio dla AgNO₃: $p = 0,043$, PVP–AgNPs: $p = 0,044$, AgNPs: $p = 0,044$), w porównaniu do grupy kontrolnej. Podobne rezultaty uzyskano po trzech miesiącach intoksykacji, bowiem wzrost odsetka komórek autofagicznych w gruczole jelita środkowego był 1,6-, 1,5 i 1,4-krotny (odpowiednio dla AgNO₃: $p = 0,04$, PVP–AgNPs: $p = 0,04$, AgNPs: $p = 0,04$). Długoterminowa ekspozycja doprowadziła do zmniejszenia odsetka autofagii we wszystkich grupach doświadczalnych, nie mniej jednak nie odnotowano istotnie wyższych wartości tego parametru, w porównaniu z kontrolą (Ryc. 4.20.; Aneks, Tab. A.9.).



Ryc. 4.20. Poziom intensywności autofagii (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w gruczole jelita środkowego samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

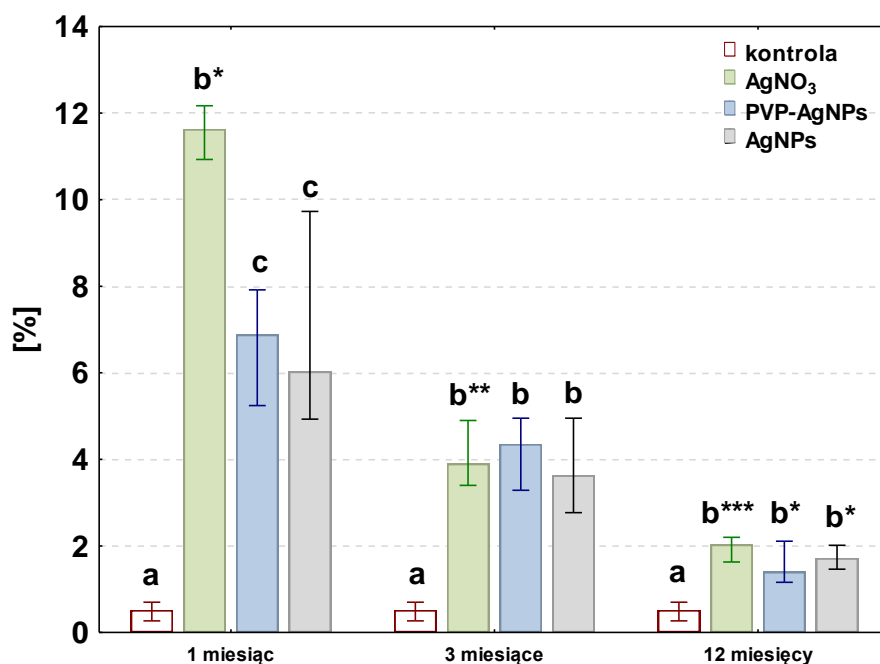
Po miesiącu ekspozycji wzrost odsetka komórek autofagicznych w gruczole przednym był o 83%, 68% i 50% wyższy (odpowiednio dla AgNO₃: $p = 0,04$; PVP–AgNPs: $p = 0,04$; AgNPs: $p = 0,04$), w porównaniu do grupy kontrolnej. Trzy- i dwunastomiesięczna ekspozycja nie ujawniły istotnych zmian w poziomie tego parametru, w odniesieniu do grupy kontrolnej (Ryc. 4.21.; Aneks, Tab. A.9.).



Ryc. 4.21. Poziom intensywności autofagii (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w ampułkowatych gruczołach przednich samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b), oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

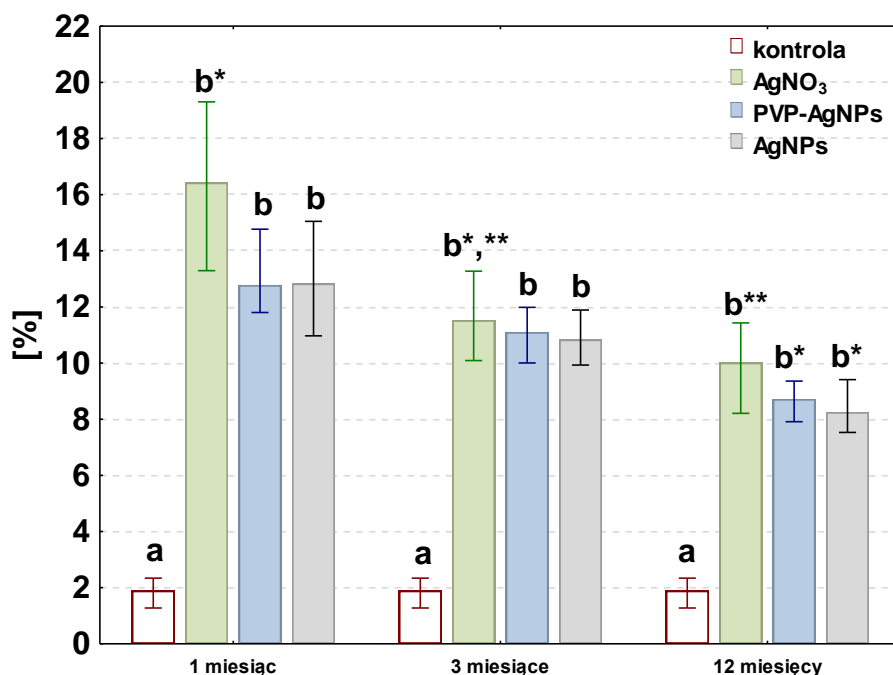
4.3.6. Ilościowa ocena poziomu stresu oksydacyjnego

W hemolimfie nastąpił istotny względem kontroli wzrost poziomu odsetka komórek ROS+ we wszystkich punktach czasowych ekspozycji na zastosowane formy metalu. Najwyższy poziom tego parametru obserwowano po miesięcznym narażeniu osobników na AgNO₃, który blisko 22-krotnie przewyższał poziom kontrolny ($p = 0,002$). Z kolei 3- i 12-miesięczna ekspozycja na AgNO₃ spowodowała odpowiednio 8-krotny i 4-krotny wzrost poziomu odsetka komórek ROS+, względem kontroli (odpowiednio $p = 0,01$ i $p = 0,004$). W przypadku zastosowania pozostałych związków: PVP-AgNPs i AgNPs wykazano odpowiednio ponad 13-, 8- i 3-krotny wzrost poziomu populacji komórek z ROS+ (PVP-AgNPs: $p = 0,002$; $p = 0,012$; $p = 0,004$) oraz wzrost 12-, 7- i 3-krotny (AgNPs: $p = 0,002$; $p = 0,012$; $p = 0,004$) w odniesieniu do grupy kontrolnej. Najniższy poziom komórek ROS+ w hemolimfie notowano u osobników najdłużej eksponowanych na stosowane związki srebra (Ryc. 4.22.; Aneks, Tab. A.10.).



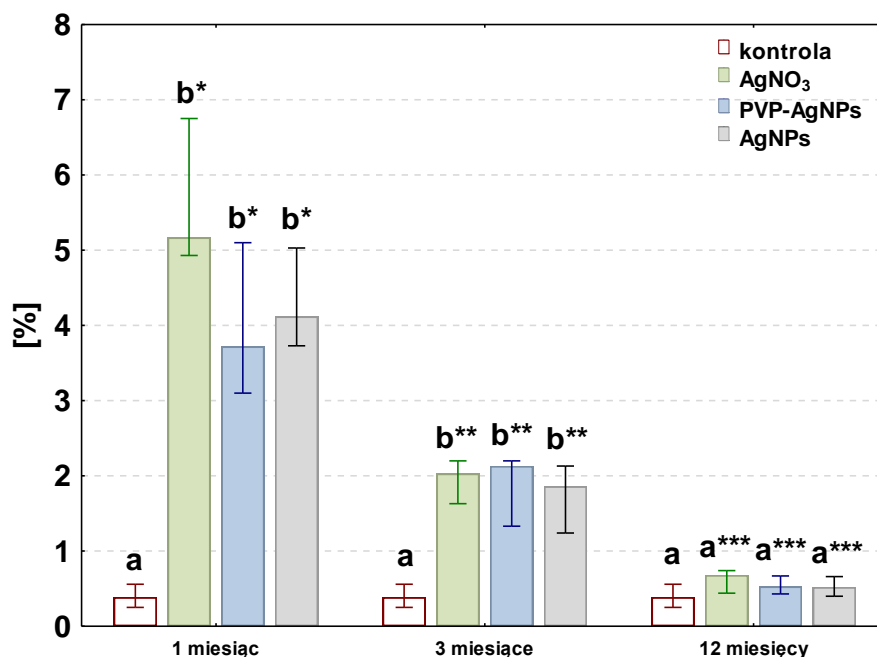
Ryc. 4.22. Poziom populacji komórek ROS+ (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w hemolimfie samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b, c) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); *, **, *** oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

W gruczole jelita środkowego również odnotowano istotny wzrost odsetka komórek ROS+ w odpowiedzi na zastosowane związki srebra i czasy ekspozycji. Największy odsetek komórek ROS+ rejestrowano w tym narządzie u osobników poddanych najkrótszemu czasowi narażenia na związki srebra. Po miesiącu ekspozycji na ofiary hodowane na pożywkę zawierającą AgNO₃ odsetek komórek ROS+ wzrósł blisko 9-krotnie ($p = 0,03$), podczas gdy dodanie do pożywki PVP–AgNPs i AgNPs skutkowało 7-krotnym ($p = 0,03$) zwiększeniem odsetka komórek ROS+ w grupach narażonych na wybrane formy nanosrebra, w porównaniu z kontrolą. Trzymiesięczna intoksykacja doprowadziła do istotnego i blisko 6-krotnego wzrostu wielkości tego parametru w przypadku wszystkich zastosowanych form srebra ($p = 0,03$). Także 12-miesięczne narażenie na AgNO₃ oraz nanocząstki srebra w postaci PVP–AgNPs i AgNPs wywołało kolejno ponad 5- ($p = 0,04$) i 4-krotny ($p = 0,04$; $p = 0,04$) wzrost poziomu komórek ROS+, w odniesieniu do kontroli (Ryc. 4.23.; Aneks, Tab. A.10.).



Ryc. 4.23. Poziom populacji komórek ROS+ (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w gruczole jelita środkowego samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); *,** oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); n= 6 – 10.

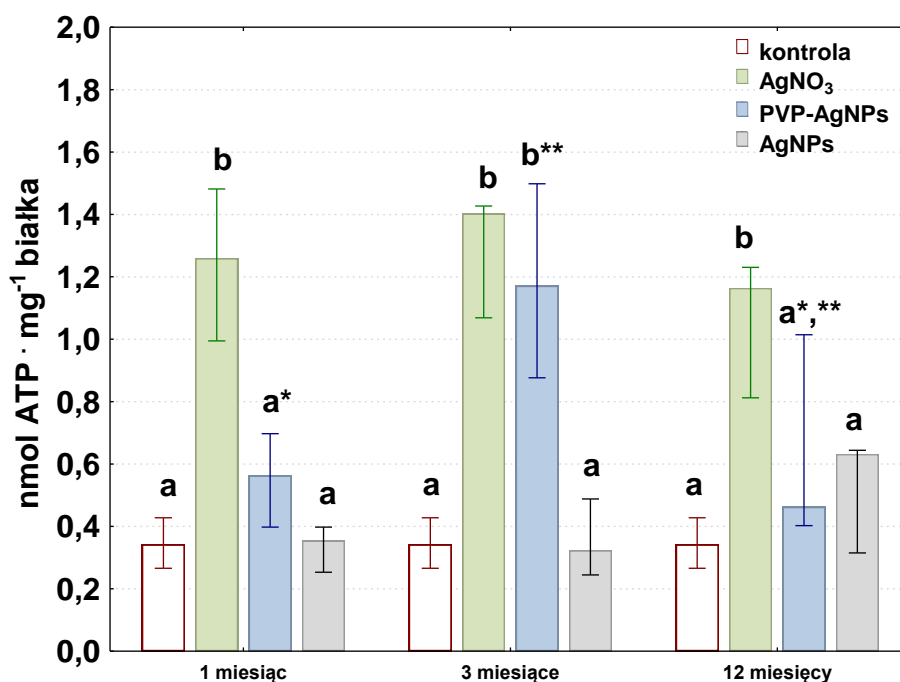
Ekspozycja na wybrane związki srebra doprowadziła również do wzrostu odsetka komórek z ROS+ w ampułkowatych gruczolach przednich. Największy odsetek takich komórek rejestrowano po najkrótszym czasie ekspozycji na wszystkie stosowane związki srebra. Wykazano, że miesięczne podawanie srebra w pokarmie spowodowało 13– ($p=0,01$), 10– ($p=0,01$) i 11–krotny ($p=0,01$) wzrost ROS+ kolejno w grupach AgNO₃, PVP–AgNPs oraz AgNPs, w porównaniu z kontrolą. Z kolei w odniesieniu do grupy kontrolnej, trzymiesięczna ekspozycja wywołała we wszystkich grupach średnio 5–krotny wzrost odsetka ROS+ ($p=0,02$). Istotnych zmian nie zaobserwowano, natomiast po długotrwałej intoksykacji wszystkimi wymienionymi związkami (Ryc. 4.24.; Aneks, Tab. A.10.).



Ryc. 4.24. Poziom populacji komórek ROS+ (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w ampułkowatyuch gruczołach przednich samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); *, **, *** oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

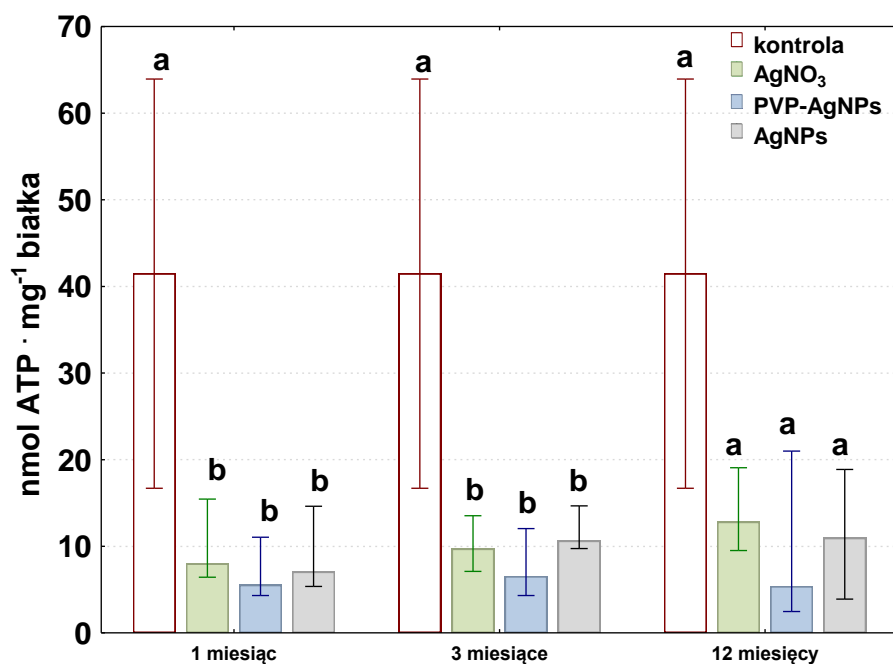
4.3.7. Ocena stężenie ATP

Wzrost stężenia ATP w hemolimfie wykazano, niezależnie od czasu ekspozycji, w grupie narażonej na AgNO₃, w porównaniu z kontrolą. Zwiększenie stężenia tego nukleotydu w odniesieniu do kontroli było 4-krotne po 1 miesiącu narażenia na wymieniony związek ($p = 0,03$), 4-krotne po 3 miesiącach ($p = 0,023$) i 3-krotne po 12 miesiącach ($p = 0,043$). Istotny wzrost stężenia tego nukleotydu odnotowano również po 3 miesiącach ekspozycji na PVP–AgNPs, które ponad 3-krotnie przewyższało wartości kontrole ($p = 0,023$) (Ryc. 4.25.; Aneks, Tab. A.11.).



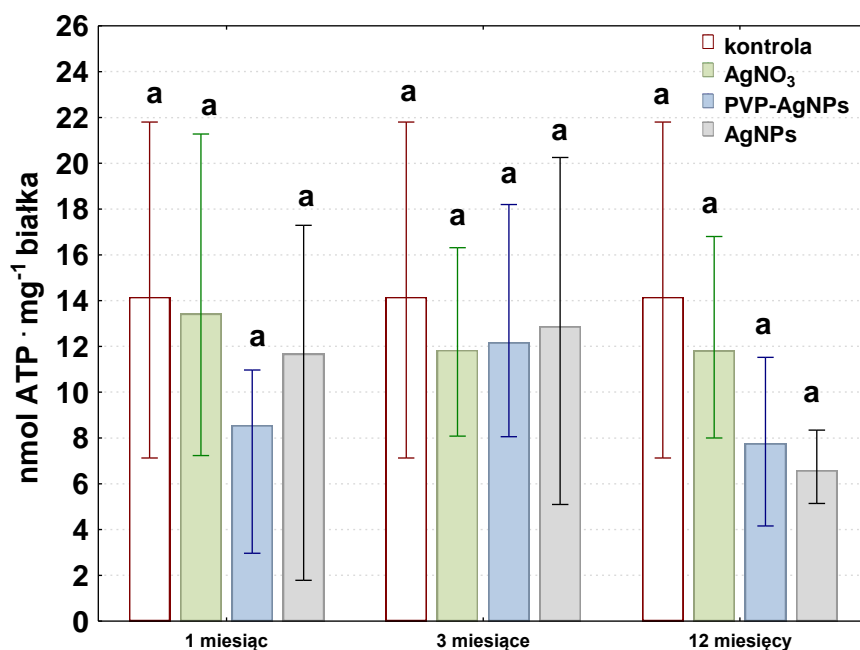
Ryc. 4.25. Stężenie ATP (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach hemolimfy samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); *,** oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

W gruczole jelita środkowego odnotowano istotny statystycznie spadek stężenia ATP, względem wartości rejestrowanych dla grupy kontrolnej, niezależnie od zastosowanej formy srebra i zastosowanego czasu ekspozycji. Miesięczna ekspozycja na srebro spowodowała zmniejszenie stężenia ATP na poziomie 5–krotnym w grupie narażonej na AgNO₃, 7–krotnym w grupie narażonej na PVP–AgNPs oraz 6–krotnym w grupie narażonej na AgNPs, w odniesieniu do kontroli ($p = 0,04$). Trzymiesięczne podawanie metalu w pokarmie skutkowało kolejno 4–, 5– i 3–krotnym spadkiem stężenia ATP w grupie AgNO₃ ($p = 0,04$), PVP–AgNPs ($p = 0,04$) i AgNPs ($p = 0,04$), w porównaniu do grupy kontrolnej. Długotrwała ekspozycja na wybrane formy srebra nie wywołała istotnych zmian, w odniesieniu do kontroli (Ryc.4.26.; Aneks, Tab. A.11.).



Ryc. 4.26. Stężenie ATP (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach gruczołu jelita środkowego samic pająka *S. grossa* ekspozowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

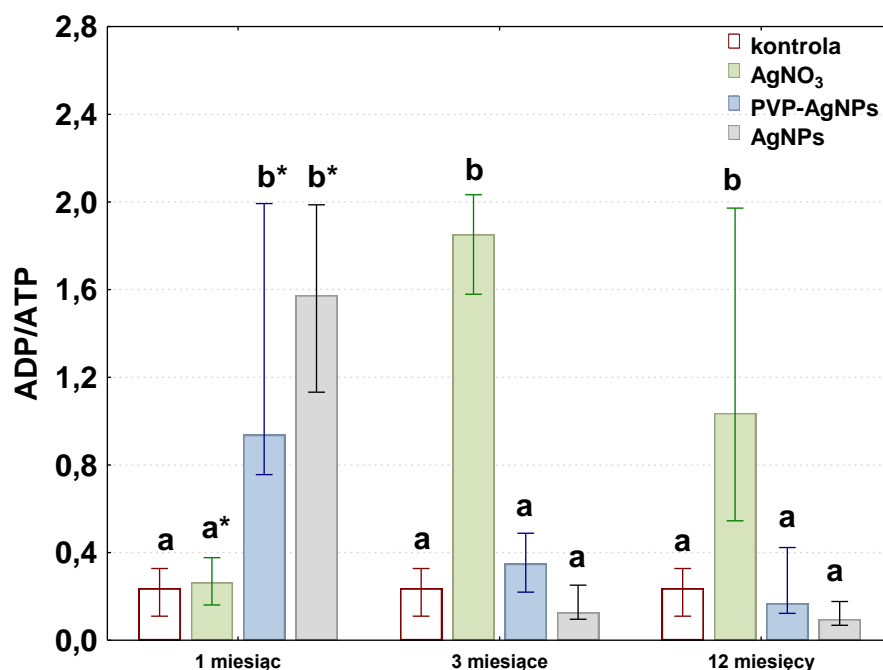
W komórkach ampulkowatych gruczołów przednich nie odnotowano żadnych zmian w poziomie stężenia ATP względem grupy kontrolnej (Ryc. 4.27.; Aneks, Tab. A.11.).



Ryc. 4.27. Stężenie ATP (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach ampułkowatych gruczołów przędných samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Te same litery (a) oznaczają brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

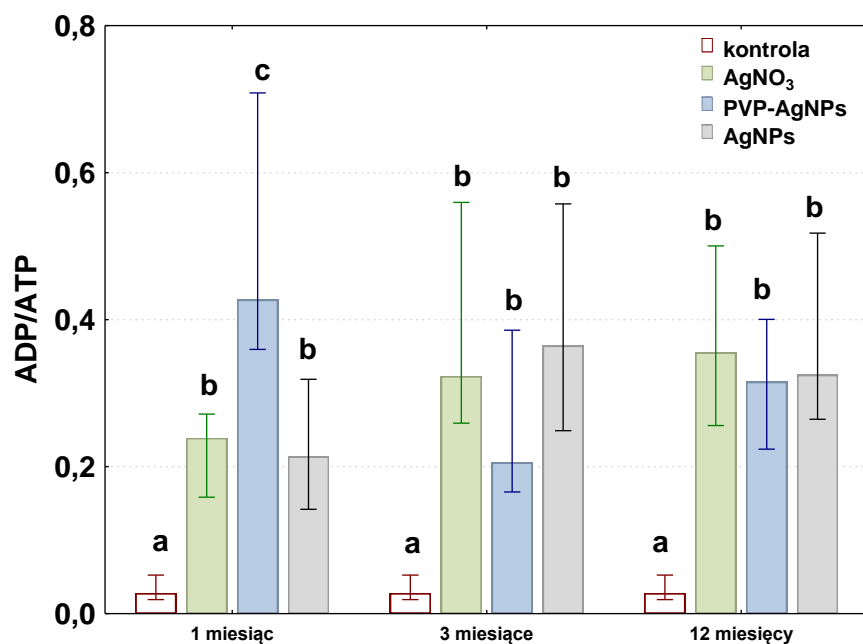
4.3.8. Ocena stosunku ADP/ATP

Największe zmiany wielkości stosunku ADP/ATP rejestrowano w hemolimfie. Po miesięcznej intoksykacji nanocząstkami srebra nastąpił blisko 4-krotny wzrost wielkości stosunku ADP/ATP w grupie narażonej na PVP–AgNPs oraz 7-krotny w grupie narażonej na AgNPs, w odniesieniu do kontroli (odpowiednio $p = 0,02$ i $p = 0,02$). W przypadku 3 miesięcznego narażenia na AgNO₃, wykazano zwiększenie wielkości ADP/ATP blisko 8-krotne w porównaniu do kontroli ($p = 0,03$). Z kolei 12-miesięczna intoksykacja AgNO₃ skutkowała 4-krotnym zwiększeniem wielkości tego parametru, w porównaniu z grupą kontrolną ($p = 0,04$) (Ryc. 4.28.; Aneks, Tab. A.12.).



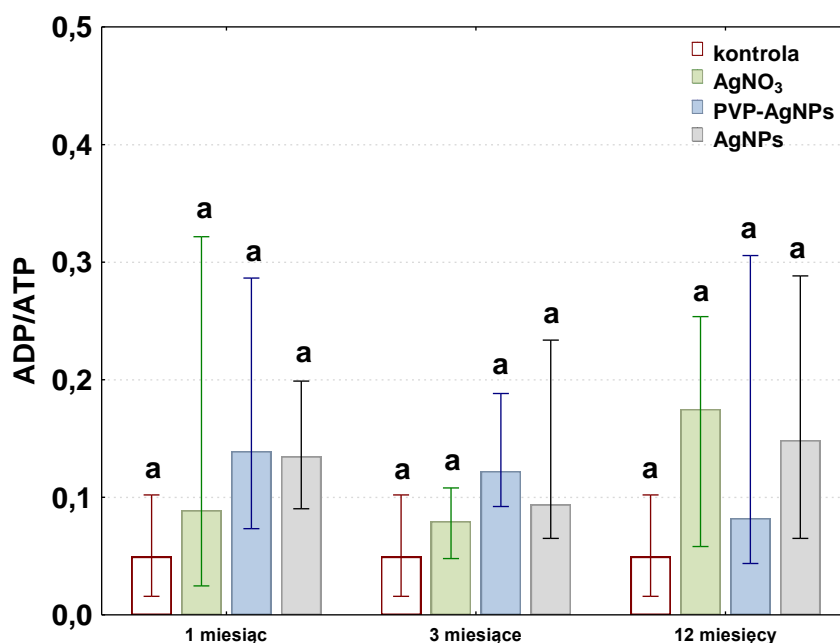
Ryc. 4.28. Stosunek ADP/ATP (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach hemolimfy samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

Niezależnie od zastosowanej formy srebra i czasu ekspozycji w komórkach gruczołu jelita środkowego wykazano istotny wzrost wielkości ADP/ATP, względem grupy kontrolnej. W grupie AgNO₃ i AgNPs po miesięcznej ekspozycji odnotowano kolejno 8–krotny wzrost ($p = 0,02$), natomiast w grupie PVP–AgNPs wzrost 15–krotny ($p = 0,02$). Z kolei trzymiesięczna ekspozycja w grupie AgNO₃ wywołała 12–krotny wzrost wielkości tego parametru ($p = 0,02$), w przypadku grup otrzymujących PVP–AgNPs wzrost ponad 7–krotny ($p = 0,02$), natomiast w grupie narażonej na AgNPs 13–krotny ($p = 0,02$), w odniesieniu do kontroli. Długotrwałe narażenie na AgNO₃, PVP–AgNPs oraz AgNPs skutkowało kolejno 13– ($p = 0,038$), 11– ($p = 0,03$) i 12–krotnym ($p = 0,03$) wzrostem wielkości ADP/ATP, w porównaniu do wartości kontrolnych (Ryc. 4.29.; Aneks, Tab. A.12.).



Ryc. 4.29. Stosunek ADP/ATP (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach gruczołu jelita środkowego samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b, c) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

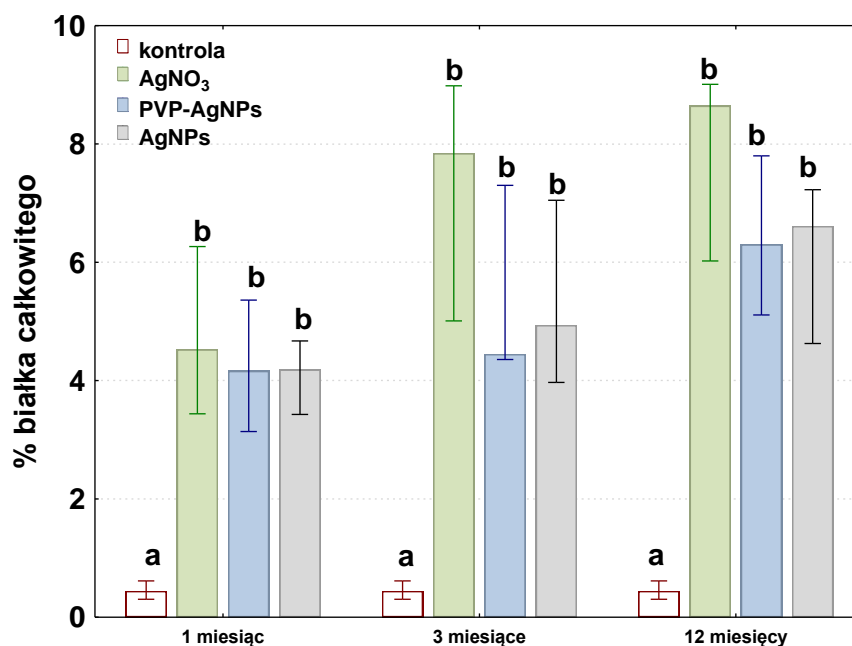
W komórkach ampułkowatych gruczołów przednich nie odnotowano istotnych zmian w grupach badawczych w odniesieniu do grupy kontrolnej (Ryc. 4.30.; Aneks, Tab. A.12.).



Ryc. 4.30. Stosunek ADP/ATP (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w komórkach ampulkowatych gruczołów przednich samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Te same litery (a) oznaczają brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

4.4. Ilościowa ocena białek metalotioneinopodobnych (MTs)

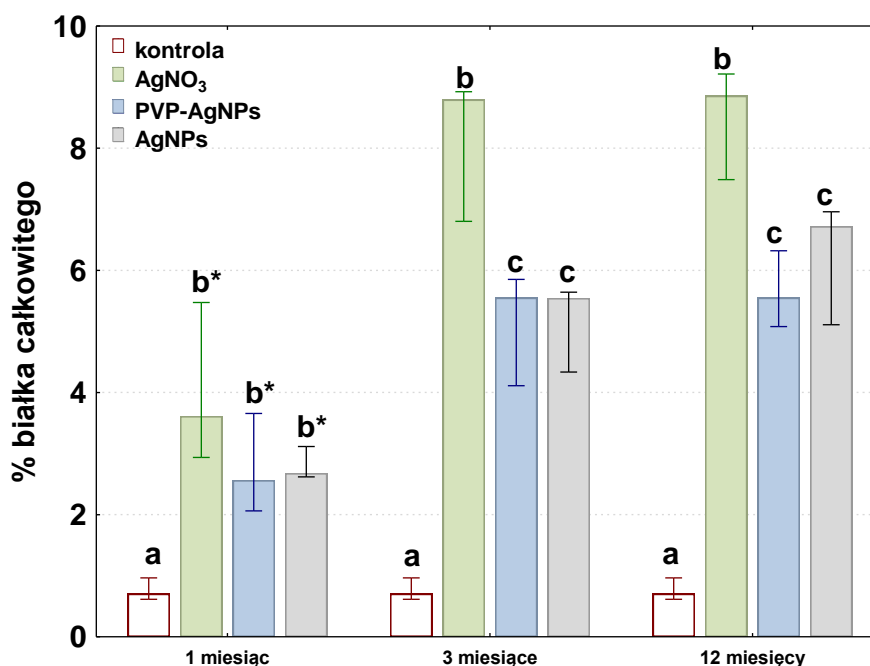
Wydłużenie czasu ekspozycji na działanie zastosowanych form srebra skutkowało istotnym zwiększeniem zawartości białek metalotioneinopodobnych (MTs) w hemolimfie samic pająka *S. grossa*. W przypadku ekspozycji trwającej jeden miesiąc notowano 10–krotny wzrost poziomu MTs we wszystkich analizowanych grupach badawczych, w odniesieniu do kontroli ($p = 0,04$). Trzymiesięczna suplementacja AgNO₃ wywołała 18–krotny ($p = 0,03$), a dwunastomiesięczna 20–krotny wzrost MTs ($p = 0,04$), w odniesieniu do grupy kontrolnej. W grupie narażonej na PVP–AgNPs odnotowano 10– ($p = 0,03$) i 11–krotny ($p = 0,04$) wzrost poziomu MTs, kolejno po trzech i dwunastu miesiącach ekspozycji, w odniesieniu do grupy kontrolnej. Z kolei trzy– i dwunastomiesięczna suplementacja pokarmu AgNPs skutkowało kolejno 11– ($p = 0,03$) i 15–krotnym ($p = 0,04$) wzrostem zawartości tych białek. Nie wykazano jednak różnic istotnych statystycznie w poziomie tego parametru pomiędzy komplementarnymi grupami (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) w badanych czasach ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) w tej tkance (Ryc. 4.31.; Aneks, Tab. A.13.).



Ryc. 4.31. Poziom białek metalotioneinopodobnych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w hemolimfie samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

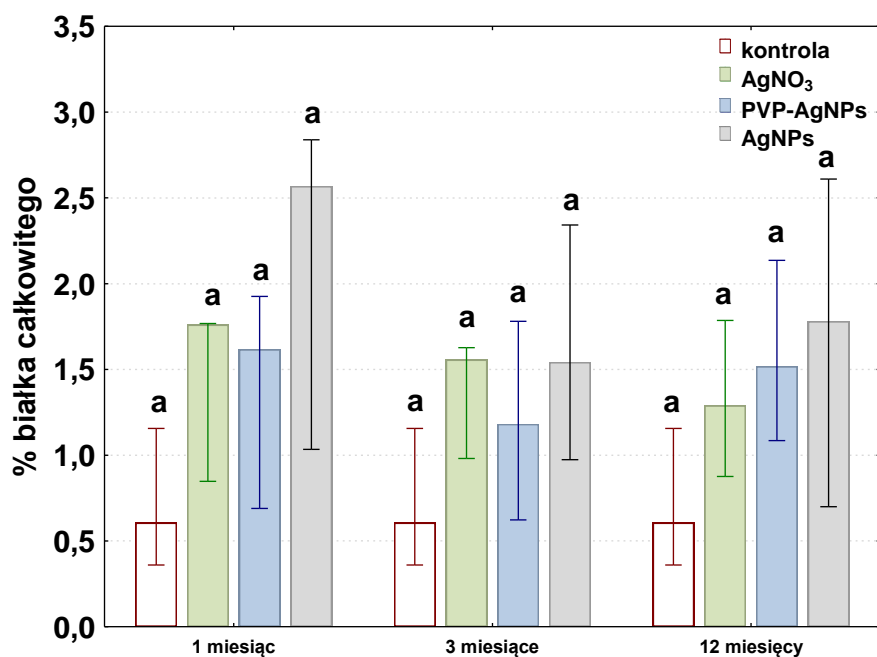
W przypadku gruczołu jelita środkowego również zaobserwowano istotny wzrost stężenia MTs, w odniesieniu do grupy kontrolnej po podaniu badanych form srebra w każdym czasie ekspozycji. W grupie samic narażonych na działanie AgNO₃ w pokarmie przez miesiąc wykazano 5-krotny wzrost ($p = 0,04$), a po 3 i 12 miesiącach 13-krotny wzrost stężenia białek metalotioneinopodobnych (odpowiednio: $p = 0,02$; $p = 0,02$), w stosunku do kontroli. Z kolei w grupie eksponowanej na PVP–AgNPs notowano 4-krotny wzrost MTs po miesiącu ekspozycji ($p = 0,04$), natomiast po 3 ($p = 0,02$) i 12 miesiącach ($p = 0,02$) 8-krotny wzrost poziomu tych białek, w odniesieniu do grupy kontrolnej. Splementacja pokarmu AgNPs, w porównaniu z kontrolą, skutkowała kolejno 4-, 8- i 10-krotnym wzrostem poziomu MTs po 1, 3 i 12 miesiącach ekspozycji (odpowiednio: $p = 0,04$; $p = 0,02$; $p = 0,02$). Jednocześnie wykazano istotne różnice w poziomie tego parametru pomiędzy komplementarnymi grupami (AgNO₃, PVP–AgNPs, AgNPs) w badanych czasach ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy). W grupie pajaków najkrócej narażonych na stosowane formy srebra poziom białek MTs był niższy od wartości notowanych u pajaków poddanych ekspozycji przez 3 i 12 miesięcy. Supplementacja pokarmu dla samic wybranymi formami srebra skutkowała średnio 2-krotnym wzrostem poziomu tych białek po trzy- i dwunastomiesięcznej

intoksykacji, w odniesieniu do krótkoterminowej ekspozycji (AgNO_3 : $p=0,03$; PVP-AgNPs: $p=0,04$; AgNPs: $p=0,04$) (Ryc. 4.32.; Aneks, Tab. A.13.).



Ryc. 4.32. Poziom białek metalotioneinopodobnych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w gruczole jelita środkowego samic pająka *S. grossa* ekspozowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b, c) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie w obrębie danej formy srebra (AgNO_3 , PVP-AgNPs, AgNPs) między badanymi czasami ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Kruskala–Wallisa; $p<0,05$); $n=6-10$.

W komórkach ampułkowatych gruczołów przednich nie odnotowano istotnych zmian w poziomie MTs, pomiędzy analizowanymi grupami badawczymi, w odniesieniu do grupy kontrolnej (Ryc. 4.33.; Aneks, Tab. A.13.).



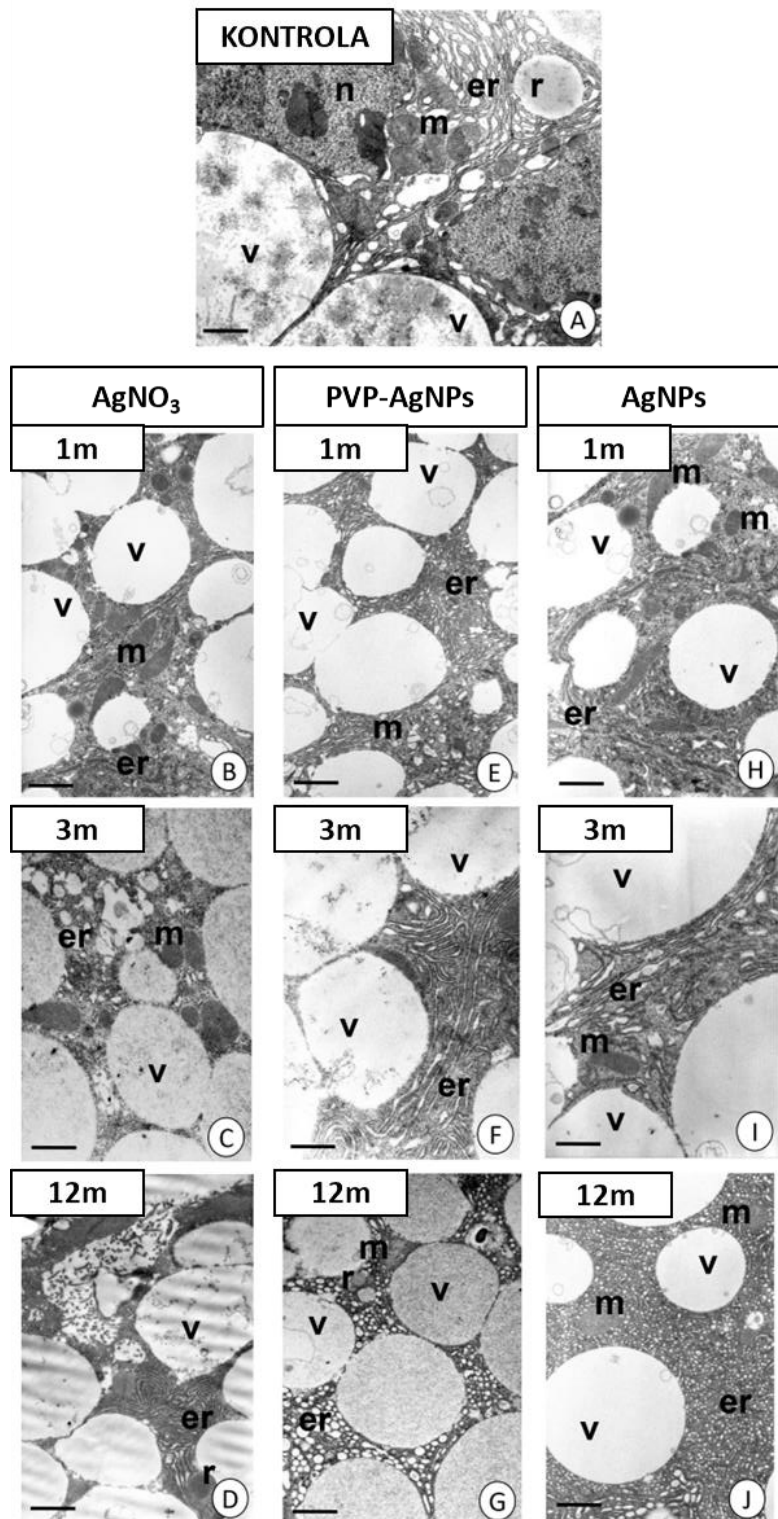
Ryc. 4.33. Poziom białek metalotioneinopodobnych (mediana; Q25 – kwartył dolny; Q75 – kwartył górny) w ampułkowatych gruczołach przednich samic pająka *S. grossa* eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Te same litery (a) oznaczają brak różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Kruskala–Wallisa; $p < 0,05$; test U Manna–Whitneya; $p < 0,05$); $n = 6 - 10$.

4.5. Ocena ultrastruktury komórek w wybranych tkankach

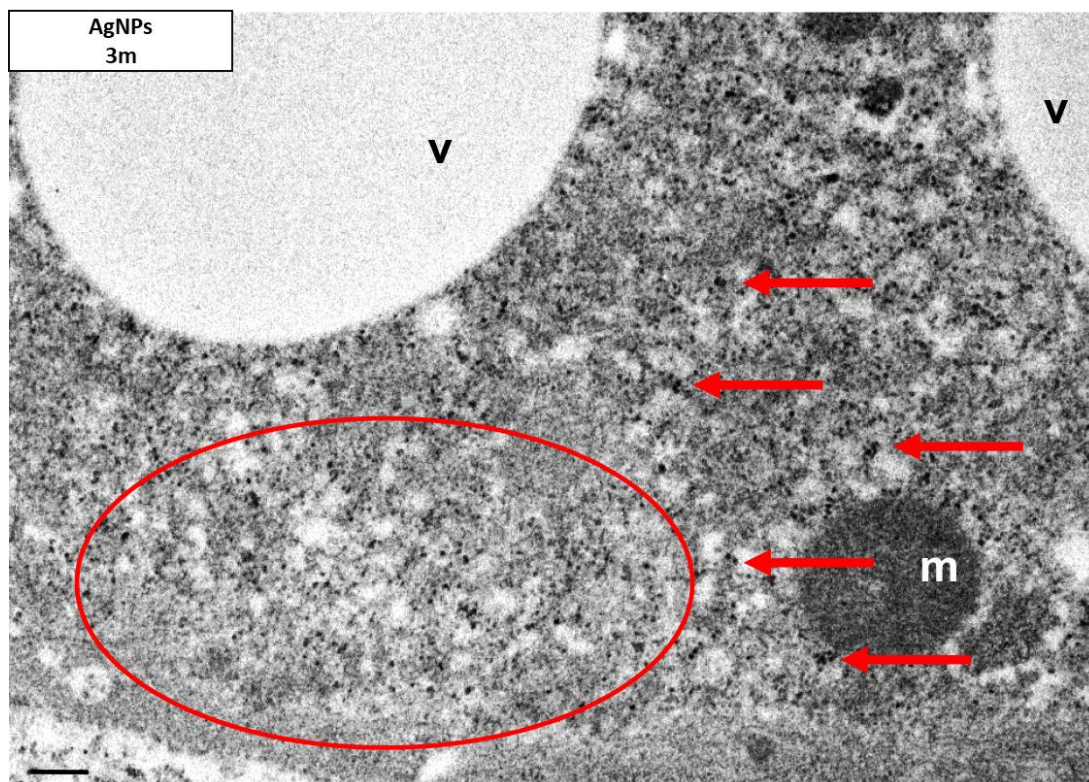
Gruczoły przedne pająków składają się z odcinka gruczołowego i długiego przewodu. Odcinek gruczołowy jest wyścielony nabłonkiem jednowarstwowym spoczywającym na bezkomórkowej blaszce podstawnej tworząc nabłonek wydzielniczy. W przypadku osobników kontrolnych cytoplazma apikalna tych komórek była bogata w cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego i niewielkie pęcherzyki o wnętrzu jasnym elektronowo. Błona apikalna komórek formowała mikrokosmki. W okolicy płatowatego jądra komórkowego identyfikowano liczne cysterny retikulum endoplazmatycznego szorstkiego. Cała cytoplazma była bogata w duże wakuole z materiałem kłaczkowatym wewnątrz i liczne mitochondria. Ponadto obserwowano nieliczne krople materiału zapasowego (Fot. 4.1. A). W przewodzie gruczołów przednich lokalizowano nabłonek jednowarstwowi, którego komórki zawierały głównie mitochondria oraz cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego.

W grupach eksperymentalnych eksponowanych na AgNO₃ po 1, 3 i 12 miesiącach zaobserwowano stopniową degenerację organelli i struktur komórkowych, która pogłębiała się wraz z wydłużającym się czasem eksperymentu. Cysterny retikulum endoplazmatycznego oraz mitochondria ulegały rozłączeniu, ilość kłaczkowatego materiału

wewnątrz wakuol malała, redukcji ulegały także krople materiału zapasowego (Fot. 4.1. B–D). W grupie AgNO_3 po roku ekspozycji wiele komórek gruczołu wykazywało cechy nekrotyczne z rozdętymi organellami oraz rozerwaną błoną komórkową (Fot. 4.1. D). W grupach narażonych na PVP–AgNPs po 1 oraz 3 miesiącach ekspozycji nie zaobserwowano żadnych zmian na poziomie ultrastrukturalnym w komórkach gruczołowych, w porównaniu z grupą kontrolną (Fot. 4.1. E–F). Natomiast w komórkach gruczołu osobników z grup PVP–AgNPs po roku ekspozycji (Fot. 4.1. G) cysterny retikulum endoplazmatycznego ulegały rozłączeniu, a w mitochondriach obserwowano mniejszą liczbę grzebieni mitochondrialnych. Tak więc w grupie tej uwidoczniło się aktywację procesów degeneracyjnych, jednak nie tak intensywną jak w grupie AgNO_3 po roku ekspozycji. W cytoplazmie komórek gruczołu osobników z grup AgNPs po 1, 3 i 12 miesiącach ekspozycji nie zaobserwowano żadnych zmian na poziomie ultrastrukturalnym, w porównaniu do grupy kontrolnej (Fot. 4.1. H–J). Jedynie w grupach tych pojawiły się liczne elektronowo gęste ziarnistości (Fot. 4.2.) nie obserwowane ani w kontroli, ani w pozostałych grupach eksperymentalnych.



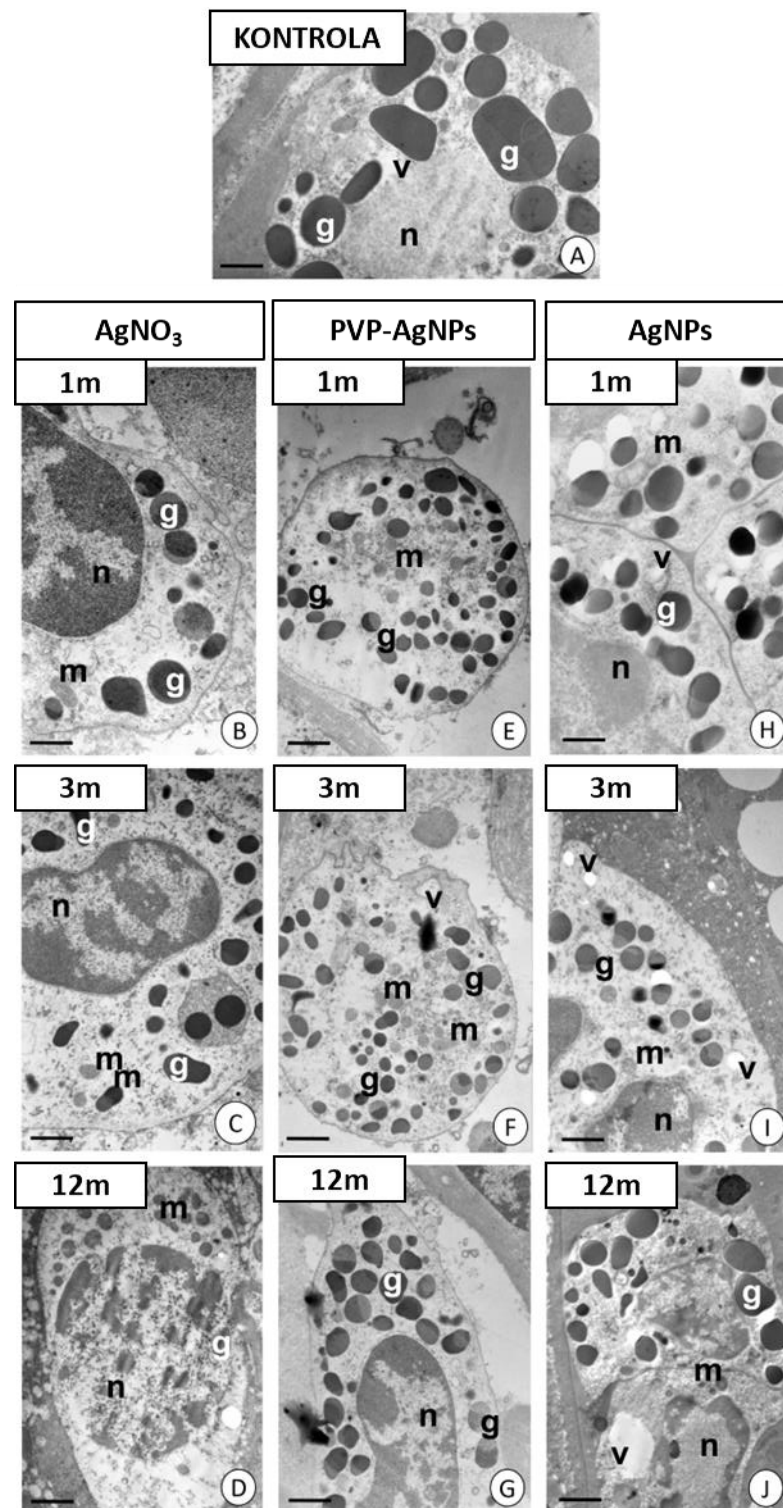
Fot. 4.1. Komórki sekrecyjne ampulkowatych gruczołów przednich *S. grossa* w grupie kontrolnej (A) oraz grupach eksperymentalnych: AgNO₃ 1 miesiąc (B), AgNO₃ 3 miesiące (C), AgNO₃ 12 miesięcy (D), PVP-AgNPs 1 miesiąc (E), PVP-AgNPs 3 miesiące (F), PVP-AgNPs 12 miesięcy (G), AgNPs 1 miesiąc (H), AgNPs 3 miesiące (I), AgNPs 12 miesięcy (J). Cysterny reticulum endoplazmatycznego (er), mitochondria (m), jądro komórkowe (n), wakuole (v), materiał zapasowy (r). TEM. (A) Bar = 1.1 μ m. (B) Bar = 1.7 μ m. (C) Bar = 1 μ m. (D) Bar = 1.8 μ m. (E) Bar = 1.7 μ m. (F) Bar = 1.1 μ m. (G) Bar = 1.6 μ m. (H) Bar = 1.7 μ m. (I) Bar = 1.1 μ m. (J) Bar = 1.8 μ m.



Fot. 4.2. Fragment komórki sekrecyjnej ampulkowatych gruczołów przednich samicy pająka *S. grossa* z grupy eksponowanej na AgNPs przez 3 miesiące. Mitochondria (m), wakuole (v), elektronowo-gęste ziarnistości (strzałki, okrąg). TEM. Bar = 0.3 μm .

Granulocyty będące najliczniejszymi hemocytami w hemolimfie pająków *S. grossa* posiadały płątowate lub owalne jądro komórkowe z elektronowo gęstymi skupiskami heterochromatyny. Cała cytoplazma była bogata w homo- i heterogenne granule z materiałem o różnej gęstości elektronowej, liczne mitochondria oraz ziarna glikogenu. Cytoplazma zawierała także pojedyncze niewielkie wakuole o wnętrzu jasnym elektronowo oraz cysterny retikulum endoplazmatycznego (Fot. 4.3. A). W cytoplazmie granulocytów grupy AgNO_3 po 1 i 3 miesiącach ekspozycji zaobserwowano zmniejszoną liczbę elektronowo gęstych granuli charakterystycznych dla tych komórek, natomiast zmiany w ultrastrukturze organelli komórkowych nie były odnotowane (Fot. 4.3. B–C). W grupie AgNO_3 po 12 miesiącach ekspozycji w cytoplazmie wielu granulocytów wykazano cechy nekrotyczne: jasną elektronowo i ubogą w organelle, których błony często są porozrywane. W takich granulocytach dochodziło do redukcji liczby elektronowo gęstych ziarnistości (Fot. 4.3. D). W grupie PVP–AgNPs po 1, 3 i 12 miesiącach ekspozycji cytoplazma była jasna elektronowo i dochodziło do zmniejszenia liczby organelli występujących na jej terenie. Organelle jednak nie posiadały zmienionej ultrastruktury, w porównaniu z grupą kontrolną (Fot. 4.3. E–G). W cytoplazmie granulocytów osobników z grupy AgNPs po 1, 3 i 12 miesiącach ekspozycji nie zaobserwowano żadnych zmian na poziomie ultrastrukturalnym, w porównaniu do grupy

kontrolnej (Fot. 4.3. H–J). Brak jednak elektronowo gęstych ziarnistości obserwowanych w cytoplazmie gruczołów przędnych z tych grup eksperymentalnych.



Fot. 4.3. Hemocyty *S. grossa* w grupie kontrolnej (A) oraz grupach eksperymentalnych: AgNO₃ 1 miesiąc (B), AgNO₃ 3 miesiące (C), AgNO₃ 12 miesięcy (D), PVP–AgNPs 1 miesiąc (E), PVP–AgNPs 3 miesiące (F), PVP–AgNPs 12 miesięcy (G), AgNPs 1 miesiąc (H), AgNPs 3 miesiące (I), AgNPs 12 miesięcy (J). Ziarnistości o różnej gęstości elektronowej (g), jądro komórkowe (n), wakuole (v), mitochondria (m). TEM. (A) Bar = 1.1 μm. (B) Bar = 1.4 μm. (C) Bar = 1.6 μm. (D) Bar = 1.7 μm. (E) Bar = 1.8 μm. (F) Bar = 1.8 μm. (G) Bar = 1.6 μm. (H) Bar = 1.3 μm. (I) Bar = 1.6 μm. (J) Bar = 1.5 μm.

4.6. Ilościowa i jakościowa ocena składu aminokwasów w przędzy łownej

Ilościowa i jakościowa analiza składu aminokwasów w przędzy łownej samicy pająka *S. grossa* metodą chromatografii cienkowarstwowej z densytometrią potwierdziła obecność czterech głównych aminokwasów budujących jedwab pajęczy – alaniny (Ala), glicyny (Gly), histydyny (His) i fenyloalaniny (Phe). Analiza jakościowa składu aminokwasowego oraz ilościowa ocena zawartości poszczególnych aminokwasów w analizowanych grupach badawczych nie wykazała istotnych różnic, w porównaniu do grupy kontrolnej (Tab. 4.2., 4.3.; Fot. 4.4.).



Fot. 4.4. Przykładowy chromatogram przedstawiający ścieżki rozdziału aminokwasów w hydrolizatach jedwabiu pajęczego uzyskanych od pająków należących do analizowanych grup badawczych (1 – kontrola, 2 – AgNO₃ 1 miesiąc, 3 – AgNO₃ 3 miesiące, 4 – AgNO₃ 12 miesięcy, 5 – PVP–AgNPs 1 miesiąc, 6 – PVP–AgNPs 3 miesiące, 7 – PVP–AgNPs 12 miesięcy, 8 – AgNPs 1 miesiąc, 9 – AgNPs 3 miesiące, 10 – AgNPs 12 miesięcy dla czterech wzorców α -aminokwasów (His, Gly, Phe i Ala).

Tab. 4.2. Wartości współczynnika korelacji (R_F), krzywe kalibracyjne oraz odpowiednie wartości LOD i LOQ dla czterech standardów α -aminokwasów (n = 6).

α -aminokwas	R_F (± 0.02)	krzywa kalibracji $y = ax + b$	współczynnik korelacji, r	SD	LOD [ng ⁻¹]	LOQ [ng ⁻¹]
L-histydyna (His)	0,11	$y = 116,9x + 273,6$	0,995	7,07	190	568
L-glicyna (Gly)	0,36	$y = 370,1x + 176,2$	0,990	16,22	156	459
L-alanina (Ala)	0,47	$y = 724,9x + 174,5$	0,989	20,99	102	304
L-feniloalanina (Phe)	0,74	$y = 199,2x + 144,9$	0,995	9,19	154	457

Tab. 4.3. Zawartość ($\mu\text{g} \cdot \text{mg jedwabiu}^{-1}$) czterech α -aminokwasów w sieciach pajęczych (pochodzących z grupy kontrolnej oraz z grup eksponowanych na AgNO_3 , AgNPs-PVP i AgNPs przez okres odpowiednio 1 miesiąca, 3 miesięcy i 12 miesięcy) oraz całkowita zawartość czterech α -aminokwasów w badanym jedwabiu pajęczym ($n = 6$).

α -aminokwas	R_F (± 0.02)	kontrola	$\mu\text{g} \cdot \text{mg jedwabiu}^{-1}$								
			AgNO_3			AgNPs-PVP			AgNPs		
			1 miesiąc	3 miesiące	12 miesiące	1 miesiąc	3 miesiące	12 miesiące	1 miesiąc	3 miesiące	12 miesiące
L-histydyna (His)	0,11	127,02	122,41	121,36	121,36	124,52	126,32	125,72	121,46	123,86	12,,11
L-glicyna (Gly)	0,36	130,28	122,87	126,81	125,78	127,94	128,58	129,38	124,73	125,37	128,27
L-alanina (Ala)	0,47	115,24	111,96	109,16	114,07	119,78	116,14	115,42	113,26	116,06	112,54
L-fenylalanina (Phe)	0,74	163,49	156,85	151,89	158,99	177,17	168,29	165,99	161,84	160,93	162,03
Suma		536,02	514,09	509,19	520,36	549,41	539,33	536,51	521,29	526,22	528,95

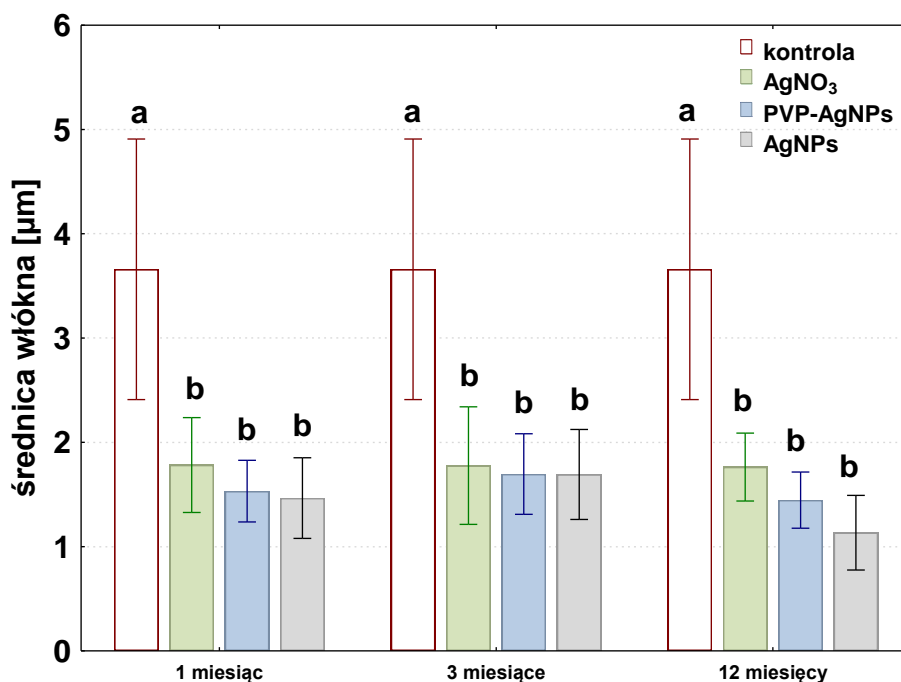
4.7. Ocena architektury sieci

Niezależnie od zastosowanej formy srebra oraz zadanego czasu ekspozycji, zarówno w przypadku struktur jednoniciowych, dwuniciowych jak i wieloniciowych obserwowano istotne zmniejszenie średnicy włókien, w porównaniu z grupą kontrolną.

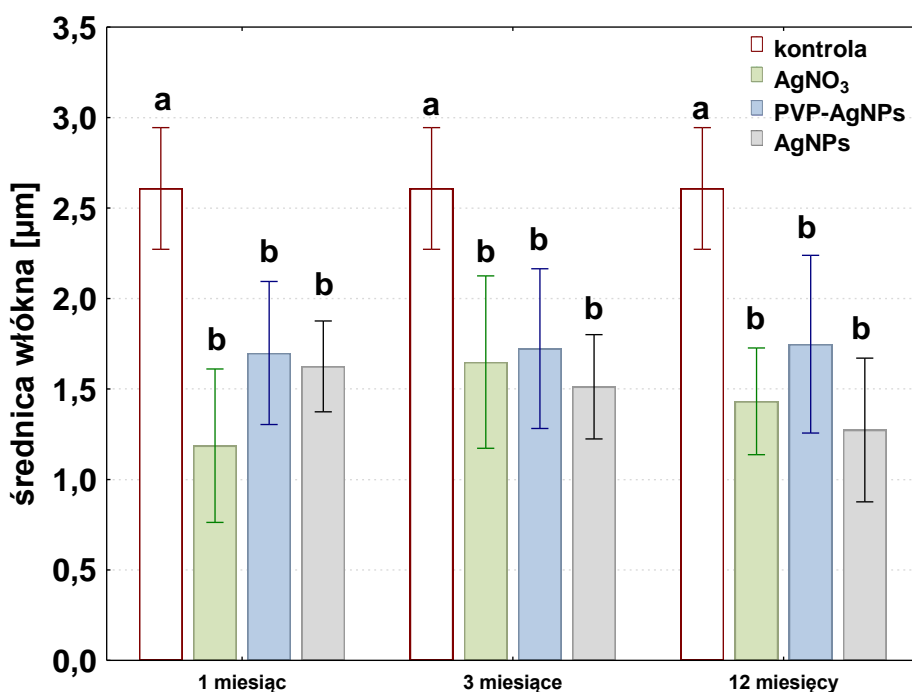
Ekspozycja na AgNO_3 spowodowała zmniejszenie średnicy włókien pojedynczych o 51% (odpowiednio dla 1 miesiąc: $p=0,01$; 3 miesiące: $p=0,003$; 12 miesięcy: $p=0,001$), w strukturach dwuniciowych średnica włókna zmniejszyła się o 54% ($p=0,0002$), 48% ($p=0,0001$) i 50% ($p=0,0002$), natomiast w strukturach wieloniciowych o 48% ($p=0,0001$), 32% ($p=0,0001$) i 52% ($p=0,0001$), kolejno po 1, 3, i 12 miesiącach narażenia na AgNO_3 , w odniesieniu do kontroli (Ryc. 4.34.; Ryc. 4.35.; Ryc. 4.36.; Aneks, Tab. A.14.; Fot. 4.5.; Fot. 4.6.; Fot. 4.7.).

Podawanie PVP–AgNPs w pokarmie, kolejno przez 1, 3, i 12 miesięcy, skutkowało zmniejszeniem średnicy włókna o 59% ($p=0,002$), 54% ($p=0,002$) i 62% ($p=0,0014$) w strukturach jednoniciowych, 19% ($p=0,0002$), 38% ($p=0,0001$) i 19% ($p=0,0002$) w strukturach dwuniciowych oraz 32% ($p=0,007$), 28% ($p=0,0001$) i 52% ($p=0,0001$) w strukturach wieloniciowych, w porównaniu do wartości kontrolnych (Ryc. 4.34.; Ryc. 4.35.; Ryc. 4.36.; Aneks, Tab. A.14.; Fot. 4.5.; Fot. 4.6.; Fot. 4.7.).

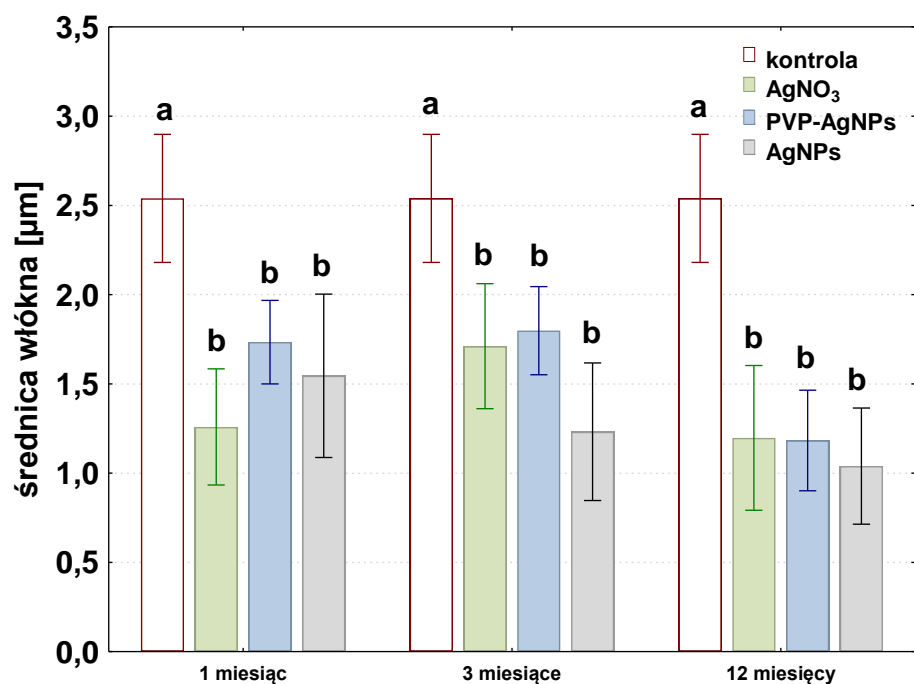
Suplementacja pokarmu AgNPs spowodowała zmniejszenie średnicy włókien w strukturach jednoniciowych średnio o 59% ($p=0,001$), 54% ($p=0,001$) i 70% ($p=0,0003$), w strukturach dwuniciowych o 38% ($p=0,0002$), 42% ($p=0,0001$) i 54% ($p=0,0002$), natomiast w strukturach wieloniciowych o 40% ($p=0,0001$), 52% ($p=0,0001$) i 56% ($p=0,0001$), kolejno po 1, 3 i 12 miesiącach (Ryc. 4.34.; Ryc. 4.35.; Ryc. 4.36.; Aneks, Tab. A.14.; Fot. 4.5.; Fot. 4.6.; Fot. 4.7.).



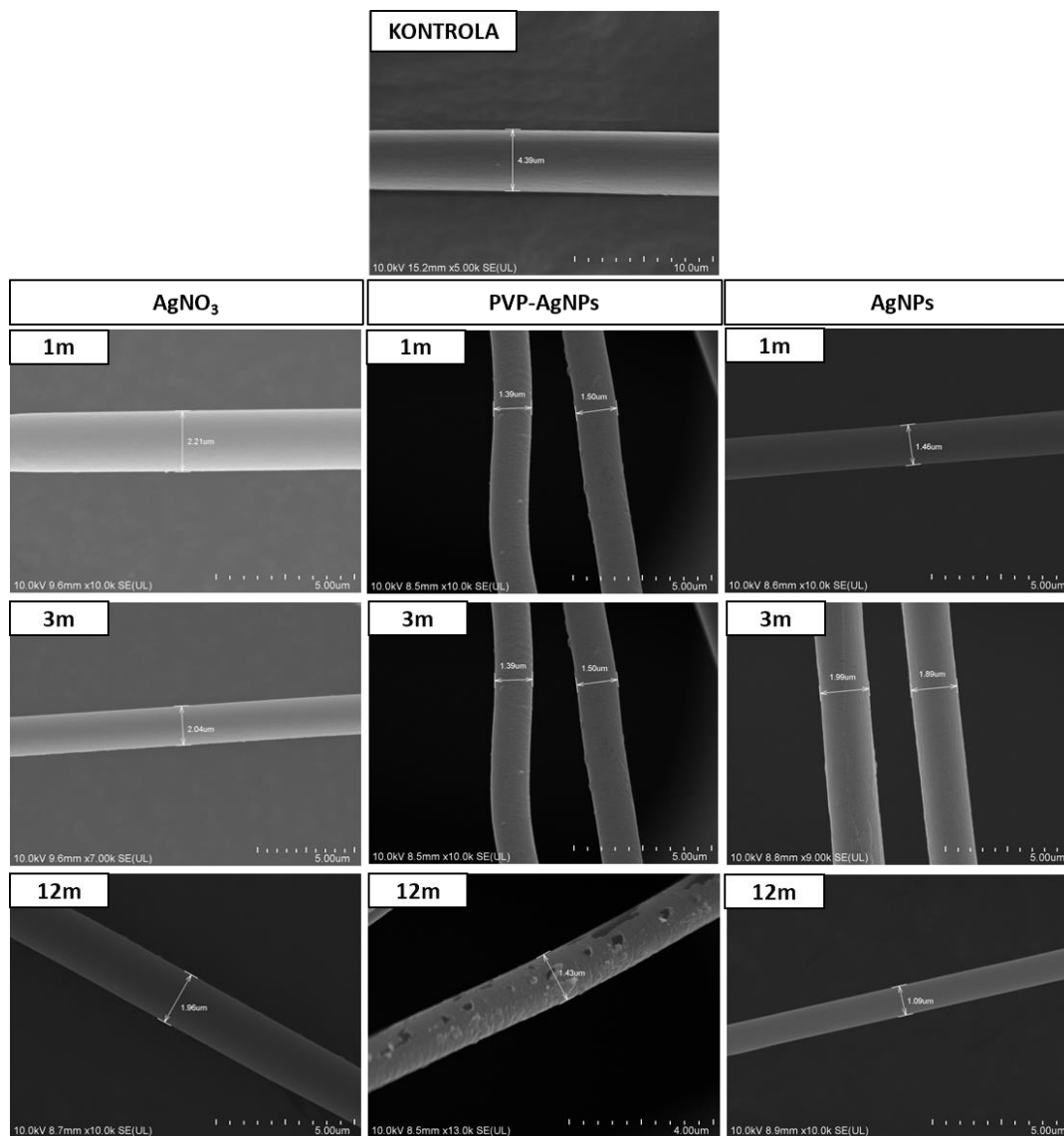
Ryc. 4.34. Porównanie średnicy pojedynczych włókien jedwabiu pajęczego samic pająka *S. grossa* (μm) (średnia \pm SD) eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Tukey'a; $p < 0,05$; test t-Studenta; $p < 0,05$); $n = 15 - 20$.



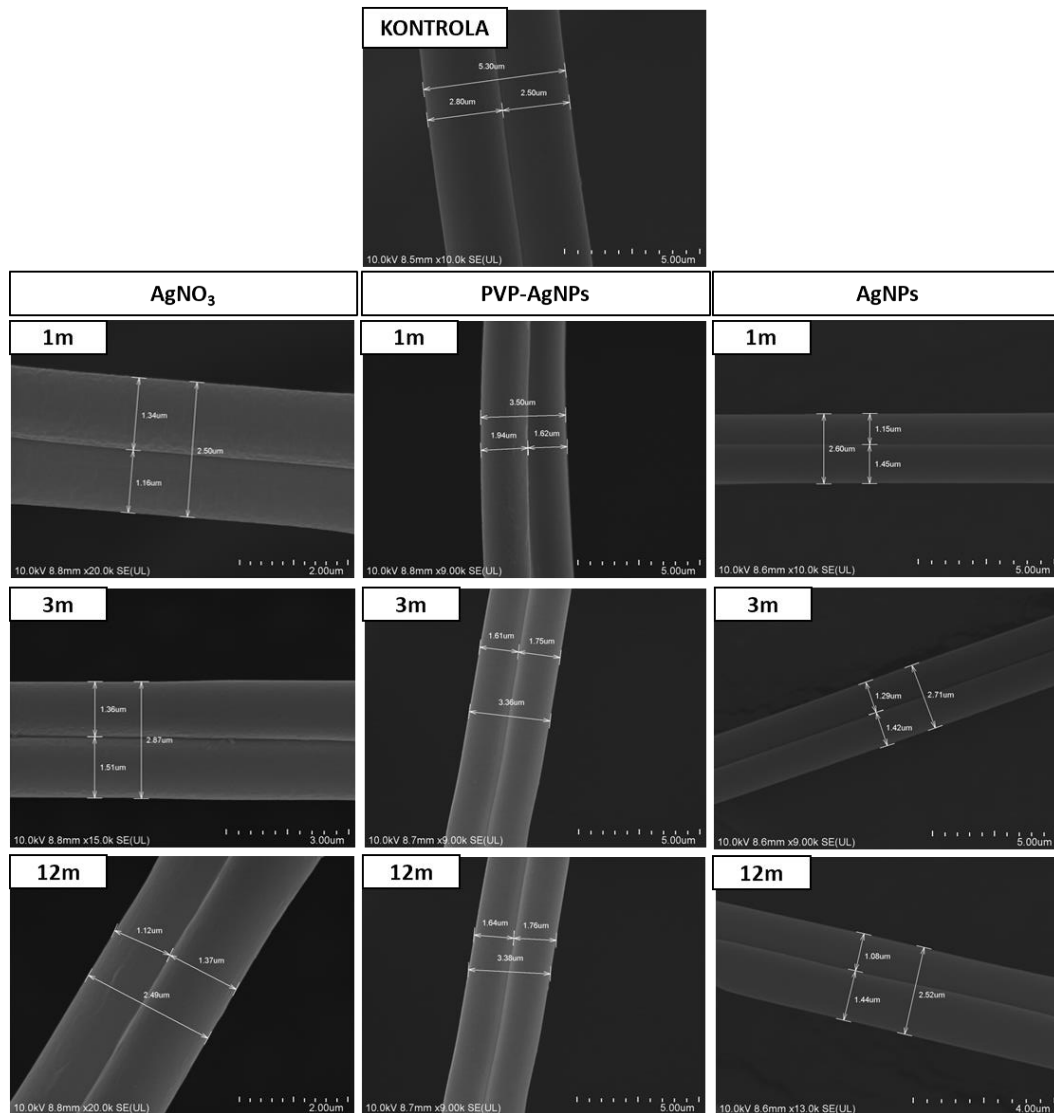
Ryc. 4.35. Porównanie średnicy włókien w strukturach dwuniciowych jedwabiu pajęczego samic pająka *S. grossa* (μm) (średnia \pm SD) eksponowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Tukey'a; $p < 0,05$; test t-Studenta; $p < 0,05$); $n = 15 - 20$.



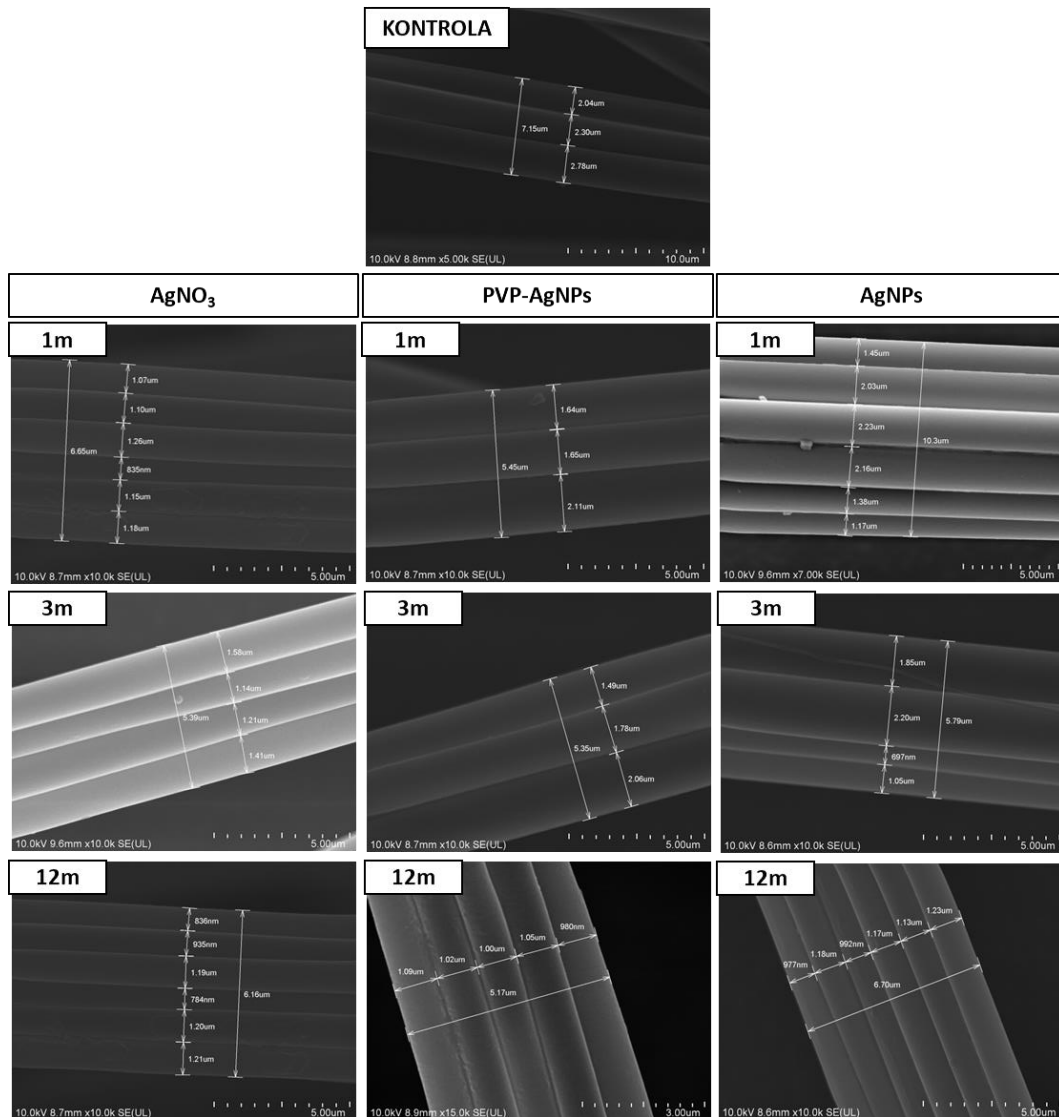
Ryc. 4.36. Porównanie średnicy włókien w strukturach wieloniciowych jedwabiu pajęczego samic pająka *S. grossa* (μm) (średnia \pm SD) ekspozowanych na wybrane formy srebra przez okres 1, 3 i 12 miesięcy. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy grupami narażonymi na poszczególne formy srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Tukey'a; $p < 0,05$; test t-Studenta; $p < 0,05$); $n = 15 - 20$.



Fot. 4.5. Wizualizacja reprezentatywnych włókien (μm) występujących jako pojedyncze struktury w sieciach produkowanych przez samice *Steatoda grossa* z poszczególnych grup doświadczalnych (1m, 3m, 12m – czas ekspozycji na metal; AgNO₃, PVP-AgNPs, AgNPs – związki, którymi suplementowano pożywki, na których hodowano ofiary pajaków).

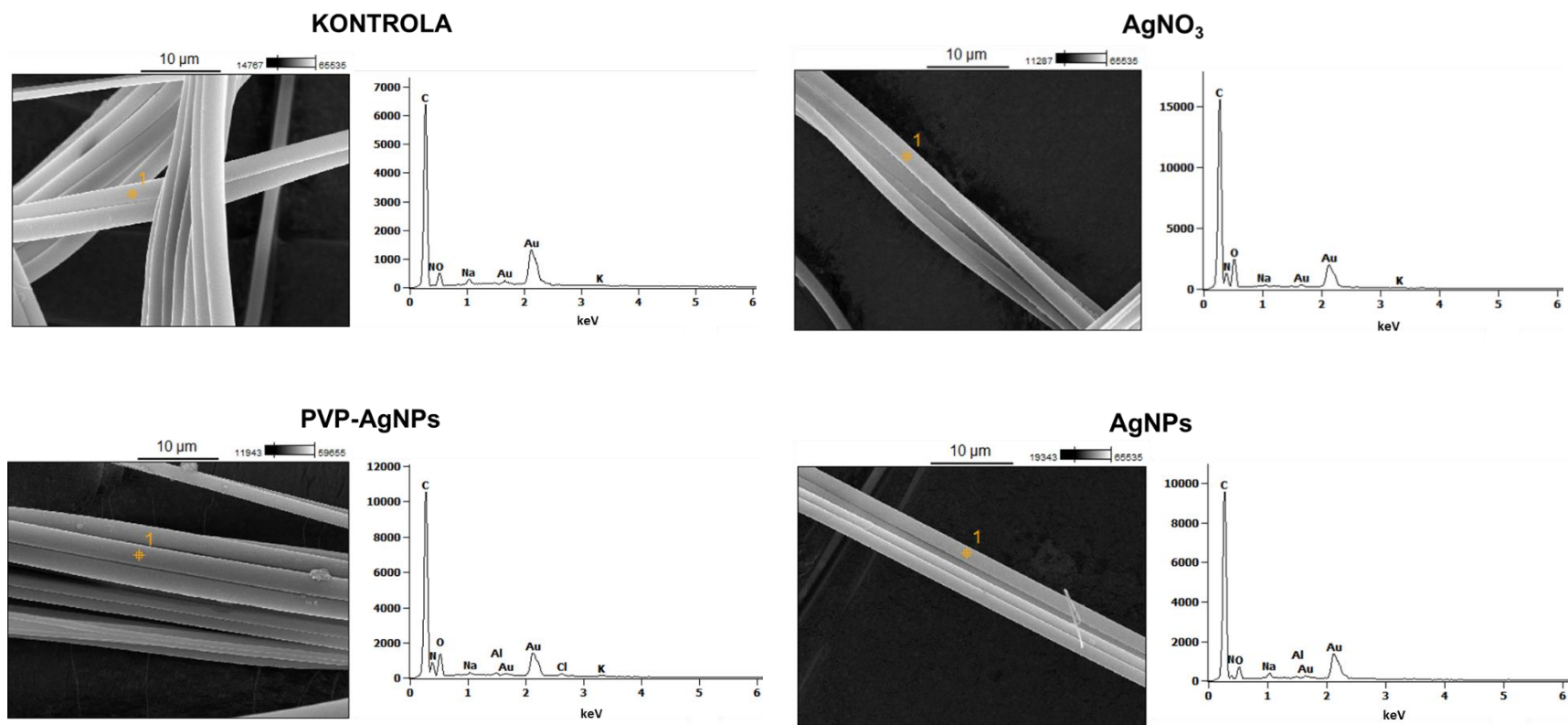


Fot. 4.6. Wizualizacja reprezentatywnych włókien (μm) występujących jako struktury dwuniciowe w sieciach produkowanych przez samice *Steatoda grossa* z poszczególnych grup doświadczalnych (1m, 3m, 12m – czas ekspozycji na metal; AgNO_3 , PVP-AgNPs, AgNPs – związki, którymi suplementowano pożywki, na których hodowano ofiary pająków).



Fot. 4.7. Wizualizacja reprezentatywnych włókien (μm) występujących jako struktury wieloniciowe w sieciach produkowanych przez samice *Steatoda grossa* z poszczególnych grup doświadczalnych (1m, 3m, 12m – czas ekspozycji na metal; AgNO₃, PVP-AgNPs, AgNPs – związki, którymi suplementowano pożywkę, na których hodowano ofiary pająków).

Dodatkowo dla wszystkich analizowanych grup uzyskano obrazy SEM i odpowiadające im widma EDX. Fot. 4.8. pokazuje przykładowe mikrofotografie i widma emisji promieniowania rentgenowskiego dla losowo wybranych punktów we włóknach jedwabiu, uzyskanych w poszczególnych grupach badawczych. Wyniki analizy EDX wykazały w składzie pierwiastkowym wybranych obszarów pasm głównie węgiel, azot i tlen, które powszechnie występują w aminokwasach budujących jedwab pajęczy. Sygnały świadczące o obecności złota i aluminium wynikały z obecności tych pierwiastków w powłoce napylającej i stoliku, do którego przymocowano sieci. Analiza EDX nie potwierdziła obecności srebra w sieciach.



Fot. 4.8. Przykłady obrazów SEM i odpowiadających im widm EDX uzyskanych dla nici wytwarzanych przez samice narażone na Ag; zawartość srebra osiągnęła 0%.

4.8. Ocena kaloryczności sieci łownych

Przeprowadzona ocena kaloryczności sieci łownych w przeliczeniu na $J \cdot g^{-1}$ suchej masy jedwabiu nie wykazała istotnych różnic pomiędzy analizowanymi grupami badawczymi, w odniesieniu do grupy kontrolnej (Tab. 4.4.; Aneks, Tab. A.15.).

Analiza kaloryczności sieci w przeliczeniu na osobnika po intoksykacji $AgNO_3$ wykazała 43% ($p=0,04$), 62% ($p=0,0002$) i 43% ($p=0,02$) zmniejszenie kaloryczności sieci, kolejno po 1, 3 i 12 miesiącach ekspozycji, w porównaniu do kontroli. W przypadku podania pokarmu suplementowanego PVP–AgNPs spadek ten wynosił 50% ($p=0,012$), 57% ($p=0,0002$) i 45% ($p=0,03$) w odniesieniu do kontroli, natomiast narażenie na AgNPs spowodowało spadek na poziomie 52% ($p=0,01$), 57% ($p=0,0002$) i 48% ($p=0,03$), kolejno po 1, 3 i 12 miesiącach ekspozycji, w porównaniu z grupą kontrolną (Tab. 4.4.; Aneks, Tab. A.16.).

Tab. 4.4. Wartości kaloryczne sieci łownych w przeliczeniu na $J \cdot g^{-1}$ suchej masy jedwabiu oraz w przeliczeniu na osobnika. Różne litery (a, b) oznaczają różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi formami srebra w danym czasie ekspozycji (1, 3 lub 12 miesięcy) i w odniesieniu do kontroli (test Tukey'a; $p < 0,05$; test t-Studenta; $p < 0,05$); * oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy komplementarnymi grupami (kontrola, $AgNO_3$, PVP-AgNPs, AgNPs) w badanych czasach ekspozycji (1, 3 i 12 miesięcy) (test Tukey'a; $p < 0,05$); $n=10 - 15$.

$J \cdot g^{-1}$ suchej masy jedwabiu										
	$AgNO_3$			AgNPs-PVP			AgNPs			
	kontrola	1 miesiąc	3 miesiące	12 miesięcy	1 miesiąc	3 miesiące	12 miesięcy	1 miesiąc	3 miesiące	12 miesięcy
średnia	21,952 ^a	22,531 ^a	18,365 ^a	21,517 ^a	16,595 ^a	23,069 ^a	14,764 ^b	16,655 ^a	21,683 ^a	14,045 ^b
SD	±1,825	±4,405	±4,645	±4,873	±5,908	±10,680	±6,211	±6,256	±8,618	±5,936
J/osobnika										
	$AgNO_3$			AgNPs-PVP			AgNPs			
	kontrola	1 miesiąc	3 miesiące	12 miesięcy	1 miesiąc	3 miesiące	12 miesięcy	1 miesiąc	3 miesiące	12 miesięcy
średnia	25,500 ^a	12,027 ^b	7,908 ^{b*}	11,895 ^b	10,495 ^b	8,958 ^b	11,626 ^b	9,944 ^b	9,137 ^b	11,354 ^b
SD	±4,799	±3,033	±1,768	±4,105	±5,031	±1,366	±4,603	±5,282	±0,494	±4,865

5. DYSKUSJA

Nanocząstki wykorzystuje się w wielu gałęziach przemysłu, a ich obecność w produktach stosowanych w życiu codziennym staje się coraz bardziej powszechna. Początkowe przekonanie badaczy, że nanocząstki nie wywołują niekorzystnych zjawisk w środowisku naturalnym i w organizmach, jest obecnie kwestionowane. Szybki i niekontrolowany rozwój nanotechnologii prowadzi do występowania zagrożeń związanych z emisją nanocząstek do atmosfery, zbiorników wodnych i gleby, gdzie mogą one ulegać transformacjom lub gromadzeniu. Jak wykazano, szczególne niebezpieczeństwo mogą stanowić nanocząstki nieorganiczne, które są oparte o metale ciężkie. Losy nanocząstek w środowisku nie są do końca poznane, nie można więc wykluczyć powstania bardziej toksycznych połączeń. W związku z tym, stopniowo wdrażane są metody oceny zagrożeń środowiskowych, związanych z ich stosowaniem oraz wprowadzane są normy środowiskowego i zawodowego narażenia na takie formy zanieczyszczeń (Stander i in., 2011; Hristozov i in., 2016; Velicogna i in., 2016; Vazquez–Muñoz i in., 2017; Vogt i in., 2019; Ale i in., 2024). Jednakże rzetelna analiza zagrożeń jest trudna do przeprowadzenia ze względu na duże zróżnicowanie toksyczności poszczególnych nanocząstek, nawet jeśli zostały one utworzone z tego samego materiału.

Utrzymanie homeostazy organizmu bezpośrednio koreluje ze skuteczną adaptacją do czynników stresowych, występujących w środowisku naturalnym. Jak przedstawiono we wstępie, nanosrebro jest induktorem stresu oksydacyjnego na poziomie komórkowym, a generowane reaktywne formy tlenu (ROS) zaburzają procesy metaboliczne oraz aktywność enzymów antyoksydacyjnych i detoksykacyjnych (Carlson i in., 2008; Foldbjerg i in., 2009; Yin i in., 2013; Gliga i in., 2014; Sendra i in., 2017; Ale i in., 2018a; Ale i in., 2018b; Hazeem i in., 2019; Pham, 2019; Ale i in., 2024). W dostępnej literaturze brakuje informacji na temat wpływu nanocząstek, w tym nanosrebra na pająki. Pająki będąc konsumentami drugiego i wyższych rzędów, odgrywają kluczową rolę w obiegu materii i energii w sieciach troficznych. Jednak ta pozycja w łańcuchach pokarmowych sprzyja wysokim stężeniom metali w ich ciele w wyniku procesów biomagnifikacji. Powszechna obecność pajaków w środowiskach skażonych metalami, wskazuje na powstawanie i wykorzystanie specyficznych mechanizmów adaptacyjnych, które chronią te drapieżniki przed szkodliwym działaniem metali, przedostających się do ich organizmu przede wszystkim przez układ pokarmowy. W niniejszej pracy analizowano, czy i do jakiego stopnia srebro w postaci AgNO_3

i w dwóch różnych formach nanometrycznych (PVP–AgNPs; nanosrebro w osnowie poliwinylpirolidonu i AgNPs; niejonowe srebro koloidalne), podane pająkom *Steatoda grossa* (Theridiidae) w uproszczonym modelu łańcucha pokarmowego (pożywka suplementowana różnymi formami srebra → muchy *Drosophila hydei* → pająk), mogą powodować efekty cytotoksyczne w wybranych narządach (gruczołach przędnych, gruczole jelita środkowego i hemolimfie) oraz modyfikować właściwości fizykochemiczne przędzy łownej. Prowadzenie badań w aspekcie krótko- i długoterminowej intoksykacji miało na celu ocenić stopień zmian degeneracyjnych i metabolicznych w wymienionych tkankach.

5.1. Stężenie srebra w ciałach pająków

Pająki jako bezkręgowce drapieżne i polifagiczne są zaliczane do makrokoncentratorów metali, czyli gatunków kumulujących metale powyżej stężenia środowiskowego (Dallinger, 1993). Badania ekotoksykologiczne wykazały, że różnice w poziomie kumulacji metali przez pająki zależą zarówno od rodzaju odławianych ofiar, jak również strategii zdobywania pokarmu i intensywności łowieckiej (Babczyńska i in., 2011a; Wilczek, 2017). Wykazano, że aktywnie polujące gatunki (nie budujące sieci) gromadzą znacznie większe stężenia metali w ciele, w porównaniu do gatunków sieciowych. Poziom metali może być zróżnicowany także w zależności od płci i wieku osobników (Wilczek i in., 2008; Migula i in., 2013; Wilczek, 2017; Rybak i in., 2019).

Większość danych literaturowych odnośnie transferu srebra w łańcuchach pokarmowych odnosi się do pobierania AgNPs przez organizmy na skutek jednorazowych ekspozycji na określone stężenia metali w kontrolowanych testach laboratoryjnych (Makama i in., 2016). W kilku doniesieniach opisano także procesy bioakumulacji srebra obecnego w glebie w formie AgNPs wraz z drogą przemieszczania się metalu z gleby do sieci troficznych, z uwzględnieniem możliwości pobierania tego pierwiastka przez organizmy denne, rośliny i ryby, wraz z prognozowanymi konsekwencjami dla organizmu człowieka (Zhao i in., 2021). Krótko- i długoterminowa (do 52 tygodni) ekspozycja na AgNPs potwierdziła wyraźną zdolność do przyswajania i akumulacji srebra u skąposzczetów z gatunku *Eisenia fetida* (Diez–Ortiz i in., 2015). Z kolei wyniki badań 28-dniowej ekspozycji na różne formy AgNPs wskazały na zróżnicowanie szybkości bioakumulacji u dżdżownic *Lumbricus rubellus* w zależności od rodzaju zastosowanej osnowy dla nanocząstek (Makama i in., 2016). Ponadto absorpcja i akumulacja AgNPs została wielokrotnie wykazana u organizmów wodnych.

Na przykład ryby słodkowodne (*Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus*, *Cyprinus carpio*) gromadziły AgNPs w mózgu, jelitach, skrzelach i wątrobie zarówno po krótkotrwałym, jak i długotrwałym narażeniu na metal (Lee i in., 2012; Ale i in., 2018a; Ale i in., 2018b; Cazenave i in., 2019; Ale i in., 2021a; Ale i in., 2021b; Haghghat i in., 2021). Podobne wyniki otrzymano w przypadku słodkowodnych stawonogów zaliczanych do grupy wioślarek *Daphnia similis* (Artal i in., 2013; Yan i in., 2020). W innych badaniach, pomimo przewidywalnej sedymentacji w wodzie morskiej i potencjalnego zmniejszenia biodostępności metalu, bioakumulację AgNPs zaobserwowano także u małży morskich np. *Mytilus galloprovincialis*, *Chlamys islandica*, *Scrobicularia plana* (Al-Sid-Cheikh i in., 2013; Buffet i in., 2013; Ale i in., 2019) oraz wieloszczetów *Nereis diversicolor* w ujściach rzek (Cong i in., 2014; Garcia-Reyero i in., 2015). Z kolei w przypadku słodkowodnych alg z gatunku *Chlorella vulgaris* i *Ochromonas danica* wykazano, że AgNPs są wiązane na powierzchni komórek i nie są przez nie przyswajane, natomiast jony Ag^+ są w stanie przeniknąć do komórek (Miao i in., 2010; Kalman i in., 2015; Chen i in., 2019; Corsi i in., 2022).

W przypadku zastosowania układu eksperymentalnego z samicami pająka *S. grossa* eksponowanymi krótko- i długoterminowo na wybrane formy srebra, odnotowano wzrost stężenia tego pierwiastka w ciele wraz z wydłużeniem czasu narażenia, względem grupy kontrolnej. Po dwunastomiesięcznej ekspozycji, stężenie srebra w grupach otrzymujących srebro w karmie w postaci $AgNO_3$, PVP-AgNPs lub AgNPs wzrosło odpowiednio 65-, 43- i 45-krotnie, w odniesieniu do grupy otrzymującej karmę niezanieczyszczoną. Dodatkowo, stężenie srebra w ciele osobników otrzymujących pokarm zanieczyszczony przez okres 12 miesięcy było średnio 26-, 22- i 28-krotnie wyższe, niż u pająków eksponowanych na srebro przez cztery tygodnie, kolejno w grupach suplementowanych $AgNO_3$, PVP-AgNPs i AgNPs. Otrzymane rezultaty wskazują, że zdolność do gromadzenia srebra przez *S. grossa* jest zależna od formy metalu, którą suplementowano ofiary pająków. Zanieczyszczenie karmy formami nanocząstek srebra, skutkowało niższym stężeniem tego pierwiastka w ciele pająków po długotrwałej ekspozycji, niż w przypadku podania $AgNO_3$. Dodatkowo zawartość srebra w ciele pająków zależała od długości okresu narażenia na zanieczyszczony pokarm. W związku z tym, że w trakcie trwania eksperymentu nie obserwowano nasilonej śmiertelności osobników w grupach narażonych na srebro, w porównaniu z kontrolą, można wnioskować, że *S. grossa* cechują się dużą tolerancją na wysokie stężenia tego metalu w organizmie.

5.2. Wpływ AgNPs na parametry antyoksydacyjne i efekt cytotoksyczny

Ekspozycja organizmu na zanieczyszczenia, w tym nanocząstki srebra, może być źródłem stresu oksydacyjnego, wynikającego ze zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (ROS) i/lub hamowania aktywności przeciwutleniającej systemów antyoksydacyjnych komórek (Park i in., 2010; McShan i in., 2014). W literaturze można znaleźć wiele doniesień dotyczących biodystrybucji AgNPs w organizmach, ale wiedza dotycząca mechanizmów ich toksyczności wciąż wymaga dalszych badań i uzupełnienia. Szczególnie mało uwagi poświęca się badaniu form nanometrycznych srebra w warunkach *in vivo*, pomimo ich narastającej obecności w produktach konsumenckich i różnych technologiach.

Większość zmian biochemicznych w komórkach była spowodowana toksycznością AgNPs, co zostało potwierdzone w kilku modelach *in vitro* (Ale i in., 2024). AgNPs ze względu na silną reaktywność powodują wzmożenie produkcji reaktywnych form tlenu, których skutki cytotoksyczne wykazano w badaniach prowadzonych na różnych grupach zwierząt (Carlson i in., 2008; Gliga i in., 2014). Analiza markerów stresu oksydacyjnego w organizmach narażonych na działanie AgNPs, pozwoliła potwierdzić, że jest to jeden z głównych mechanizmów toksyczności wymienionych form srebra w odpowiedzi na ich internalizację do komórek (zjawisko znane również jako „efekt konia trojańskiego”) (Park i in., 2010; McShan i in., 2014). Po przedostaniu się do komórek, AgNPs generują wytwarzanie reaktywnych form tlenu i w konsekwencji aktywację układu antyoksydacyjnego. Nadprodukcja ROS może spowodować uszkodzenia oksydacyjne w składnikach komórkowych, takich jak DNA, białka i lipidy (Rocha i in., 2013). Wykazano, że AgNPs zmniejszają przeżywalność wielu ssących linii komórkowych, np.: monocytów (Foldbjerg i in., 2009) i makrofagów (Carlson i in., 2008). Stwierdzono, że jest to spowodowane powstaniem stresu oksydacyjnego i nadprodukcją ROS, która prowadzi do śmierci komórkowej na drodze nekrozy lub apoptozy (Carlson i in., 2008; Foldbjerg i in., 2009). Podobne rezultaty związane z nasileniem procesów śmierci komórkowej uzyskano w przypadku inkubacji szczurzych komórek ziarnistych mózdzku z AgNPs. Nanocząstki srebra powodowały wzrost produkcji ROS, czemu towarzyszyło zmniejszenie puli zredukowanego glutationu (GSH) (Yin i in., 2013). Nasilenie stresu oksydacyjnego obserwowano również podczas ekspozycji pierwotnych korowych komórek neuronalnych na AgNPs. W tym przypadku odnotowano wzrost produkcji ROS, karbonylację białek i podwyższoną ekspresję białka HO-1 (Haase i in., 2012), mającego właściwości przeciwutleniające i cytoprotekcyjne

oraz biorącego udział w wyciszeniu stanu zapalnego (Kozakowska i in., 2015). Szczególnie u gatunków fitoplanktonowych szeroko opisuje się uszkodzenia oksydacyjne w przypadku zanieczyszczeń wody AgNPs (Sendra i in., 2017; Hazeem i in., 2019; Pham, 2019). Zmiany aktywności enzymów przeciwutleniających opisano między innymi w wątrobie i skrzelach ryb słodkowodnych, jako narządów najbardziej narażonych na działanie AgNPs (Lee i in., 2012; Bacchetta i in., 2017; Ale i in., 2018a; Ale i in., 2018b). Wśród opisanych enzymów przeciwutleniających najczęściej badano dysmutazę ponadtlenkową (SOD), katalazę (CAT) i S-transferazę glutationową (GST). Poza tym użytecznym markerem nieenzymatycznym okazał się GSH, którego poziom był istotnie obniżony oraz wielkość całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC) (Massarsky i in., 2014; Taju i in., 2014; Ale i in., 2021a; Ale i in., 2021b).

Dotychczasowe analizy procesów detoksykacyjnych u pajaków narażonych na działanie metali, przeprowadzone u osobników odłowionych z terenu, potwierdzają możliwość uruchamiania enzymatycznych i nieenzymatycznych reakcji antyoksydacyjnych i wskazują również na specyficzność gatunkową takich odpowiedzi (Wilczek i Migula, 1996; Wilczek i in., 2003; Wilczek i in., 2004; Wilczek i in., 2008). Samice sieciowego pająka *Agelena labyrinthica* odłowione z terenów silnie zanieczyszczonych ołowiem i cynkiem cechował wysoki poziom aktywności peroksydazy selenozależnej (GPOx) i niezależnej od selenu (GSTPx), a także wysokie stężenie glutationu (GSH). Jednocześnie w tych samych warunkach pająki nie budujące sieci *Pardosa lugubris* charakteryzowały się znacząco niższym poziomem GSH, GPOx i GSTPx niż pająki sieciowe (Wilczek i in., 2004). Podobnie w badaniach przeprowadzonych na innym przedstawicielu rodziny Lycosidae, *Pardosa palustris* wykazano, że wysokiemu stężeniu w ciele takich metali jak Zn, Pb i Cd towarzyszyła wysoka aktywność katalazy. Z kolei u przedstawicieli osnuwikowatych, *Linyphia triangularis* nasileniu reakcji antyoksydacyjnych związanych z aktywnością CAT i SOD, towarzyszyła niska kumulacja metali w tkankach (Wilczek i Migula, 1996). W przypadku pajaków, wykazano również płciowe różnice w zdolnościach do obrony antyoksydacyjnej. U samic wilczego pająka *Xerolycosa nemoralis* narażenie na pestycyd spowodowało wzrost aktywności CAT i SOD, zaś u samców wzrosła aktywność GPOx, GSTPx i CAT (Wilczek i in., 2013). Ponadto samice tego gatunku były bardziej odporne na stres związany z wydłużeniem okresu głodzenia niż samce, u których w warunkach niedoboru pokarmu obserwowano wzrost aktywności CAT, GSTPx, GR (reduktaza glutationowa) oraz poziomu TAC (Stalmach i in., 2015a). Zróznicowanie komórkowych

odpowiedzi antyoksydacyjnych, będących wyrazem uruchamianych mechanizmów obronnych, mogą przekładać się u pajaków na określone zdolności do kompensowania efektów, wywołanych działaniem czynników stresogennych i decydować o składzie gatunkowym arachnocenoz na terenach zanieczyszczonych (Wilczek i in., 2008).

W odniesieniu do tej grupy bezkręgowców nie ma jednak danych literaturowych na temat wpływu nanocząstek metali, w tym nanocząstek srebra na komórkowe odpowiedzi antyoksydacyjne. W pracy tej ściśle kontrolowano warunki eksperymentu zarówno w odniesieniu do czasu ekspozycji, jak i dawki oraz formy metalu, co pozwoliło porównać efekty zastosowanych form srebra, w odniesieniu do wybranych parametrów antyoksydacyjnych i cytotoksycznych. Wykazano, że suplementacja ofiar pajaków zarówno AgNO_3 , jak i PVP–AgNPs oraz AgNPs powodowała nasilenie stresu oksydacyjnego w komórkach hemolimfy, gruczołu jelita środkowego oraz ampułkowatych gruczołach przędnym *S. grossa*. Poziom aktywności mierzonych parametrów antyoksydacyjnych zależał jednak wyraźnie od formy metalu i czasu ekspozycji. Najwyższą aktywność katalazy, która uczestniczy w neutralizacji nadtlenu wodoru, odnotowano w komórkach gruczołu jelita środkowego. W narzędzie tym, suplementacja pokarmu AgNO_3 spowodowała 3–krotny wzrost aktywności CAT po 1 i 3 miesiącach ekspozycji, natomiast po 12 miesiącach wzrost ten był 2–krotny, w odniesieniu do osobników z grupy kontrolnej. Nieco słabszą odpowiedź rejestrowano w wymienionych gruczołach, w przypadku ekspozycji na pokarm suplementowany wybranymi formami nanosrebra, bowiem wzrost ten był 1,5–krotny, w odniesieniu do kontroli we wszystkich zadanych czasach ekspozycji.

Z kolei w hemolimfie *S. grossa* na ofiary zanieczyszczone AgNO_3 notowano nasilenie aktywności CAT, w odniesieniu do wartości kontrolnych. Aktywność CAT była kolejno 4–, 3– i 2–krotnie wyższa, niż w grupie kontrolnej po miesięcznej, trzymiesięcznej i dwunastomiesięcznej ekspozycji. Z kolei suplementacja pokarmu wybranymi formami nanometrycznymi skutkowała 2–krotnym wzrostem CAT po 1 i 3 miesiącach ekspozycji, zaś po 12 miesiącach 1,5–krotnym, w porównaniu z grupą kontrolną. Rezultaty tych badań wskazały na silniejsze prooksydacyjne działanie zanieczyszczeń w postaci AgNO_3 , niż zastosowanych form nanocząstek badanego metalu. Wskazały także na stopniowe zmniejszenie poziomu aktywności tego enzymu wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji na zanieczyszczony pokarm, niezależnie od zastosowanej formy metalu.

Spośród analizowanych tkanek, najniższy poziom aktywności katalazy odnotowano w komórkach ampułkowatych gruczołów przednich. Tym nie mniej, podobnie jak w gruczołach jelita środkowego i hemolimfie, aktywność CAT była najwyższa w przypadku osobników, których karmę suplementowano AgNO₃. W kolejnych etapach trwania eksperymentu poziom aktywności tego enzymu był 4-, 3- i 2-krotnie wyższy, niż w grupie kontrolnej. Ekspozycja na PVP-AgNPs i AgNPs skutkowałą stabilnym, kolejno 2-krotnie i 1,5-krotnie wyższym poziomem CAT, niż kontrola, niezależnie od okresu ekspozycji na srebro.

Nieco słabsze odpowiedzi w badanych tkankach pająków na zastosowane związki srebra rejestrowano w odniesieniu do poziomu całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC). Parametr ten jest miarą przeciwutleniającego potencjału obronnego ustroju przeciwko wzrastającemu stężeniu ROS w komórkach, dlatego pozwala ocenić stan redoks organizmu i jego wrażliwość na stres oksydacyjny (Livingstone, 2001; Camus i in., 2002). W komórkach hemolimfy samic *S. grossa*, otrzymujących karmę suplementowaną AgNO₃ i stosowanymi formami nanosrebra, po miesiącu narażenia, poziom TAC był kolejno 2,3- i 1,5-krotnie wyższy niż w grupie kontrolnej. Trzymiesięczna ekspozycja na zastosowane formy srebra wykazała 1,5-krotny wzrost poziomu TAC, zaś po 12 miesiącach nie obserwowano zmian w wielkości tego parametru w odniesieniu do kontroli, niezależnie od grupy doświadczalnej. Wykazano ponadto, że najwyższy poziom TAC wystąpił w komórkach gruczołu jelita środkowego, gdzie po miesiącu suplementacji pokarmu AgNO₃ i wybranymi formami nanosrebra był on kolejno 3- i 2-krotnie wyższy w odniesieniu do grupy kontrolnej, a po 3 miesiącach 2- i 1,5-krotnie wyższy. Dwunastomiesięczna ekspozycja spowodowała natomiast 1,5-krotny wzrost tego parametru we wszystkich analizowanych grupach, względem kontroli. Z kolei poziom TAC w komórkach ampułkowatych gruczołów przednich utrzymywał się na stałym poziomie podczas całego okresu trwania eksperymentu, niezależnie od stosowanej formy metalu. Uzyskane rezultaty mogą potwierdzać znaczącą rolę bariery jelitowej wraz z gruczołami jelita środkowego dla metali, które skutecznie ograniczają wnikanie ksenobiotyków do organizmu, chroniąc inne narządy przed uszkodzeniami.

W dostępnej literaturze znaleźć można rozbieżne dane dotyczące wpływu AgNPs na aktywność wybranych parametrów antyoksydacyjnych u zwierząt, w tym CAT i TAC. Ribeiro i in. (2015), którzy poddali ocenie wpływ AgNPs i Ag⁺ na zdolność wywołania stresu oksydacyjnego u modelowego gatunku skąposzczeta glebowego *Enchytraeus crypticus* wykazali, że obie formy srebra cechuje zróżnicowany potencjał

prooksydacyjny. Wykazano, że jony Ag^+ w większym stopniu indukują stres oksydacyjny, niż AgNPs, przy czym w obydwu przypadkach stwierdzono wzmożoną peroksydację lipidów, podczas gdy aktywność CAT, GPOx, GST, GR i stężenie MTs było wyższe u osobników poddanych działaniu jonów Ag^+ . Ponadto każda z form srebra w odmienny sposób wpływała na aktywność enzymów antyoksydacyjnych. Po ekspozycji na AgNPs wzrosła aktywność CAT i stężenie MTs, podczas gdy Ag^+ zwiększyły aktywność GST i GPOx (Ribeiro i wsp., 2015), sugerując odmienne mechanizmy działania zastosowanych form srebra. Z kolei w przypadku małży morskich *Mytilus galloprovincialis* nie obserwowano wzrostu aktywności CAT pod wpływem ekspozycji na AgNPs w warunkach *in vivo*. Odnotowano natomiast wzrost aktywności dialdehydu malonowego (MDA) oraz GST i MTs (Ale i in., 2019). Buffet i in. (2013) w badaniach na morskich małżach *Scrobicularia plana* narażonych bezpośrednio przez wodę oraz poprzez dietę (mikroalgi) na Ag^+ i AgNPs, wykazali podwyższenie poziomu CAT, GST i SOD w ich organizmie. Jednak odpowiedź antyoksydacyjna osobników była silniejsza po pokarmowej ekspozycji na wybrane formy srebra, w porównaniu z ekspozycją kontaktową przez wodę. Ponadto nie odnotowano różnic w aktywności enzymatycznej pomiędzy zastosowanymi formami srebra (Buffet i in., 2013). Badania McCarthy i in. (2013) wykazały jednak, że odpowiedź takich biomarkerów antyoksydacyjnych jak: CAT, SOD czy GSH w tkankach ostryg *Crassostrea virginica* różniła się w przypadku Ag^+ i AgNPs. Wielkości tych parametrów porównywano w tkankach skrzeli i wątrobotrzustki. Tkanki skrzeli były bardziej podatne na toksyczność, gdy stosowano rozpuszczone Ag^+ , podczas gdy tkanki wątrobotrzustki były bardziej wrażliwe na AgNPs (McCarthy i in., 2013). Powyższe dane literaturowe oraz wyniki uzyskane w niniejszej pracy mogą świadczyć o istnieniu unikalnych własności nanocząstek determinujących ich specyficzne narządowe działanie. Wskazują także, że toksyczności nanocząstek metali nie można dokładnie przewidzieć na podstawie toksyczności jonów metali.

AgNPs dostając się do komórki, zakłócają funkcjonowanie mitochondrialnego łańcucha oddechowego, prowadząc zarówno do produkcji ROS, jak i przerwania syntezy ATP (Gomes i in., 2013a; Katsumiti i in., 2015; Rocha i in., 2016). W niniejszej pracy potwierdzono wystąpienie wymienionych wyżej efektów w przypadku narażenia samicy pająka *S. grossa* na zastosowane formy srebra. Ocenie ilościowej poddano zmiany odsetka komórek ROS⁺ w wybranych tkankach, wielkość potencjału mitochondrialnego, stężenie ATP oraz wielkość wskaźnika ADP/ATP. Największy wzrost odsetka komórek

ROS+ po ekspozycji na wybrane formy srebra odnotowano w gruczole jelita środkowego we wszystkich grupach doświadczalnych i zadanych czasach ekspozycji. Zmianom tym towarzyszyło zmniejszenie poziomu potencjału mitochondrialnego, stężenia ATP oraz wielkości wskaźnika ADP/ATP. Zaobserwowane zmiany w wielkości tych parametrów wynikają z funkcji gruczołu jelita środkowego jako filtra ksenobiotyków i miejsca procesów detoksykacyjnych, którym poddawane są związki, które dostają się do organizmu drogą pokarmową.

Jak już wcześniej sygnalizowano, AgNPs mogą indukować nadprodukcję ROS i powodować zaburzenia funkcji mitochondriów, co w konsekwencji prowadzi do powstania stresu oksydacyjnego (Lee i in., 2014b; Zieminska i in., 2014). Mogą również aktywować makroautofagię, czyli proces pozyskiwania energii na drodze degradacji utlenionych białek czy uszkodzonych pod wpływem stresu oksydacyjnego organelli, pozwalający zahamować wewnątrzkomórkową produkcję ROS. Z kolei przedłużająca się makroautofagia może prowadzić do śmierci komórkowej, między innymi na drodze apoptozy. Opisana kaskada zależności została zaobserwowana w ocenie toksyczności AgNPs głównie w warunkach *in vitro* m.in. u myszy (Chen i in., 2007; Lee i in., 2014b). Do chwili obecnej niewiele jest danych literaturowych na temat wpływu nanocząstek, w tym AgNPs, na proces autofagii. W badaniach prowadzonych w warunkach *in vitro* wykazano, że inkubacja ludzkich fibroblastów z nanocząstkami złota aktywuje ten proces. Obserwowano występowanie autofagosomów oraz istotny statystycznie w porównaniu do kontroli wzrost poziomu białek biorących udział w tym procesie (MAP LC3-II oraz bekliny 1) (Li i in., 2010). Podobne wyniki otrzymano inkubując mysie fibroblasty linii NIH 3T3 z AgNPs (Lee i in., 2014b). Ponadto wykazano również aktywację autofagii z następującą po niej śmiercią komórkową na drodze apoptozy w komórkach wątroby szczurów, które otrzymały AgNPs jednorazowo drogą dootrzewnową (Lee i in., 2013b).

W niniejszej pracy zmierzono poziom intensywności autofagii w komórkach hemolimfy, gruczołu jelita środkowego oraz ampułkowatych gruczołów przędynych. W przypadku hemolimfy odnotowano istotny wzrost odsetka komórek autofagicznych po miesięcznej ekspozycji na zastosowane formy srebra: AgNO₃ – 9%, PVP–AgNPs – 8% i AgNPs – 7% , w odniesieniu do grupy kontrolnej. Po wydłużeniu czasu ekspozycji na wymienione formy srebra intensywność autofagii w hemolimfie była zbliżona, jak w kontroli, podczas gdy w gruczole jelita środkowego obserwowano istotny wzrost poziomu intensywności autofagii także po 3 miesiącach ekspozycji na zastosowane formy

ksenobiotyku. Z kolei miesięczna i trzymiesięczna ekspozycja na AgNO₃, PVP–AgNPs i AgNPs w pokarmie skutkowała zbliżonym, średnio 9–, 7– i 6–procentowym wzrostem odsetka komórek autofagicznych, w odniesieniu do grupy kontrolnej. W ampułkowatych gruczołach przednich podobnie jak w hemolimfie proces ten obserwowano tylko po miesięcznej ekspozycji, a poziom komórek autofagicznych w odniesieniu do grupy kontrolnej był wyższy o 12%, 10% i 9%, kolejno w grupach narażonych na obecność AgNO₃, PVP–AgNPs i AgNPs w pokarmie.

Indukcję apoptozy pod wpływem AgNPs rejestrowano u zwierząt, zarówno w badaniach prowadzonych w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Wykazano ją podczas inkubacji ludzkich fibroblastów (Hsin i in., 2008), ludzkich hepatocytów (Piao i in., 2011), czy komórek ziarnistych mózdzku (Yin i in., 2013) z AgNPs. Ponadto odnotowano, że 14–dniowa ekspozycja szczurów na AgNPs drogą pokarmową wywołuje apoptozę w hipokampie (Bagheri–Abassi i in., 2015), a jednorazowe podanie związku drogą dootrzewnową może indukować ten proces w wątrobie szczurów (Lee i in., 2013b). Niniejsze badania prowadzone na modelu samic pająka *S. grossa*, także potwierdziły wystąpienie apoptozy w badanych tkankach i narządach pod wpływem narażenia na zastosowane formy srebra. Największy stopień indukcji tego procesu odnotowano w gruczole jelita środkowego. Podwyższenie odsetka komórek wczesnoapoptotycznych w tym narządzie, rejestrowane było we wszystkich grupach doświadczalnych i wszystkich czasach ekspozycji, natomiast wzrost poziomu komórek późnoapoptotycznych odnotowano we wszystkich grupach eksponowanych na wybrane formy srebra, ale tylko po krótkoterminowej ekspozycji (1 i 3 miesiące), w odniesieniu do kontroli. Największy odsetek komórek apoptotycznych wystąpił po ekspozycji na AgNO₃. Związek ten przyczynił się również do wzrostu poziomu komórek nekrotycznych niezależnie od długości ekspozycji. Nasilenie nekrozy w przypadku zastosowania nanocząstek srebra notowano w gruczole jelita środkowego tylko po 1 i 3 miesiącach ekspozycji. Z kolei w hemolimfie poziom komórek wczesnoapoptotycznych wzrósł we wszystkich grupach po 1 i 3 miesiącach ekspozycji na zastosowane formy Ag, podczas gdy zwiększenie odsetka komórek późnoapoptotycznych rejestrowano we wszystkich zadanych czasach ekspozycji, w odniesieniu do grupy kontrolnej. Nasilenie częstości nekroz obserwowano tylko po dwunastomiesięcznej ekspozycji na AgNO₃.

Najmniej zmian degeneracyjnych odnotowano w komórkach ampułkowatych gruczołów przednich. Wzrost odsetka komórek we wczesnej apoptozie obserwowano

tylko po miesięcznej ekspozycji na zastosowane formy ksenobiotyku. AgNO_3 nasilał powstawanie komórek późnoapoptotycznych po 1 i 3 miesiącach ekspozycji. W gruczołach przednich nie obserwowano jednak zwiększenia odsetka zmian nekrotycznych. Rejestrowany wzrost odsetka komórek apoptotycznych i autofagicznych może świadczyć o uruchomieniu mechanizmów obronnych mających zapobiec uszkodzeniu tego narządu. Sugeruje się bowiem, że zjawisko autofagii może mieć kluczowe znaczenie w odpowiedzi komórkowej skierowanej przeciwko toksycznemu działaniu AgNPs (Lee i wsp., 2014b).

Innym, w mniejszym stopniu opisanym markerem narażenia organizmu na AgNPs, jest indukcja metalotionein (MTs). Jak już wcześniej wspomniano, główną funkcją tych białek jest udział w homeostazie metali biogennych oraz neutralizacja tych, które są biologicznie zbędne (Dallinger, 1996). Białka te mają zdolność do wiązania nanosrebra w celu regulacji metabolizmu Ag, detoksykacji Ag^+ i/lub usuwania ROS (Ale i in., 2024). W niniejszej pracy sprawdzono czy zastosowane związki srebra wywołują zmiany w poziomie białek metalotioneinopodobnych (MTs) w badanych tkankach samicy pająka *S. grossa* i w jakim stopniu czas ekspozycji oraz forma związku decyduje o stopniu nasilenia indukcji tych białek. Wyniki badań wskazują, że ekspozycja osobników na zastosowane formy srebra skutkowało zwiększeniem poziomu MTs w hemolimfie i gruczole jelita środkowego, natomiast w ampułkowatych gruczołach przednich nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w ich stężeniu, w odniesieniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo, poziom tych białek w wymienionych tkankach wzrastał wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji. W przypadku osobników poddanych miesięcznej suplementacji pokarmu badanymi formami srebra w hemolimfie obserwowano 10–krotny wzrost poziomu tych białek. Podczas gdy trzymiesięczna ekspozycja skutkowało nasileniem syntezy MTs: 18–, 10– i 11–krotnym, a dwunastomiesięczna z kolei 20–, 11– i 15–krotnym odpowiednio w grupach otrzymujących AgNO_3 , PVP–AgNPs oraz AgNPs. W gruczole jelita środkowego po miesiącu narażenia na AgNO_3 odnotowano 5–krotny wzrost poziomu MTs, natomiast formy nanometryczne powodowały wzrost 4–krotny. Trzy– i dwunastomiesięczna ekspozycja skutkowało w tym narządzie 13–krotnym i 8–krotnym zwiększeniem stężenia MTs kolejno w grupach suplementowanych AgNO_3 oraz PVP–AgNPs, natomiast w przypadku AgNPs wzrost ten był 8– i 10–krotny. Uzyskane wyniki potwierdzają, że ekspozycja na wybrane formy srebra może stymulować syntezę metalotionein w organizmie pajaków *S. grossa*, głównie podczas intoksykacji długoterminowej. AgNO_3 , w porównaniu do nanosrebra, w większym stopniu nasilał

produkcję tych białek w gruczole jelita środkowego wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji. Również w innych badaniach potwierdzono zależność między poziomem MTs w organizmie, a ekspozycją na AgNPs. Ale i in. (2019), którzy badali enzymatyczne i nieenzymatyczne odpowiedzi detoksykacyjne u małża morskiego *M. galloprovincialis*, w tym poziom metalotionein wykazali, że osobniki eksponowane na AgNPs obecne w wodzie przez okres 4 dni, cechowały się wzrostem stężenia MTs w gruczole trawiennym. Podobnie Gomes i in. (2014) w badaniach na tym samym gatunku małży wykazali, że 3-, 7- i 15-dniowa ekspozycja na nanocząstki srebra skutkowała wzrostem poziomu MTs w skrzelach i gruczole trawiennym wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji, jednak najwyższy poziom tych białek odnotowano w skrzelach. Podobne zależności wykazali również Ringwooda i in. (2009) u osiadłego małża *Crassostrea virginica* oraz Gagne i in. (2013) u małży słodkowodnych *Elliptio complanata* narażonych na działanie nanocząstek. Podobnie w badaniach prowadzonych na szczurzych astrocytach w warunkach *in vitro* inkubowanych w pożywce suplementowanej AgNPs, wykazano aktywację mechanizmów protekcyjnych, polegającą na wzroście poziomu metalotionein (Luther i in., 2012). Powyższe doniesienia wskazują, że długotrwała ekspozycja organizmów na AgNPs indukuje syntezę metalotionein, co ma na celu zapobieganie toksyczności srebra. MTs to białka zawierające liczne reszty cysteinowe, mające zdolność wiązania jonów metali ciężkich. Potwierdzono także udział tych białek w reakcjach ochronnych przed stresem oksydacyjnym, gdyż mają właściwości przeciwutleniające (Luther i in., 2012).

W przypadku pająków nie ma jak do tej pory żadnych doniesień na temat istnienia zależności między ekspozycją na nanocząstki srebra, a wystąpieniem określonych reakcji obronnych, w tym nasileniem produkcji metalotionein. W badaniach prowadzonych na różnych gatunkach pająków, potwierdzono jednak stymulujący wpływ innych metali na poziom MTs w tkankach. Ocena enzymatycznych i nieenzymatycznych odpowiedzi detoksykacyjnych u wilczych pająków: *Lycosa terrestris* (Lycosidae) i *Pardosa birmanica* (Lycosidae) wykazała, że u osobników eksponowanych na miedź i ołów przez okres 10, 20 i 40 dni, następował wzrost stężenia MTs wraz ze wzrostem stężenia metali w ciałach osobników. W badaniach tych wykazano ponadto, że stężenie MTs było prawie dwukrotnie wyższe po narażeniu osobników na metal biogeny, niż na zastosowany ksenobiotyk. Wyniki te wskazują więc, że rodzaj zastosowanego metalu oraz długość czasu narażenia mają znaczący wpływ na indukcję syntezy MTs u pająków (Aziz i Butt, 2020). Także w badaniach Babczyńskiej i in. (2011a) u pająków z gatunku *A. labyrinthica*

(Agelenidae) obserwowano zależność pomiędzy stężeniem metali w ciele, a poziomem białek metalotioneinopodobnych, jednocześnie wykazując znaczenie takich czynników, jak wiek i płeć osobników. Samce, samice oraz formy młodociane odłowione z rejonów w różnym stopniu zanieczyszczonych metalami i dodatkowo w warunkach laboratoryjnych poddane ekspozycji na miedź i kadm w pokarmie przez okres 3 tygodni, cechowały się zwiększonym poziomem zawartości tych białek. Poziom MTs był pozytywnie skorelowany ze stężeniem badanych metali w ciałach tych osobników. Najwyższe stężenia MTs odnotowano u samic eksponowanych na kadm, niezależnie od miejsca z którego pochodziły, w porównaniu do osobników z grupy kontrolnej. W kolejnych badaniach tego zespołu (Babczyńska i in., 2011b), w których oceniano rolę MTs w strategii neutralizacji metali u trzech gatunków pajaków.: *Araneus diadematus* (Araneidae), *A. labyrinthica* (Agelenidae) i *L. triangularis* (Linyphiidae) odłowionych z rejonów różniących się poziomem zanieczyszczeń metalami, potwierdzono dodatnie korelacje między stężeniem metali w organizmie, a poziomem metalotionein. Odnotowano istotną korelację między stężeniem ołowiu w ciałach osobników *A. labyrinthica* i *L. triangularis*, a stężeniem metalotionein, natomiast w przypadku osobników z gatunku *A. diadematus* dodatnia korelacja wystąpiła w odniesieniu do stężenia kadmu w ciałach pajaków. U wszystkich gatunków poddanych w tym badaniu analizie wykazano również zależność pomiędzy zawartością cynku w organizmie, a poziomem MTs. Tylko w przypadku miedzi nie znaleziono istotnych korelacji między badanymi parametrami. Uzyskane wyniki wskazują, że w przypadku badanych gatunków pajaków cynk, ołów i kadm skutecznie stymulują syntezę MTs. Podobne wyniki uzyskano w badaniach mających na celu ocenę wpływu wysokiej temperatury oraz dimetoatu na sprawność enzymów antyoksydacyjnych oraz ilościowe zmiany w poziomie białek metalotioneinopodobnych u pajaka tunelowego *A. labyrinthica* (Agelenidae) oraz wałęsaka *P. lugubris* (Lcosidae). W tych badaniach wykazano, że zastosowane stresory przyczyniły się do wzrostu stężenia MTs. Ponadto zaobserwowano również, że pająki odłowione z terenów silnie zanieczyszczonych metalami, miały średnio dwa razy większy poziom MTs, w porównaniu z osobnikami odłowionymi z terenów w mniejszym stopniu zanieczyszczonych. Sugeruje to, że chroniczne narażenie pajaków na metale sprzyja produkcji białek metalotioneinopodobnych, co może ułatwiać przetrwanie tym drapieżnikom na terenach zanieczyszczonych. Udokumentowano także antyoksydacyjną funkcję omawianych białek, których synteza była indukowana w odpowiedzi na czynniki stresowe o różnym charakterze (Wilczek, 2005).

5.3. Ocena ultrastruktury hemolimfy i gruczołów przednich

Hemocyty odgrywają kluczową rolę w odpowiedziach odpornościowych bezkręgowców. W niniejszej pracy, wykorzystując transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM), oceniono ultrastrukturę granulocytów, będących najliczniejszymi hemocytami w hemolimfie *S. grossa*. Odnotowano, że granulocyty pobrane od osobników z grupy kontrolnej, charakteryzowały się cytoplazmą bogatą w homo- i heterogenne granule z materiałem o różnej gęstości elektronowej, liczne mitochondria oraz ziarna glikogenu. Ponadto cytoplazma zawierała również pojedyncze niewielkie wakuole oraz cysterny retikulum endoplazmatycznego. Krótkoterminowa ekspozycja (1 i 3 miesiące) pajaków na pokarm suplementowany AgNO_3 skutkowała zmniejszeniem liczby elektronowo gęstych granuli w granulocytach. Z kolei długoterminowe narażenie również skutkowało redukcją liczby elektronowo gęstych ziarnistości i ponadto cytoplazma stała się jasna elektronowo i uboga w organelle, których błony często były porozrywane, co świadczy o wystąpieniu zmian nekrotycznych. W przypadku ekspozycji samic na PVP–AgNPs w pokarmie, także obserwowano zmiany w cytoplazmie, która stała się jasna elektronowo i nastąpiło zmniejszenie liczby organelli na jej terenie. Nie stwierdzono jednak zaburzenia ich ultrastruktury, w porównaniu z grupą kontrolną. W przypadku hemocytów pajaków narażonych na AgNPs, nie stwierdzono istotnych różnic w ultrastrukturze komórek, w odniesieniu do kontroli.

Ampułkowate gruczoły przednie biorą udział w produkcji jedwabiu wiodącego i pomocniczego, których zadaniem jest tworzenie rusztowania pajęczyny i jej wzmocnienie. U osobników z grupy kontrolnej, komórki budujące część gruczołową ampułkowatych gruczołów przednich, cechowały się cytoplazmą bogatą w duże wakuole z kłaczkowatym materiałem wewnątrz, nieliczne krople materiału zapasowego oraz liczne mitochondria, cysterny szorstkiego retikulum endoplazmatycznego i niewielkie pęcherzyki o wnętrzu jasnym elektronowo. Wraz z wydłużeniem ekspozycji na AgNO_3 , obserwowano stopniową degenerację organelli i struktur komórkowych. Cysterny retikulum endoplazmatycznego oraz mitochondria uległy rozdęciu, a ilość kłaczkowatego materiału wewnątrz wakuol zmalała. Redukcji uległy także krople materiału zapasowego. Ponadto długoterminowa intoksykacja AgNO_3 skutkowała nasileniem zmian nekrotycznych.

Krótkoterminowa intoksykacja PVP–AgNPs nie wywołała żadnych zmian w ultrastrukturze gruczołów przednich, natomiast w przypadku długoterminowej intoksykacji zaobserwowano aktywację procesów degeneracyjnych, w postaci rozdęcia

cystern retikulum endoplazmatycznego i zmniejszenia liczby grzebieni mitochondrialnych. W przypadku podania pająkom AgNPs w pokarmie, nie zaobserwowano żadnych zmian na poziomie ultrastrukturalnym, w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednak w przeciwieństwie do pozostałych form srebra, w grupie narażonej na AgNPs obserwowano liczne elektronowo gęste ziarnistości, które przypuszczalnie mogą być nagromadzonymi nanocząstkami srebra.

Podobne zmiany w komórkach zostały zaobserwowane przez Luo i in. (2022) oraz Lou i Wang (2022) w badaniach prowadzonych na hemocytach ostryg *Crassostrea hongkongensis* po intoksykacji AgNPs. Wykazano, że AgNPs przedostawały się do hemocytów ostryg na drodze fagocytozy, co skutkowało różnymi odpowiedziami immunologicznymi w subpopulacjach hemocytów. Internalizacja AgNPs indukowała tworzenie się granul w cytoplazmie hemocytów i zwiększała udział granulocytów w populacji wszystkich hemocytów. Narażenie na AgNPs rozpuszczone w wodzie skutkowało ponadto gromadzeniem się Ag^+ w lizosomach, powodując ich dysfunkcję, co wskazuje na to, że lizosomy są najbardziej narażonymi strukturami komórkowymi na działanie AgNPs (Luo i in., 2022; Luo i Wang, 2022).

5.4. Wpływ AgNO_3 i nanosrebra na parametry fizykochemiczne sieci łownych pająka *S. grossa*

Pułapki łowne w postaci sieci stanowią niezbędne narzędzie do zdobywania pokarmu dla wielu gatunków pajaków (Eberhard, 1990). W przypadku tej grupy bezkręgowców wiedza dotycząca oddziaływania metali na komórki gruczołów przędných oraz jakość produkowanej przez nie przędzy łownej jest niewielka. Do chwili obecnej sieci łowne rozpatrywane były głównie jako narzędzie do monitorowania jakości powietrza poprzez analizę składu chemicznego osadzających się na ich powierzchni zanieczyszczeń (Hose i in., 2002; Xiao-li i in., 2006; Ayedun i in., 2013; Rybak, 2019).

Głównie z badań na kręgowcach wynika, że metale dostają się do komórek narządów na drodze dyfuzji prostej i przy udziale układów transportujących metale biogenne (Bridges i Zalups, 2005; Martelli i in., 2006), gdzie łatwo wiążą się z białkami występującymi zarówno w cytozolu, jak i w jądrze komórkowym oraz błonach mitochondrialnych (Bertin i Averbeck, 2006). Jednak czy i w jakim stopniu możliwe jest wiązanie metali, zwłaszcza w formie nanocząstek przez białka jedwabiu pajęczego w warunkach *in vivo* wymaga badań, podobnie jak konieczne jest rozpoznanie

mechanizmów pobierania/oddziaływania tego typu form metali na komórki gruczołów przednich.

Pająki produkują jedwab wykorzystując siedem różnych typów gruczołów przednich, z których każdy typ jedwabiu posiada unikalne właściwości (Blackledge i in., 2005). Poszczególne typy jedwabiu dodatkowo wykazują zmienność międzygatunkową. Mogą także różnić się nawet na poziomie wewnątrz osobniczym (Madsen i in., 1999). Zarówno potencjalne adaptacyjne właściwości jak i mechanizmy wywołujące to zróżnicowanie nie są jednak do końca poznane (Tso i in., 2007; Boutry i Blackledge, 2008). Dotychczasowe badania wskazują, że właściwości strukturalne i mechaniczne sieci są precyzyjnie regulowane i zależą od wielu czynników, zarówno endo-, jak i egzogennych (Blackledge, 2012). Wykazano ponadto, że wrażliwość pajaków na czynniki środowiskowe w odniesieniu do jakościowych oraz ilościowych cech charakteryzujących produkowane sieci łowne jest cechą specyficzną gatunkowo (Madsen i in., 1999; Köhler i Vollrath, 1995; Boutry i Blackledge, 2009). Proces produkcji włókien jedwabiu jest niezwykle plastyczny i drapieżniki te mogą dostosowywać właściwości wytwarzanego biomateriału do zmieniających się warunków otoczenia (Boutry i Blackledge, 2008). Bezkręgowce te są w stanie korygować właściwości jedwabiu zależnie od cech morfologicznych zdobyczy i zmian własnej masy ciała (Vollrath i Köhler, 1996). Przykładowo analiza właściwości mechanicznych i materiałowych włókien sieci produkowanych przez *Achaearanea tepidariorum* (Theridiidae) potwierdziła, że pająki karmione dużymi i szybkimi owadami produkowały grubsze, sztywniejsze i bardziej wytrzymałe włókna jedwabiu, niż osobniki karmione ofiarami mniejszymi i mniej ruchliwymi. W badaniach tych wykazano ponadto, że średnica i wytrzymałość włókien podwyższały się proporcjonalnie do masy pajaków. Typ ofiary nie zmieniał obu parametrów, podczas gdy np. moduł Younga zależał od masy pająka i typu ofiary. Do chwili obecnej rozpoznano główne punkty krytyczne w syntezie tego unikalnego biomateriału. Dotyczą one między innymi oddziaływania takich czynników jak: utrzymanie właściwego pH (Dicko i in., 2004; Xu i in., 2015) oraz stężenia jonów w poszczególnych odcinkach kanału przedniego np. Na⁺, Cl⁻, K⁺, P, S czy H⁺ (Knight i Vollrath, 2001). Zabezpieczenie właściwości biologicznych tworzonych nici zależy także od odpowiedniego stosunku określonych protein budujących jedwab (Rising i in., 2005; Boutry i Blackledge, 2008) oraz szybkości procesu przedzenia (Vollrath i in., 2001). Dla pajaków jako organizmów ektotermicznych, produkcja jedwabiu w gruczołach przednich zależy także od temperatury (Vollrath i in., 2001; Yang i in.,

2005) oraz wilgotności środowiska (Plaza i in., 2006; Vehoff i in., 2007), które określają warunki, w których nić pajęcza zachowuje odpowiednie cechy biochemiczne i mechaniczne. Potwierdzono eksperymentalnie, że istotnym czynnikiem determinującym właściwości chemiczne i materiałowe sieci jest także kondycja żywieniowa osobników, w tym ilość oraz skład ofiar. W warunkach deprywacji składników pokarmowych, w tym określonych aminokwasów (Madsen i in., 1999; Zax i in., 2004; Guehrs i in., 2008) lub przy zmianie składu diety (Tso i in., 2005; Tso i in., 2007; Boutry i Blackledge, 2008) następowały zmiany chemiczne i strukturalne włókien jedwabiu, które odzwierciedlały się w zmianach ich właściwości mechanicznych produkowanego biomateriału. W przypadku organizmów, które produkują materiały zbudowane głównie z substancji białkowych szczególnego znaczenia nabiera więc właściwe gospodarowanie zasobami aminokwasów. Niektóre z nich są egzogenne i konieczne jest ich pobieranie wraz z pokarmem. W przypadku aminokwasów endogennych należy z kolei uwzględnić różny, w zależności od budowy, koszt energetyczny ich produkcji, stosunkowo niski w przypadku aminokwasów, które pochodzą od takich metabolitów, jak: 6–fosforan glukozy, 3–fosfoglicerynian i pirogronian oraz wyższy, w przypadku aminokwasów pochodzących od metabolitów cyklu Krebsa (Blamires i in. 2012). Na przykładzie sieciowych pajaków *Argiope keyserlingi*, którym dostarczano ofiary o zróżnicowanej zawartości białka wykazano, że dieta nie zmieniała takich elementów architektury sieci, jak: liczba wątków promieniowych, obszar przytwierdzenia sieci, wysokość oczek i liczba lepkich spiral. Ilość energii inwestowanej w wytworzenie sieci była też podobna u osobników hodownych zarówno na diecie nisko– jak i wysokobiałkowej wskazując, że o jakości wytwarzanej sieci w większym stopniu decyduje skład przyjmowanych aminokwasów, niż sama obecność białka w pokarmie (Craig i in., 2000; Tso i in., 2005; Blamires i in., 2012; Blamires i in., 2009). Przykładowo, wykazano, że obecność proliny zwiększa elastyczność włókien, natomiast alanina zapewnia im wytrzymałość i sztywność (Hayashi i in., 1999; Hayashi i Lewis, 2001). Zmiany właściwości mechanicznych włókien jedwabiu notowano także w warunkach deprywacji wybranych składników pokarmowych np. u *Nephila edulis* (Madsen i in., 1999). Z badań prowadzonych na tym samym gatunku, którego dietę pozbawiano konkretnych aminokwasów wskazały, że wykluczenie alaniny i glicyny skutkowało zmianami sztywności materiału, z kolei argininy i tyrozyny zmniejszało wytrzymałość jedwabiu na rozciąganie, podczas gdy tyrozyny i leucyny zmniejszało wytrzymałość na odkształcenia (Zax i in., 2004).

W niniejszej pracy poddano ilościowej i jakościowej ocenie sieci łowne samiec *S. grossa*, które pozyskiwano sukcesywnie podczas każdego etapu trwania eksperymentu. Metodą chromatografii cienkowarstwowej z densytometrią w zgromadzonym biomateriale potwierdzono obecność czterech głównych aminokwasów, budujących jedwab pajęczy – alaniny, glicyny, histydyny i fenyloalaniny. Niezależnie od form srebra, na które eksponowano *Drosophila hydei*, poziom oznaczanych aminokwasów w sieciach produkowanych przez pająki wyróżnionych grup nie różnił się istotnie, w porównaniu do grupy kontrolnej. Zatem takie czynniki jak stężenie użytych związków oraz długość czasu ekspozycji osobników na ich działanie nie zmieniały stężeń wymienionych aminokwasów. Tym nie mniej, ocena architektury sieci związana z pomiarem średnicy włókien jedwabnych wstępujących zarówno pojedynczo, jak i w kompleksach podwójnych i wielokrotnych wykazała zmniejszenie średnicy mierzonych struktur (średnio ponad 50%) w pajęczynach przedzonych przez osobniki wszystkich analizowanych grup w zadanych czasach ekspozycji, w odniesieniu do pajęczyn osobników nieeksponowanych na wybrane formy ksenobiotyku. Warto podkreślić, że stopień tych zmian w badanych grupach był porównywalny niezależnie od zastosowanej formy srebra, zatem rozmiar nanocząstek srebra nie wpływał na morfologię włókien. Nie zaobserwowano ponadto zmian w składzie pierwiastkowym analizowanego biomateriału, bowiem analiza SEM–EDX nie potwierdziła obecności srebra we włóknach jedwabnych produkowanych przez pająki narażone na ten metal w pokarmie. Analiza kaloryczności sieci techniką mikrobomby tlenowej wykazała natomiast obniżenie kaloryczności sieci pod wpływem suplementacji pokarmu wybranymi formami Ag względem kontroli, lecz tylko w przeliczeniu na osobnika. Podobne zależności między zmianami w architekturze sieci i kaloryczności biomateriału, a ekspozycją na metale odnotowano w badaniach nad toksycznym wpływem kadmu i miedzi, podawanych pająkom *S. grossa* w karmie w stężeniach suletalnych podczas intoksykacji krótko- i długoterminowej (Wilczek i in., 2017; Michalik i in., 2018; Wilczek i in., 2019; Wilczek i in., 2024). W badaniach tych wykazano ponadto, że skład ilościowy i jakościowy oznaczanych aminokwasów w jedwabiu tego gatunku nie uległ zmianie po zastosowaniu wymienionych metali. Wykazano, także zmniejszenie średnicy włókien oraz obniżenie kaloryczności sieci, w przypadku biomateriału pozyskiwanego od osobników narażonych na metale w ofiarach (Wilczek i in., 2017; Wilczek i in., 2019; Wilczek i in., 2024).

Można przypuszczać, że pająki poddane ekspozycji na metale inwestowały istotnie mniej energii podczas produkcji jedwabnych włókien, co tym samym przyczyniło się do zmniejszenia ich średnicy, w odniesieniu do osobników z grupy kontrolnej. Może to wskazywać na alokację energii na kosztowne energetycznie reakcje detoksykacyjne, w tym zwiększenie syntezy metalotionein, czy aktywizację enzymów antyoksydacyjnych, w celu przeciwdziałania toksyczności ksenobiotyków zawartych w pokarmie. Obserwowane zmiany w średnicy włókien jedwabiu oraz kaloryczności sieci mogą zatem stać się użytecznym biomarkerem efektów spowodowanych narażeniem *S. grossa* na metale, w tym związki srebra.

6. WNIOSKI

1. Ekspozycja samic pająka *Steatoda grossa* na karmę zanieczyszczoną wybranymi formami srebra powodowała zwiększenie stężenia metalu w ich ciele wraz z wydłużeniem czasu intoksykacji. Srebro podawane samicom w postaci AgNO_3 było przyswajane w większym stopniu niż nanosrebro.
2. Suplementacja pokarmu związkami srebra wywołała uruchomienie reakcji antyoksydacyjnych, nasilenie zmian apoptotycznych, nekrotycznych i autofagicznych oraz uruchomienie produkcji białek metalotioneinopodobnych w badanych narządach. Zmianom tym towarzyszyło zmniejszenie poziomu potencjału mitochondrialnego i stężenia ATP oraz wzrost wielkości wskaźnika ADP/ATP.
3. Stopień nasilenia odpowiedzi komórkowych u pająka *S. grossa* w warunkach krótko- i długotrwałego narażenia na karmę zanieczyszczoną srebrem zależał od formy podanego metalu oraz miejsca jego działania.
 - 3a. Podanie AgNO_3 w większym stopniu generowało stres oksydacyjny, niż zastosowane formy nanocząstek srebra.
 - 3b. Największe zmiany w poziomie mierzonych parametrów odnotowano w komórkach gruczołu jelita środkowego, co może potwierdzać jego znaczącą rolę jako filtru ksenobiotyków i miejsca procesów detoksykacyjnych, którym poddawane są związki dostające się do organizmu drogą pokarmową. W narządzie tym rejestrowano najwyższy odsetek populacji komórek ROS⁺ we wszystkich grupach doświadczalnych i zadanych czasach ekspozycji.
4. Niezależnie od zastosowanej formy metalu, krótkotrwała ekspozycja nasilała reakcje antyoksydacyjne. Jednak wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji na zanieczyszczony pokarm, następowało stopniowe zmniejszenie aktywności katalazy (CAT) i poziomu całkowitej pojemności antyoksydacyjnej (TAC). Najwyższy poziom tych parametrów odnotowano w komórkach gruczołu jelita środkowego.
5. Ekspozycja osobników na wybrane formy srebra powodowała pojawienie się zmian apoptotycznych, nekrotycznych i autofagii w komórkach badanych tkanek. Stopień nasilenia zmian degeneracyjnych zależał od formy ksenobiotyku, czasu ekspozycji i rodzaju tkanki/narządu
 - 5a. AgNO_3 powodował silniejsze cytotoksyczne działanie niż nanocząstki srebra

5b. Odsetek komórek apoptotycznych, nekrotycznych oraz autofagicznych był najwyższy w gruczole jelita środkowego po krótkoterminowej intoksykacji, czemu towarzyszyło nasilenie reakcji antyoksydacyjnych.

5c. Najmniej zmian degeneracyjnych odnotowano w komórkach ampułkowatych gruczołów przędnych. Wzrost odsetka komórek we wczesnej apoptozie obserwowano tylko po miesięcznej ekspozycji na zastosowane formy srebra oraz komórek późnoapoptotycznych po 1 i 3 miesiącach ekspozycji na AgNO_3 . W gruczołach tych nie obserwowano jednak zwiększenia odsetka zmian nekrotycznych

6. Wykorzystywane w badaniach formy srebra wzmagają produkcję białek metalotioneinopodobnych głównie w komórkach gruczołu jelita środkowego i hemolimfy. Z kolei w ampułkowatych gruczołach przędnych nie odnotowano nasilenia syntezy tych białek w odpowiedzi na podanie metalu, co może wskazywać na słabe bezpośrednie oddziaływanie srebra na ten narząd.
7. Zarówno krótko-, jak i długoterminowa ekspozycja osobników na wybrane formy srebra nie spowodowała ilościowych i jakościowych zmian w poziomie badanych aminokwasów w jedwabiu produkowanym przez samice pająka *S. grossa*.
8. Suplementacja pokarmu wybranymi formami srebra skutkowała zmniejszeniem średnicy włókien jedwabiu oraz kaloryczności sieci, a stopień tych zmian w badanych grupach był porównywalny niezależnie od zastosowanej formy srebra. Prawdopodobnie w warunkach ekspozycji na metal pająki inwestowały mniej energii na produkcję jedwabnych włókien, przeznaczając część energii na kosztowne energetycznie reakcje detoksykacyjne.
9. Skład pierwiastkowy włókien obejmował głównie pierwiastki nisko atomowe, takie jak węgiel, azot, tlen, sód i potas, które wchodzą w skład związków budujących jedwab. Mikroanaliza rentgenowska nie potwierdziła obecności srebra we włóknach *S. grossa* po zadanych okresach pokarmowej ekspozycji osobników na zastosowane formy związków srebra, wykluczając możliwość endogennego wbudowywania tego pierwiastka do struktury włókna jedwabiu.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Ahamed M., Karns M., Goodson M., Rowe J., Hussain S. M., Schlager J. J., Hong Y. 2008. DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233(3): 404-410.
2. Ahari H., Anvar A.A., Ataee M., Naeimabadi M. 2021. Employing nanosilver, nanocopper, and nanoclays in food packaging production: a systematic review. *Coatings.* 11: 509.
3. Al Gurabi, M. A., Ali D., Alkahtani S., Alarifi S. 2015. In vivo DNA damaging and apoptotic potential of silver nanoparticles in Swiss albino mice. *Onco. Targets. Ther.* 8: 295-302.
4. Alaraby M., Romero S., Hernandez A., Marcos R. 2019. Toxic and Genotoxic Effects of Silver Nanoparticles in *Drosophila*. *Environ. and Mol. Mutagen.* 60: 277-285.
5. Ale A., Andrade V.S., Desimone M.F., Cazenave J. 2024. Chapter 16: Silver nanoparticles induced ecotoxicity. *Silver Nanoparticles for Drug Delivery.* 371-393.
6. Ale A., Bacchetta C., Rossi A.S., Galdopórpora J., Desimone M.F., de la Torre F.R. 2018. Nanosilver toxicity in gills of a neotropical fish: metal accumulation, oxidative stress, histopathology and other physiological effects, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148: 976984.
7. Ale A., Galdopórpora J.M., Desimone M.F., de la Torre F.R., Cazenave J. 2021b, Nanosilver and silver nitrate toxicity in ex vivo-exposed gills of fish and mitigation by humic acids, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 107: 421426.
8. Ale A., Galdopórpora J.M., Mora M.C., de la Torre F.R., Desimone M.F., Cazenave J. 2021a. Mitigation of silver nanoparticle toxicity by humic acids in gills of *Piaractus mesopotamicus* fish, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28: 3165931669.
9. Ale A., Liberatori G., Vannuccini M.L., Bergami E., Ancora S., Mariotti G. 2019. Exposure to a nanosilver-enabled consumer product results in similar accumulation and toxicity of silver nanoparticles in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.* 211: 4656.
10. Ale A., Rossi A.S, Bacchetta C., Gervasio S., de la Torre F.R., Cazenave J. 2018. Integrative assessment of silver nanoparticles toxicity in *Prochilodus lineatus* fish, *Ecol. Indic.* 93: 1190-1198.
11. Allahverdiyev A. M., Abamor E. S., Bagirova M., Rafailovich M. 2011. Antimicrobial effects of TiO₂ and Ag₂O nanoparticles against drug-resistant bacteria and leishmania parasites. *Future Microbiol.* 6(8): 933-940.
12. Al-Sid-Cheikh M., Rouleau C., Pelletier E. 2013. Tissue distribution and kinetics of dissolved and nanoparticulate silver in Iceland scallop (*Chlamys islandica*). *Mar. Environ. Res.* 86: 2128.
13. Artiaga G., Ramos K., Ramos L., Camara C., Gomez-Gomez M. 2015. Migration and characterisation of nanosilver from food containers by AF(4)-ICP-MS. *Food. Chem.* 166: 76-85.
14. AshRrani P., Low Kah Mun G., Hande M., Valiyaveetil S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano.* 3: 279-290.
15. Asif A., Hasan M.Z. 2018. Application of nanotechnology in modern textiles: a review. *Int. J. Curr. Eng. Technol.* 8: 227-231.
16. Attia N.F., Morsy M.S. 2016. Facile synthesis of novel nanocomposite as antibacterial and flame retardant material for textile fabrics. *Mater. Chem. Phys.* 180: 364-372.

17. Avalos A., Haza A.I., Mateo D., Morales P. 2014. Cytotoxicity and ROS production of manufactured silver nanoparticles of different sizes in hepatoma and leukemia cells. *J. Appl. Toxicol.* 34: 413–423.
18. Avalos A., Haza A.I., Drosopoulou E., Mavragani-Tsipidou P., Morales P. 2015. In vivo genotoxicity assesment of silver nanoparticles of different sizes by the Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) on *Drosophila*. *Food and Chem. Toxicol.* 85: 114-119.
19. Ayedun H., Adewole A., Osinfade B., Ogunlusi R., Umar B., Rabiu S. 2013. The use of spider webs for environmental determination of suspended trace metals in industrial and residential areas. *J. Environ. Chem. Ecotoxicol.* 5(2): 21–25.
20. Aziz N., Butt A. 2020 Enzymatic and non-enzymatic detoxification in *Lycosa terrestris* and *Pardosa birmanica* exposed to single and binary mixture of copper and lead. *Environ. Toxicol. Pharma.* 80: 103500.
21. Babczyńska A., Wilczek G., Szulińska E., Franiel I. 2011b. Quantitative immunodetection of metallothioneins in relation to metals concentration in spiders from variously polluted areas. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74(6): 1498-1503.
22. Babczyńska A., Wilczek G., Wilczek P., Szulińska E., Witas I. 2011a. Metallothioneins and Energy budget indices in cadmium and copper exposed spiders *Agelena labyrinthica* in relation to their developmental stage, gender and origin. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 154: 161-171.
23. Bacchetta C., Ale A., Simoniello M.F., Gervasio S., Davico C., Rossi A.S. 2017. Genotoxicity and oxidative stress in fish after a short-term exposure to silver nanoparticles, *Ecol. Indic.* 76 (2017) 230239. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.01.018>.
24. Bagheri-Abassi F., Alavi H., Mohammadipour A., Motejaded F., Ebrahimzadeh-Bideskan A. 2015. The effect of silver nanoparticles on apoptosis and dark neuron production in rat hippocampus. *Iran J. Basic. Med. Sci.* 18(7): 644-648.
25. Baram-Pinto D., Shukla S., Perkas N., Gedanken A., Sarid R. 2009. Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate. *Bioconjug Chem.* 20(8): 1497-1502.
26. Barbinta-Patrascu M.E., Badea N., Pirvu C., Bacalum M., Ungureanu C., Nadejde P.L., Ion C., Rau I. 2016. Multifunctional soft hybrid bio-platforms based on nano-silver and natural compounds. *Mater. Sci. Eng. C* 69: 922–932.
27. Bastos V., Ferreira de Oliveira J. M., Brown D., Jonhston H., Malheiro E., Daniel-da-Silva A. L., Duarte I. F., Santos C., Oliveira H. 2016. The influence of Citrate or PEG coating on silver nanoparticle toxicity to a human keratinocyte cell line. *Toxicol. Lett.* 249: 29-41.
28. Baun A., Hartmann N., Grieger K., Hansen S. 2009. Setting limits for engineered nanoparticles in European surface waters – are current approaches appropriate? *J. Environ. Monit.* 11(10): 1774–1781.
29. Behra R., Sigg L., Clift M.J.D., Herzog F., Minghetti M., Johnston B., Petri-Fink A., Rothen-Rutishauser B. 2013. Bioavailability of silver nanoparticles and ions: From a chemical and biochemical perspective. *J. R. Soc. Interface.* 10 (87): 20130396.
30. Benjamin S.P., Zschokke S. 2002. Untangling the tangle-web: Web construction behavior of the comb footed spider *Steatoda triangulosa* and comments on phylogenetic implications (Araneae: Theridiidae). *Journal of Insect Behavior.* 15(6): 791–809.
31. Benn T. M., Westerhoff P. 2008. Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ. Sci. Technol.* 42(11): 4133-4139.

32. Benn T., Cavanagha B., Hristovskib K., Posnerc J., Westerhoff P. 2009. The Release of Nanosilver from Consumer Products Used in the Home. *J. Environ. Qual. Abstr. - Special Submissions*. 39(6): 1875–1882.
33. Benyettou F., Rezgui R., Ravaux F., Jaber T., Blumer K., Jouiad M., Motte L., Olsen J.-C., Platas Iglesias C., Magzoub M.J. 2015. Synthesis of silver nanoparticles for the dual delivery of doxorubicin and alendronate to cancer cells. *J. Mater. Chem. B* 3: 7237–7245.
34. Bertin G., Averbeck D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochemie*. 88: 1549–1559.
35. Bertin G., Averbeck D. 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochemie*. 88: 1549–1559.
36. Bielański A. 2002. *Podstawy chemii nieorganicznej*. PWN. Wyd. 5. p. 961.
37. Bindokas V.P., Jordan J., Lee C.C. 1996. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci*. 16: 1324–1336.
38. Blackledge T. 2012. Spider silk: a brief review and prospectus on research linking biomechanics and ecology in draglines and orb webs. *J. Arachnol.* 40(1): 1–12.
39. Blackledge T., Cardullo R., Hayashi C. 2005. Polarized light microscopy, variability in spider silk diameters, and the mechanical characterization of spider silk. *Invertebr. Biol.* 124(2): 165–173.
40. Blamires S., Hochuli D., Thompson M. 2009. Prey protein influences growth and decoration building in the orb web spider *Argiope keyserlingi*. *Ecol. Entomol.* 4(5): 545–550.
41. Blamires S., Wu C., Tso I. 2012. Variation in protein intake induces variation in spider silk expression. *PLoS ONE* 7(2): e31626.
42. Bondarenko O., Juganson K., Ivask A., Kasemets K., Mortimer M., Kahru A. 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Arch. Toxicol.*, 87(7): 1181–1200.
43. Boutry C., Blackledge T. 2008. The common house spider alters the material and mechanical properties of cobweb silk in response to different prey. *J. Exp. Zool.* 9: 542–552.
44. Boutry C., Blackledge T. 2009. Biomechanical variation of silk links spinning plasticity to spider web function. *Zoology*. 112: 451–460.
45. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
46. Brar S., Verma M., Tyagi R., Surampalli R. 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. *Waste Management*. 30(3): 504–520.
47. Bridges C., Zalups, R. 2005. Molecular and ionic mimicry and the transport of toxic metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204(3): 274–308.
48. Bugla-Płoskońska G., Oleszkiewicz A. 2007. Biologiczna aktywność srebra i jego zastosowanie w medycynie. *Problemy Nauk Biologicznych*. 56: 274-275.
49. Bumbudsanpharoke N., Ko S. 2015. Nano-food packaging: an overview of market, migration research and safety regulations. *J. Food Sci.* 80: 910–923.
50. Bystrzejewska-Piotrowska G., Golimowski J., Urban P. 2009. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management*. 29(9): 2587–2595.

51. Camus L, Jones MB, Børseth JF, Regoli F, Depledge MH. 2002. Heart rate, respiration and total oxyradical scavenging capacity of the Arctic spider crab, *Hyas araneus*, following exposure to polycyclic aromatic compounds via sediment and injection. *Aquatic Toxicology*. 61:1–13.
52. Carbone M., Donia D.T., Sabbatella G., Antiochia R. 2016. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging. *J. King Saud Univ. Sci.* 28: 273–279.
53. Carbone S., Vittori Antisari, L., Gaggia F., Baffoni L., Di Gioia D., Vianello G., Nannipieri P. 2014. Bioavailability and biological effect of engineered silver nanoparticles in a forest soil. *J. Hazard. Mater.* 280: 89–96.
54. Carlson C., Hussain S. M., Schrand A. M., Braydich-Stolle L. K., Hess K. L., Jones R. L., Schlager J. J. 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem. B* 112 (43): 13608-13619.
55. Cazenave J., Ale A., Bacchetta C., Rossi A.S. 2019. Nanoparticles toxicity in fish models, *Curr. Pharm. Des.* 25: 39273942.
56. Chae Y. J., Pham C. H., Lee J., Bae E., Yi J., Gu M. B. (2009). Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 94(4): 320-327.
57. Chae Y. J., Pham C. H., Lee J., Bae E., Yi J., Gu M. B. 2009. Evaluation of the toxic impact of silver nanoparticles on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 94(4): 320-327.
58. Chen D., Xi T., Bai J. 2007. Biological effects induced by nanosilver particles: in vivo study. *Biomed. Mater.* 2(3): 126-128.
59. Chen F., Xiao Z., Yue L., Wang J., Feng Y., Zhu X. 2019. Algae response to engineered nanoparticles: current understanding, mechanisms and implications. *Environ. Sci. Nano.* 6: 10261042.
60. Chen X., Zhang Z., Liu R., Zhang X., Chen J., Peng Y. 2011. Effect of the metals lead and zinc on the growth, development and reproduction of *Pardosa astrigera* (Aranae: Lycosidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*; 86: 203-207.
61. Cho Y.-M., Mizuta Y., Akagi J.I., Toyoda T., Sone M., Ogawa K. 2018. Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *J. Toxicol. Pathol.* 31: 73–80.
62. Choi, Y., Kim, H.-A., Kim, K.-W., Lee, B.-T., 2018. Comparative toxicity of silver nanoparticles and silver ions to *Escherichia coli*. *J. Environ. Sci.* 66: 50–60.
63. Christie, T., Brathwaite, B. 1996. Mineral commodity report 13—silver. *N. Z. Mining.* 20, 16–23.
64. Chunjaturas W., Ferguson J.A., Rattanapichai W., Sadowsky M.J., Sajjaphan K. 2014. Shift of bacterial community structure in two Thai soil series affected by silver nanoparticles using ARISA. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 2119–2124.
65. Colman B.P., Arnaout C.L., Anciaux S., Gunsch C.K., Hochella Jr., M.F., Kim B., Lowry G.V., McGill B.M., Reinsch B.C., Richardson C. 2013. Low concentrations of silver nanoparticles in biosolids cause adverse ecosystem responses under realistic field scenario. *PLoS One.* 8: e57189.
66. Cong Y., Banta G.T., Selck H., Berhanu D., Valsami-Jones E., Forbes V.E. 2014. Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated silver nanoparticles in the estuarine polychaete, *Nereis (Hediste) diversicolor*, *Aquat. Toxicol.* 156: 106115.
67. Correa-Garhwal S.M., Chaw R.C., Clarke T.H., Ayoub N.A., Hayashi C.Y. 2017. Silk gene expression of theridiid spiders, implications for male-specific silk use. *Zoology.* 122: 107–114.
68. Corsi I., Desimone M.F., Cazenave J. 2022. Building the bridge from aquatic nanotoxicology to safety by design silver nanoparticles. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 10: 28.

69. Courtois P., Rorat A., Lemiere S., Guyoneaud R., Attard E., Levard C., Vandebulcke F. 2019. Ecotoxicology of silver nanoparticles and their derivatives introduced in soil with or without sewage sludge: a review of effects on microorganisms, plants and animals. *Environ. Pollut.* 253: 578–598.
70. Coynel A., Gorse L., Curti C., Schafer J., Grosbois C., Morelli G., Ducassou E., Blanc G., Maillet G.M., Mojtahid M. 2016. Spatial distribution of trace elements in the Surface sediments of a major European estuary (Loire Estuary, France): source identification and evaluation of anthropogenic contribution. *J. Sea Res.* 118: 77–91.
71. Craig C., Hsu M., Kaplan D., Pierce N. 1999. A comparison of the composition of silk proteins produced by spiders and insects. *Int. J. Biol. Macromol.* 24(2-3): 109–118.
72. Craig C., Riekel C., Herberstein M., Weber R., Kaplan D., Pierce N. 2000. Evidence for diet effects on the composition of silk proteins produced by spiders. *Molec. Biol. Evol.* 17(12): 1904–1913.
73. Crowther R.J. 2009. *The ELISA Guidebook*. Springer.
74. Dallinger R. 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates, in: Dallinger R., Rainbow P. (Eds.), *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 245–289.
75. Dang F., Huang Y., Wang Y., Zhou D., Xing B. 2021. Transfer and toxicity of silver nanoparticles in the food chain. *Environ. Sci. Nano.* 8 (6), 1519–1535.
76. Dang F., Wang Q., Cai W., Zhou D., Xing B. 2020. Uptake kinetics of silver nanoparticles by plant: relative importance of particles and dissolved ions. *Nanotoxicology.* 14 (5): 654–666.
77. Das B., Tripathy S., Adhikary J., Chattopadhyay S., Mandal D., Dash S.K., Das S., Dey A., Dey S.K., Das D., Roy S., 2017. Surface modification minimizes the toxicity of silver nanoparticles: an in vitro and in vivo study. *J. Biol. Inorg. Chem.* 22: 893–918.
79. De Matteis V., Malvindi M. A., Galeone A., Brunetti V., De Luca E., Kote S., Kshirsagar P., Sabella S., Bardi G., Pompa P. P. 2015. Negligible particle-specific toxicity mechanism of silver nanoparticles: the role of Ag⁺ ion release in the cytosol. *Nanomedicine.* 11(3): 731–739.
80. Demir E., Vales G., Kaya B., Creus A., Marcos R. 2011. Genotoxic analysis of silver nanoparticles in *Drosophila*. *Nanotoxicology.* 5(3): 417–424.
81. Deycard V.N., Schäfer J., Petit J.C.J., Coynel A., Lancelleur L., Dutruch L., Bossy C., Ventura A., Blanc G. 2017. Inputs, dynamics and potential impacts of silver (Ag) from urban wastewater to a highly turbid estuary (SW France). *Chemosphere.* 167: 501–511.
82. Dicko C., Vollrath F., Kenney J. 2004. Spider silk protein refolding is controlled by changing pH. *Biomacromolecules.* 5(3): 704–710.
83. Diez-Ortiz M., Lahive E., George S., Ter Schure A., Van Gestel C.A.M., Jurkschat K. 2015. Short-term soil bioassays may not reveal the full toxicity potential for nanomaterials; bioavailability and toxicity of silver ions (AgNO₃) and silver nanoparticles to earthworm *Eisenia fetida* in long-term aged soils, *Environ. Pollut.* 203: 191198.
84. Ding Q., Liu D., Guo D., Yang F., Pang X., Che R., Zhou N., Xie J., Sun J., Huang Z., Gu N., 2017. Shape-controlled fabrication of magnetite silver hybrid nanoparticles with high performance magnetic hyperthermia. *Biomaterials* 124: 35–46.
85. Doolette C.L., Gupta V.V., Lu Y., Payne J.L., Batstone D.J., Kirby J.K., Navarro D.A., McLaughlin M.J. 2016. Quantifying the sensitivity of soil microbial communities to silver sulfide nanoparticles using metagenome sequencing. *PLoS One.* 11: e0161979.

86. Du J., Tang J., Xu S., Ge J., Dong Y., Li H., Jin M. 2018. A review on silver nanoparticles induced ecotoxicity and the underlying toxicity mechanisms. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 98, 231–239.
87. Ebabe Elle, R., Gaillet S., Vide J., Romain C., Lauret C., Rugani N., Cristol J. P., Rouanet J. M. 2013.
88. Dietary exposure to silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats: effects on oxidative stress and inflammation. *Food Chem. Toxicol.* 60: 297-301.
89. Eberhard W. 1990. Function and phylogeny of spider webs. *Annu. Rev. Ecol. Sys.* 21: 341–372.
90. Eckelman, M. J., Graedel T. E. (2007). "Silver emissions and their environmental impacts: a multilevel assessment." *Environ Sci Technol* 41(17): 6283-6289.
91. Egodage D., Jayalath H., Samarasekara A., Amarasinghe D. 2016. Fabrication of antimicrobial material for food packaging applications. *Proceedings of International Forestry and Environment Symposium*: <https://doi.org/10.31357/fesympo.v21i0.3080>.
92. El Mahdy, M. M., Eldin T. A., Aly H. S., Mohammed F. F., Shaalan M. I. 2015. Evaluation of hepatotoxic and genotoxic potential of silver nanoparticles in albino rats. *Exp. Toxicol. Pathol.* 67(1): 21-29.
93. Emamifar A., Kadivar M., Shahedi M. 2010. Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice. *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (4): 742–748.
94. Eraly D., Hendrickx F., Backeljau T., Bervoest L., Lens L. 2011. Direct and indirect effects of metal stress on physiology and life history variation in field populations of a lycosid spider. *Ecotoxicol. And Environ. Safe.* 74: 1489-1497.
95. Farkas J., Peterc H., Christiand P., Urreae J., Hassellöve M., Tuoriniemie J., Gustafssonf S., Olssonf E., Hyllandab K., Thomas K. 2011. Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. *Environ. Internat.* 37(6): 1057–1062.
96. Farkas J., Peterc H., Christiand P., Urreae J., Hassellöve M., Tuoriniemie J., Gustafssonf S., Olssonf E., Hyllandab K., Thomas K. 2011. Characterization of the effluent from a nanosilver producing washing machine. *Environ. Internat.* 37(6): 1057–1062.
97. Feng H., Pyykko I., Zou J. 2014. Hyaluronan up-regulation is linked to renal dysfunction and hearing loss induced by silver nanoparticles. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 272(10): 2629-2642.
98. Feng Q. L., Wu J., Chen G. Q., Cui F. Z., Kim T. N., Kim J. O. 2000. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J. Biomed. Mater. Res.* 52(4): 662-668.
99. Fernandez A., Picouet P., Lloret E. 2010. Reduction of the spoilage-related microflora in absorbent pads by silver nanotechnology during modified atmosphere packaging of beef meat. *J. Food Prot.* 73 (12): 2263–2269.
100. Fijalkowski K., Rorat A., Grobelak A., Kacprzak M.J. 2017. The presence of contaminations in sewage sludge – the current situation. *J. Environ. Manag.* 203: 1126–1136.
101. Foldbjerg R., Olesen P., Hougaard M., Dang D. A., Hoffmann H. J., Autrup H. 2009. PVP-coated silver nanoparticles and silver ions induce reactive oxygen species, apoptosis and necrosis in THP-1 monocytes. *Toxicol. Lett.* 190(2): 156-162.
102. Foltynowicz Z., Gwiazdowska D., Rodewald D., Nowaczyk A., Filipiak M. 2013. Antimicrobial Properties of Socks Protected with Silver Nanoparticles. *Fibres and Textiles in Eastern Europe.* 5(101): 91–96.

103. Forstner C., Orton T.G., Wang P., Kopittke P.M., Dennis P.G. 2019. Soil chloride content influences the response of bacterial but not fungal diversity to silver nanoparticles entering soil via wastewater treatment processing. *Environ. Pollut.* 255: 113274.
104. Fries R., Greßler S., Simkó M., Gázsó A., Fiedeler U., Nentwich N. 2010. Nanosilver. NanoTrust-Dossier nr 010en.: 1-6.
105. Gagne F., Auclair J., Turcotte P., Gagnon C. 2013. Sublethal effects of silver nanoparticles and dissolved silver in freshwater mussels. *J. Toxicol. Environ. Health. A* 76(8): 479-490.
106. Gajbhiye M., Kesharwani J., Ingle A., Gade A., Rai M. 2009. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomedicine.* 5(4): 382-386.
107. Galdiero S., Falanga A., Vitiello M., Cantisani M., Marra V., Galdiero M. 2011. Silver nanoparticles as potential antiviral agents. *Molecules.* 16(10): 8894-8918.
108. Gallon C., Flegal A.R. 2015. Sources, fluxes, and biogeochemical cycling of silver in the oceans. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 235: 27-48.
109. Gao Y., Wu W., Qiao K., Feng J., Zhu L., Zhu X. 2021. Bioavailability and toxicity of silver nanoparticles: determination based on toxicokinetic-toxicodynamic processes. *Water Res.* 204: 117603.
110. Garcia-Reyero N., Kennedy A. J., Escalon B. L., Habib T., Laird J. G., Rawat A., Wiseman S., Hecker M., Denslow N., Steevens J. A., Perkins E. J. 2014. Differential effects and potential adverse outcomes of ionic silver and silver nanoparticles in vivo and in vitro. *Environ. Sci. Technol.* 48(8): 4546-4555.
111. Garcia-Reyero N., Thornton C., Hawkins A.D., Escalon L., Kennedy A.J., Steevens J.A. 2017. Assessing the exposure to nanosilver and silver nitrate on fathead minnow gill gene expression and mucus production. *Environ. Nanotechnol. Monit. Manag.* 4: 5866.
112. Ge L., Li Q., Wang M., Ouyang J., Li X., Xing M. M. 2014. Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *Int. J. Nanomedicine.* 9: 2399-2407.
113. Genter M. B., Newman N. C., Shertzer H. G., Ali S. F., Bolon B. 2012. Distribution and systemic effects of intranasally administered 25 nm silver nanoparticles in adult mice. *Toxicol. Pathol.* 40(7): 1004-1013.
114. Ghosh J.M.M., Sinha S., Chakraborty A., Mallick S.K., Bandyopadhyay M., Mukherjee A. 2012. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 749: 60-69.
115. Gliga A. R., Skoglund S., Wallinder I. O., Fadeel B., Karlsson H. L. 2014. Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles in human lung cells: the role of cellular uptake, agglomeration and Ag release. *Part Fibre Toxicol.* 11: 11.
116. Goetz N., Fabricius L., Glaus R., Weitbrecht V., Gunther D., Hungerbühler K. 2013. Migration of silver from commercial plastic food containers and implications for consumer exposure assessment. *Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 30(3): 612-620.
117. Gomes T., Araújo O., Pereira R., Almeida A.C., Cravo A., Bebianno M.J. 2013a. Genotoxicity of copper oxide and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 84: 51-59.
118. Gordon O., Vig Slenters T., Brunetto P. S., Villaruz A. E., Sturdevant D. E., Otto M., Landmann R., Fromm K. M. 2010. Silver coordination polymers for prevention of implant infection: thiol interaction, impact on respiratory chain enzymes, and hydroxyl radical induction. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(10): 4208-4218.

119. Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W., Nowack B. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.* 43: 9216–9222.
120. Graudins A., Gunja N., Broady K.W., Nicholson G.M. 2002. Clinical and in vitro evidence for the efficacy of Australian red-back spider (*Latrodectus hasselti*) antivenom in the treatment of envenomation by a Cupboard spider (*Steatoda grossa*). *Toxicon.* 40(6): 767–775.
121. Gromadzka-Ostrowska J., Dziendzikowska K., Lankoff A., Dobrzyńska M., Instanes C., Brunborg G., Gajowik A., Radzikowska J., Wojewódzka M., Kruszewski M. 2012. Silver nanoparticles effects on epididymal sperm in rats. *Toxicol. Lett.* 214, 251–258.
122. Grün A.L., Manz W., Kohl Y.L., Meier F., Straskraba S., Jost C., Drexel R., Emmerling C. 2019. Impact of silver nanoparticles (AgNP) on soil microbial community depending on functionalization, concentration, exposure time, and soil texture. *Environ. Sci. Eur.* 31: 15.
123. Guehrs K., Schlott B., Grosse F., Weisshart, K. 2008. Environmental conditions impinge on dragline silk protein composition. *Insect Molec. Biol.* 17(5): 553–564.
124. Guo L., Yuan W., Lu Z., Li Ch. 2013. Polymer/nanosilver composite coatings for antibacterial applications. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 439: 69–83.
125. Haase A., Arlinghaus H. F., Tentschert J., Jungnickel H., Graf P., Manton A., Draude F., Galla S., Plendl J., Goetz M. E., Masic A., Meier W., Thunemann A. F., Taubert A., Luch A. 2011. Application of laser postionization secondary neutral mass spectrometry/time-of-flight secondary ion mass spectrometry in nanotoxicology: visualization of nanosilver in human macrophages and cellular responses. *ACS Nano.* 5(4): 3059-3068.
126. Hachicho N., Hoffmann P., Ahlert K., Heipieper H. J. 2014. Effect of silver nanoparticles and silver ions on growth and adaptive response mechanisms of *Pseudomonas putida* mt-2. *FEMS Microbiol. Lett.* 355(1): 71-77.
127. Haghghat F., Kim Y., Sourinejad I., Yu I.J. 2021. Titanium dioxide nanoparticles affect the toxicity of silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere.* 262: 127805.
128. Hann SW. 1994. Descriptions of four *Steatoda* species (Araneae, Theridiidae) found in New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology.* 21(2): 225-238.
129. Hayashi C., Lewis R. 2001. Spider flagelliform silk: lessons in protein design, gene structure, and molecular evolution. *BioEssays.* 8: 750–756.
130. Hayashi C., Shipley N., Lewis R. 1999. Hypotheses that correlate the sequence, structure, and mechanical properties of spider silk proteins. *International J. Biol. Macromol.* 24: 271–275.
131. Hazeem L.J., Kuku G., Dewailly E., Slomianny C., Barras A., Hamdi A. 2019. Toxicity effect of silver nanoparticles on photosynthetic pigment content, growth, ROS Production and ultrastructural changes of microalgae *Chlorella vulgaris*, *Nanomaterials.* 9(7): 914.
132. Hendrickx F., Maelfait J., Langenbick F. 2003. Absence of cadmium excretion and high assimilation result in cadmium biomagnification in a wolf spider. *Ecotox. Environ. Safe.* 55: 287–292.
133. Heydrnejad M. S., Samani R. J., Aghaeivanda S. 2015. Toxic Effects of Silver Nanoparticles on Liver and Some Hematological Parameters in Male and Female Mice (*Mus musculus*). *Biol. Trace. Elem. Res.* 165(2): 153-158.
134. Hose G., James J., Gray M. 2002. Spider webs as environmental indicators. *Environ. Pollut.* 120: 725-733.

135. Hristozov D., Gottardo S., Semenzin E., Oomen A., Bos P., Peijnenburg W., van Tongeren M., Nowack B., Hunt N., Brunelli A., Scott-Fordsmand J. J., Tran L., Marcomini A. 2016. Frameworks and tools for risk assessment of manufactured nanomaterials. *Environ. Int.* 95: 36-53.
136. Hsiao I.L., Hsieh Y.K., Wang C.-F., Chen I.C., Huang Y.J. 2015. Trojan-Horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis. *Environ. Sci. Technol.* 49: 3813–3821.
137. Hsin Y. H., Chen C. F., Huang S., Shih T. S., Lai P. S., Chueh P. J. 2008. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. *Toxicol. Lett.* 179(3): 130-139.
138. Huang Y., Li X., Liao Z. 2007. A randomized comparative trial between Acticoat and SD-Ag in the treatment of residual burn wounds, including safety analysis. *J. Burns.* 33 (2): 161–166.
139. Hunter B.A., Johnson M.S., Thompson D.J. 1987. Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem. *J. of Appl. Eco.* 24(2): 587-599.
140. Ivask A., Kurvet I., Kasemets K., Blinova I., Aruoja V., Suppi S., Vija H., Kallinen A., Titma T., Heinlaan M., Visnapuu M., Koller D., Kisand V., Kahru A. 2014. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS One* 9 (7): e102108.
141. Javed M.B., Cuss C.W., Shotyk W. 2020. Dissolved versus particulate forms of trace elements in the Athabasca River, upstream and downstream of bitumen mines and upgraders. *Appl. Geochem.* 122, 104706.
142. Jesmer A.H., Velicogna J.R., Schwertfeger D.M., Scroggins R.P., Princz J.I. 2017. The toxicity of silver to soil organisms exposed to silver nanoparticles and silver nitrate in biosolids-amended field soil. *Environ. Toxicol. Chem.* 36: 2756–2765.
143. Jimenez-Lamana J., Laborda F., Bolea E., Abad-Alvaro I., Castillo J. R., Bianga J., He M., Bierla K., Mounicou S., Ouerdane L., Gaillet S., Rouanet J. M., Szpunar J. 2014. "An insight into silver nanoparticles bioavailability in rats." *Metallomics* 6(12): 2242-2249.
144. Johnson A.C., Jürgens M.D., Lawlor A.J., Cisowska I., Williams R.J. 2014. Particulate and colloidal silver in sewage effluent and sludge discharged from British wastewater treatment plants. *Chemosphere.* 112: 49–55.
145. Jong W. H., Ven L. T., Sleijffers A., Park M. V., Jansen E. H., Van Loveren H., Vandebriel R. J. 2013. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. *Biomaterials.* 34(33): 8333-8343.
146. Joshi N., Ngwenya B. T., Butler I. B., French C. E. 2015. Use of bioreporters and deletion mutants reveals ionic silver and ROS to be equally important in silver nanotoxicity. *J. Hazard. Mater.* 287: 51-58.
147. Judy J.D., Kirby J.K., Creamer C., McLaughlin M.J., Fiebigler C., Wright C., Cavagnaro T.R., Bertsch P.M. 2015a. Effects of silver sulfide nanomaterials on mycorrhizal colonization of tomato plants and soil microbial communities in biosolid-amended soil. *Environ. Pollut.* 206, 256–263.
148. Judy J.D., McNear D.H., Chen C., Lewis R.W., Tsyusko, O.V., Bertsch P.M., Rao W., Stegemeier J., Lowry G.V., McGrath S.P., Durenkamp M., Unrine J.M. 2015b. Nanomaterials in Biosolids Inhibit Nodulation, Shift Microbial Community Composition, and Result in Increased Metal Uptake Relative to Bulk/Dissolved Metals. *Environ. Sci. Technol.* 49: 8751–8758.
149. Juncos R., Campbell L., Arcagni, M., Daga R., Rizzo A., Arribère M., Ribeiro Guevara S. 2017. Variations in anthropogenic silver in a large Patagonian lake correlate with global shifts in photographic processing technology. *Environ. Pollut.* 223: 685–694.

150. Kaegi R., Voegelin A., Sinnet B., Zuleeg S., Hagendorfer H., Burkhardt M., Siegrist H. 2011. Behavior of metallic silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3902-3908.
151. Kalishwaralal K., BarathManiKanth S., Pandian S. R., Deepak V., Gurunathan S. 2010. Silver nanoparticles impede the biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. *Colloids. Surf. B. Biointerfaces.* 79(2): 340-344.
152. Kalman J., Paul K.B., Khan F.R., Stone V., Fernandes T.F. 2015. Characterisation of bioaccumulation dynamics of three differently coated silver nanoparticles and aqueous silver in a simple freshwater food chain, *Environ. Chem.* 12: 662672.
153. Katsumiti A., Gilliland D., Arostegui I., Cajaraville M.P. 2015. Mechanisms of toxicity of Ag nanoparticles in comparison to bulk and ionic Ag on mussel hemocytes and gill cells. *PLoS One.* 10(6): e0129039.
154. Khan Z., Al-Thabaiti S., Obaid A., Al-Youbi A. 2010. Preparation and characterization of silver nanoparticles by chemical reduction method. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 82(2): 513-517.
155. Khandelwal S, Sharma VK. Observations on the breeding pattern of *Steatoda grossa* (C.L. Koch, 1838). *Indian Society of Arachnology.* 2013; 2(2): 61-65.
156. Khodaparast Z., van Gestel C.A.M., Papadiamantis A.G., Gonçalves S.F., Lynch I., Loureiro S. 2021. Toxicokinetics of silver nanoparticles in the mealworm *Tenebrio molitor* exposed via soil or food. *Sci. Total. Environ.* 777: 146071.
157. Kim K. T., Truong L., Wehmas L., Tanguay R. L. 2013. Silver nanoparticle toxicity in the embryonic zebrafish is governed by particle dispersion and ionic environment. *Nanotechnology* 24 (11): 115101.
158. Kim Y. S., Song M. Y., Park J. D., Song K. S., Ryu H. R., Chung Y. H., Chang H. K., Lee J. H., Oh K. H., Kelman B. J., Hwang I. K., Yu I. J. 2010. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre. Toxicol.* 7: 20.
159. Kim Y., Yang S., Ryu J. 2010. Cytotoxicity and genotoxicity of nano-silver in mammalian cell lines. *Mol. Cell. Toxicol.* 6: 119–125.
160. Knight D., Vollrath F. 2001. Changes in element composition along the spinning duct in a *Nephila* spider. *Naturwissenschaften.* 88: 179–182.
161. Köhler T., Vollrath F. 1995. Thread biomechanics in the two orb-weaving spiders *Araneus diadematus* (Araneae, Araneidae) and *Uloborus walckenaerius* (Araneae, Uloboridae). *J. Exp. Zool.* 271: 1–17.
162. Korani M., Ghazizadeh E., Korani S., Hami Z., Mohammadi-Bardbori A. 2015. Effects of silver nanoparticles on human health. *Eur. J. Nanomed.* 7: 51–62.
163. Korani M., Rezayat S., Gilani K., Bidgoli A., Adeli S. 2011 Acute and subchronic dermal toxicity of nanosilver in guinea pig. *Int. J. Nanomedicine.* 6: 855–862.
164. Kozakowska, M., Dulak J., Jozkowicz A. (2015). Heme oxygenase-1 - more than the cytoprotection. *Postepy Biochem* 61(2): 147-158.
165. Kumar N., Shah V., Walker V. 2011. Perturbation of an arctic soil microbial community by metal nanoparticles. *J. Hazard. Mater.*, 190(1-3): 816-822.
166. Lackner P., Beer R., Broessner G., Helbok R., Galiano K., Pleifer C., Pfausler B., Brenneis C., Huck C., Engelhardt K., Obwegeser A.A., Schmutzhard E. 2008. Efficacy of silver nanoparticles-impregnated external ventricular drain catheters in patients with acute occlusive hydrocephalus. *J. Neurocrit. Care.* 8: 360–365.

167. Lara H. H., Ayala-Nunez N. V., Ixtapan-Turrent L., Rodriguez-Padilla C. 2010. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J. Nanobiotechnology*. 8: 1.
168. Lee B., Duong C.N., Cho J., Lee J., Kim K., Seo Y. 2012. Toxicity of citrate-capped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*), *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 262670.
169. Lee T. Y., Liu M. S., Huang L. J., Lue S. I., Lin L. C., Kwan A. L., Yang R. C. 2013b. Bioenergetic failure correlates with autophagy and apoptosis in rat liver following silver nanoparticle intraperitoneal administration. *Part Fibre Toxicol.* 10: 40.
170. Lee W., Kim K. J., Lee D. G. 2014a. A novel mechanism for the antibacterial effect of silver nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biometals*. 27(6): 1191-1201.
171. Lee Y. H., Cheng F. Y., Chiu H. W., Tsai J. C., Fang C. Y., Chen C. W., Wang Y. J. 2014b. Cytotoxicity, oxidative stress, apoptosis and the autophagic effects of silver nanoparticles in mouse embryonic fibroblasts. *Biomaterials*. 35(16): 4706-4715.
172. Lee Y., Kim P., Yoon J., Lee B., Choi K., Kil K. H., Park K. 2013c. Serum kinetics, distribution and excretion of silver in rabbits following 28 days after a single intravenous injection of silver nanoparticles. *Nanotoxicology*. 7(6): 1120-1130.
173. Lee B., Duong C. N., Cho J., Lee J., Kim K., Seo Y., Kim P., Choi K., Yoon J. 2012. Toxicity of citratecapped silver nanoparticles in common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 262670.
174. Lee, J. H., Kim Y. S., Song K. S., Ryu H. R., Sung J. H., Park J. D., Park H. M., Song N. W., Shin B. S., Marshak D., Ahn K., Lee J. E., Yu I. J. 2013a. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Part. Fibre. Toxicol.* 10: 36.
175. Li J. J., Hartono D., Ong C. N., Bay B. H., Yung L. Y. 2010. Autophagy and oxidative stress associated with gold nanoparticles. *Biomaterials*. 31(23): 5996-6003.
176. Li L., Hartmann G., Döblinger M., Schuster M. 2013. Quantification of nanoscale silver particles removal and release from municipal wastewater treatment plants in Germany. *Environ. Sci. Technol.* 47: 7317–7323.
177. Liao C., Li Y., Tjong S.C. 2019. Bactericidal and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 449.
178. Likus W., Bajor G., Siemianowicz K. 2013. Nanosilver – does it have only one face? *Acta Biochim. Pol.* 60(4): 495-501.
179. Lima R., Seabra A.B., Durán N. 2012. Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *J. Appl. Toxicol.* 32, 867–879.
180. Liu W., Wu Y., Wang C., Li H. C., Wang T., Liao C. Y., Cui L., Zhou Q. F., Yan B., Jiang G. B. 2010. Impact of silver nanoparticles on human cells: effect of particle size. *Nanotoxicology*. 4 (3): 319-330.
181. Livingstone DR. 2001. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 42(8): 656-666.
182. Loeschner K., Hadrup N., Qvortrup K., Larsen A., Gao X., Vogel U., Mortensen A., Lam H. R., Larsen E. H. 2011. Distribution of silver in rats following 28 days of repeated oral exposure to silver nanoparticles or silver acetate. *Part Fibre Toxicol.* 8: 18
183. Lok C. N., Ho C. M., Chen R., He Q. Y., Yu W. Y., Sun H., Tam P. K., Chiu J. F., Che C. M. 2007. Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12(4): 527-534.
184. Lombi E., Donner E., Taheri S., Tavakkoli E., Jämting Å.K., McClure S., Naidu R., Miller B.W., Scheckel K.G., Vasilev K. 2013. Transformation of four silver/silver chloride nanoparticles during

- anaerobic treatment of wastewater and post-processing of sewage sludge. *Environ. Pollut.* 176: 193-197.
- 185.** Lu L., Sun R. W., Chen R., Hui C. K., Ho C. M., Luk J. M., Lau G. K., Che C. M. 2008. Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication. *Antivir. Ther.* 13(2): 253-262.
- 186.** Luo Y., Wang W.X. 2022. Roles of hemocyte subpopulations in silver nanoparticle transformation and toxicity in the oysters *Crassostrea hongkongensis*. *Environmental Pollution.* 305: 119281.
- 187.** Luoma S.N. 2008. Silver nanotechnologies and the environment. *The Project on Emerging Nanotechnologies Report.* 15. pp. 12–13.
- 188.** Luther E. M., Schmidt M. M., Diendorf J., Epple M., Dringen R. 2012. Upregulation of metallothioneins after exposure of cultured primary astrocytes to silver nanoparticles. *Neurochem. Res.* 37(8): 1639-1648.
- 189.** Lysakowska M., Denys P. 2009. Antimicrobial uses of silver. *Kwart. Ortop.* 4: 408–417.
- 190.** Ma R., Levard C., Judy J.D., Unrine J.M., Durenkamp M., Martin B., Jefferson B., Lowry G.V. 2014. Fate of zinc oxide and silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant and in processed biosolids. *Environ. Sci. Technol.* 48: 104–112.
- 191.** Mackevica A., Olsson M. E., Hansen S. F. 2016. The release of silver nanoparticles from commercial toothbrushes. *J. Hazard Mater.* 15(A): 270-275.
- 192.** Madsen B., Shao Z., Vollrath F. 1999. Variability in the mechanical properties of spider silks on three levels: interspecific, intraspecific and intraindividual. *Int. J. Biol. Macromol.* 24(2–3): 301–306.
- 193.** Magesky A., Pelletier É. 2018. Cytotoxicity and Physiological Effects of Silver Nanoparticles on Marine Invertebrates. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1048: 285-309.
- 194.** Makama S., Piella J., Undas A., Dimmers W.J., Peters R., Puentes V.F. 2016. Properties of silver nanoparticles influencing their uptake in and toxicity to the earthworm *Lumbricus rubellus* following exposure in soil, *Environ. Pollut.* 218: 870878.
- 195.** Martelli A., Rousselet E., Dycke C., Bouron A., Moulis J. 2006. Cadmium toxicity in animal cells by interference with essential metals. *Biochemie.* 88(11): 1807–1814.
- 196.** Massarsky M., Abraham R., Nguyen K.C., Rippstein P., Tayabali A.F., Trudeau V.L. 2014. Nanosilver cytotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocytes and hepatocytes, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 159: 1021.
- 197.** McCarthy M.P., Carroll D.L., Ringwood A.H. 2013. Tissue specific responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to silver nanoparticles. *Aquat. Toxicol.* 138-139: 123–128.
- 198.** McShan D., Ray P.C., Yu H. 2014. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J. Food Drug Anal.* 22: 116127.
- 199.** Meier, C., Voegelin, A., Pradas del Real, A., Sarret, G., Mueller, C.R., Kaegi, R. 2016. Transformation of silver nanoparticles in sewage sludge during incineration. *Environ. Sci. Technol.* 50: 3503–3510.
- 200.** Metcalfe C.D., Sultana T., Martin J., Newman K., Helm P., Kleywegt S., Shen L., Yargeau V. 2018. Silver near municipal wastewater discharges into western Lake Ontario, Canada. *Environ. Monit. Assess.* 190: 555.
- 201.** Meyer J.N., Lord C.A., Yang X.Y., Turner E.A., Badireddy A.R., Marinakos S.M., Chilkoti A., Wiesner M.R., Auffan M. 2010. Intracellular uptake and associated toxicity of silver nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. *Aquat. Toxicol.* 100: 140–150.

202. Miao A.J., Luo Z., Chen C.S., Chin W.C., Santschi P.H., Quigg A. 2010. Intracellular uptake: a possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*. *PLoS One*. 5: 613.
203. Michalik M., Surmacka M., Stalmach M., Wilczek G., Kowalska T., Sajewicz M. 2018. Application of Thin-Layer Chromatography to Ecotoxicological Study with the *Steatoda grossa* Spider Web. *Journal of Planar Chromatography*. 31(1): 1–6.
204. Migula P. Wilczek G., Babczyńska A. 2013. Effects of heavy metal contamination. In: Nentwig W. (eds.) *Spider Ecophysiology* Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 403-413.
205. Momin J.K., Jayakumar C., Prajapati J.B. 2013. Potential of nanotechnology in functional foods. *Emirates J. Food Agric*. 25 (1): 10–19.
206. Monteiro D. R., Takamiya A. S., Feresin L. P., Gorup L. F., de Camargo E. R., Delbem A. C., Henriques M., Barbosa D. B. 2015. Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms to silver nanoparticles in intermediate and mature development phases. *J. Prosthodont. Res.* 59(1): 42–48.
207. Monteiro-Riviere, N. A., Tran, L. (2014). *Safety implications of nanomaterial exposure to skin*. Boca Raton, CRC Press.
208. Moon M.J., An J.S. 2006. Microstructure of the silk apparatus of the comb-footed spider, *Achaearanea tepidariorum* (Araneae, Theridiidae). *Entomol. Res.* 36: 56–63.
209. Morones J. R., Elechiguerra J. L., Camacho A., Holt K., Kouri J. B., Ramirez J. T., Yacaman M. J. 2005. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 16(10): 2346-2353.
210. Mrowiec B., Kosut N. 2015. Commonness of nanosilver application as an environmental risk factor. *Chemik*. 69(10): 654–659.
211. Nadworny P.L., Wang J., Tredget E.E., Burrell R.E. 2008. Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* 4: 241–251.
212. Nentwig W. 2013. *Spider Ecophysiology*. Springer.
213. Niemirowicz K., Markiewicz K. H., Wilczewska A. Z., Car H. 2012. Magnetic nanoparticles as a new diagnostics tools in medicine. *Adv. Med. Sci.* 57: 196-207.
214. Nishanth R. P., Jyotsna R. G., Schlager J. J., Hussain S. M., Reddanna P. 2011. Inflammatory responses of RAW 264.7 macrophages upon exposure to nanoparticles: role of ROS-NFκB signaling pathway. *Nanotoxicology*. 5(4): 502-516.
215. Nowack B., Krug, H.F., Height, M. 2011. 120 Years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environ. Sci. Technol.* 45: 1177–1183.
216. Orłowski P., Tomaszewska E., Gniadek M., Baska P., Nowakowska J., Sokolowska J., Nowak Z., Donten M., Celichowski G., Grobelny J., Krzyzowska M. 2014. Tannic acid modified silver nanoparticles show antiviral activity in herpes simplex virus type 2 infection. *PLoS One*. 9(8): e104113.
217. Orr C.W.M. 1970. The inhibition of catalase (hydrogen-peroxide: Hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1.11.1.6) by ascorbate. *Methods in Enzymology*. 18A: 59-62.
218. P.E. Buffet, J.F. Pan, L. Poirier, C. Amiard-Triquet, J.C. Amiard, P. Gaudin, et al., Biochemical and behavioural responses of the endobenthic bivalve *Scrobicularia plana* to silver nanoparticles in seawater and microalgal food. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89 (2013) 117124.

219. Palanisamy N. K., Ferina N., Amirulhusni A. N., Mohd-Zain Z., Hussaini J., Ping L. J., Durairaj R. 2014. Antibiofilm properties of chemically synthesized silver nanoparticles found against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Nanobiotechnology*. 12: 2.
220. Park E. J., Bae E., Yi J., Kim Y., Choi K., Lee S. H., Yoon J., Lee B. C., Park K. 2010a. Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 30(2): 162-168.
221. Park E. J., Yi J., Kim Y., Choi K., Lee J. H., Kim Y. S., Song K. S., Ryu H. R., Sung J. H., Park J. D., Park H. M., Song N. W., Shin B. S., Marshak D., Ahn K., Lee J. E., Yu I. J. 2013a. Biopersistence of silver nanoparticles in tissues from Sprague-Dawley rats. *Part Fibre Toxicol.* 10: 36.
222. Park E. J., Yi J., Kim Y., Choi K., Park K. 2010b. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism. *Toxicol. In Vitro.* 24(3): 872-878.
223. Park K., Park E. J., Chun I. K., Choi K., Lee S. H., Yoon J., Lee B. C. 2011a. Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Arch. Pharm. Res.* 34(1): 153-158.
224. Park M. V., Neigh A. M., Vermeulen J. P., de la Fonteyne L. J., Verharen H. W., Briede J. J., van Loveren H., de Jong W. H. 2011b. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials.* 32 (36): 9810-9817.
225. Patlolla A.K., Hackett D., Tchounwou P.B. 2015. Genotoxicity study of silver nanoparticles in bone marrow cells of Sprague-Dawley rats. *Food Chem. Toxicol.* 85: 52-60.
226. Patlolla, A. K., Hackett D., Tchounwou P. B. (2015). "Silver nanoparticle-induced oxidative stress-dependent toxicity in Sprague-Dawley rats." *Mol Cell Biochem* 399(1-2): 257-268.
227. Patra S., Mukherjee S., Barui A.K., Ganguly A., Sreedhar B., Patra C.R. 2015. Green synthesis, characterization of gold and silver nanoparticles and their potential application for cancer therapeutics. *Mater. Sci. Eng. C* 53: 298-309.
228. Pelit L., Ertas F., Eroglu A., Shahwan T., Tural H. 2011. Biosorption of Cu(II) and Pb(II) ions from aqueous solution by natural spider silk. *Bioresource Technol.* 102(19): 8807-8813.
229. Peng G., Huma Z. E., Umair M., Hussain I., Javed, I., Shah, M.R. 2020. Chapter 8 - nanosilver at the interface of biomedical applications, toxicology, and synthetic strategies. In: Imran, M., Ullah, S. (Eds.), *Metal nanoparticles for drug delivery and diagnostic applications*. 119-139.
230. Pereira L., Dias N., Carvalho J., Fernandes S., Santos C., Lima N. 2014. Synthesis, characterization and antifungal activity of chemically and fungal-produced silver nanoparticles against *Trichophyton rubrum*. *J. Appl. Microbiol.* 117(6): 1601-1613.
231. Pham T.L. 2019. Effect of silver nanoparticles on tropical freshwater and marine microalgae, *J. Chem.* 9658386. <https://doi.org/10.1155/2019/9658386>.
232. Piao M. J., Kang K. A., Lee I. K., Kim H. S., Kim S., Choi J. Y., Choi J., Hyun J. W. 2011. Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol. Lett.* 201(1): 92-100.
233. Plaza G., Guinea G., Perez-Rigueiro J., Elices M. 2006. Thermo-hygro-mechanical behavior of spider dragline silk: Glassy and rubbery states. *Polym. Sci.* 44(6): 994-999.
234. Poudel B.K., Soe Z.C., Ruttala H.B., Gupta B., Ramasamy T., Thapa R.K., Gautam M., Ou W., Nguyen H.T., Jeong J.H., Jin S.G., Choi H.G., Yong C.S., Kim J.O. 2018. In situ fabrication of mesoporous silica coated silver-gold hollow nanoshell for remotely controllable chemo-photothermal therapy via phase change molecule as gatekeepers. *Int. J. Pharm.* 548: 92-103.

235. Powers C. M., Badireddy A. R., Ryde I. T., Seidler F. J., Slotkin T. A. 2011. Silver nanoparticles compromise neurodevelopment in PC12 cells: critical contributions of silver ion, particle size, coating, and composition. *Environ. Health. Perspect.* 119(1): 37-44.
236. Prabhu S., Poulouse E. 2012. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Inter. Nano Lett.* 2: 32
237. Pulit J., Banach M., Szczygłowska R., Bryk M. 2013. Nanosilver against fungi. Silver nanoparticles as an effective biocidal factor. *Acta Biochim. Pol.* 60(4): 795-798.
238. Pulit-Prociak J., Banach M. 2016. Silver nanoparticles—a material of the future. . .? *Open Chem.* 14: 76-91.
239. Purcell T.W., Peters J.J. 1998. Sources of silver in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 539–546.
240. Quadros M. E., Pierson R. T., Tulve N. S., Willis R., Rogers K., Thomas T. A., Marr L. C. 2013. Release of silver from nanotechnology-based consumer products for children. *Environ. Sci. Technol.* 47(15): 8894-8901.
241. Radetić M. 2013. Functionalization of textile materials with silver nanoparticles. *J. Mater. Sci.* 48 (1): 95–107.
242. Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine.* 26 (92013.10): 12312013.1237.
243. Reimann C., Fabian K. 2022. Quantifying diffuse contamination: comparing silver and mercury in organogenic and minerogenic soil. *Sci. Total Environ.* 832: 155065.
244. Ribeiro M. J., Maria V. L., Scott-Fordsmand J. J., Amorim M. J. 2015. Oxidative Stress Mechanisms Caused by Ag Nanoparticles (NM300K) are Different from Those of AgNO₃: Effects in the Soil Invertebrate *Enchytraeus Crypticus*. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 12(8): 9589-9602.
245. Ringwood A.H., McCarthy M., Bates T.C., Carroll D.L. 2010. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Mar. Environ. Res.* 69, S49–S51.
246. Rising A., Nimmervoll H., Grip S., Fernandez-Arias A., Storckenfeldt E., Knight D., Vollrath F., Engström W. 2005. Spider Silk Proteins – Mechanical Property and Gene Sequence. *Zool. Sci.* 22(3): 273–281.
247. Rocha B.C., de Azevedo Costa C.L., Ribas Ferreira J.L., da Rosa Seixas A.L., Letts R.E., Chaves I.S. 2013. Ecotoxicological risks of nanomaterials. *Explor. Themes Aquat. Toxicol.* 9: 371-393.
248. Rocha T.L., Gomes T., Giuliani Durigon E., Bebianno M.J., 2016. Subcellular partitioning kinetics, metallothionein response and oxidative damage in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to cadmium-based quantum dots. *Sci. Total Environ.* 554-555: 130–141.
249. Römer L., Scheibel T. 2008. The elaborate structure of spider silk: Structure and function of a natural high performance fiber. *Prion.* 2(4): 154–161.
250. Rybak J., Rogula- Kozłowska W., Loska K., Widziewicz K., Rutkowski R. 2019. The concentration of Cu and Pb in the funnel spider *Eratigena atrica* (C. L. Koch 1843) (Araneae: Agelenidae) and its web. *Chemistry and Ecology.* 35 (2): 179-190.
251. Sanchís J., Jiménez-Lamana J., Abad E., Szpunar J., Farré M. 2020. Occurrence of cerium-, titanium-, and silver-bearing nanoparticles in the Besòs and Ebro Rivers. *Environ. Sci. Technol.* 54: 3969–3978.
252. Santos C. A., Seckler M. M., Ingle A. P., Gupta I., Galdiero S., Galdiero M., Gade A., Rai M. 2014. Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *J. Pharm. Sci.* 103(7): 1931-1944.

253. Sarhan O. M., Hussein R. M. 2014. Effects of intraperitoneally injected silver nanoparticles on histological structures and blood parameters in the albino rat. *Int. J. Nanomedicine*. 9: 1505-1517.
254. Schluesener J., Schluesener H. 2013. Nanosilver: application and novel aspects of toxicology. *Archives of Toxicology*. 87(4): 569–576.
255. Sendra M., Yeste M.P., Gatica J.M., Moreno-Garrido I., Blasco J. 2017. Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricornutum*), *Chemosphere*. 179: 279-289.
256. Setyawati M. I., Yuan X., Xie J., Leong D. T. 2014. The influence of lysosomal stability of silver nanomaterials on their toxicity to human cells. *Biomaterials*. 35(25): 6707-6715.
257. Shafer M., Armstrong D., Overdier J., Walker M. 1994. Partitioning and fate of silver in background streams and effluent-receiving streams. *Forest*. 2: 34–43.
258. Shah A., Hussani I., Murtaza G. 2018. Chemical synthesis and characterization of chitosan/silver nanocomposites films and their potential antibacterial activity. *Inter. J. of Biol. Macromol*, 116: 520-529.
259. Sharma R., Jafari S.M., Sharma S. 2020. Antimicrobial bio-nanocomposites and their potential applications in food packaging. *Food Control*. 112: 107086.
260. Sharma V.K., Sayes C.M., Guo B., Pillai S., Parsons J.G., Wang C., Yan B., Ma X. 2019. Interactions between silver nanoparticles and other metal nanoparticles under environmentally relevant conditions: a review. *Sci. Total Environ*. 653: 1042–1051.
261. Sharma V.K., Siskova K.M., Zboril R., Gardea-Torresdey J.L. 2014. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: fate, stability and toxicity. *Adv. Colloid Interf. Sci*. 204: 15–34.
262. Shin S., Ye M., Kim H., Kang H. 2007. The effects of nano-silver on the proliferation and cytokine expression by peripheral blood mononuclear cells. *International Immunopharmacology*. 7(13): 1813–1818.
263. Shotyk W., Bicalho B., Cuss C.W., Donner M.W., Grant-Weaver I., Haas-Neill S., Javed M.B., Krachler M., Noernberg T., Pelletier R., Zaccone C. 2017. Trace metals in the dissolved fraction (<0.45µm) of the lower Athabasca River: analytical challenges and environmental implications. *Sci. Total Environ*. 580: 660–669.
264. Shrivastava S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao P., Dash, D. 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 18(22): 103-225.
265. Shukla A., Pragya P., Kar Chowdhuri D. 2011. A modified alkaline Comet assay for in vivo detection of oxidative DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res*. 726: 222–226.
266. Singh R. P., Ramarao P. 2012. Cellular uptake, intracellular trafficking and cytotoxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Lett*. 213(2): 249-259.
267. Sleiman H. K., Romano R. M., Oliveira C. A., Romano M. A. 2013. Effects of prepubertal exposure to silver nanoparticles on reproductive parameters in adult male Wistar rats. *J. Toxicol. Environ. Health*. 76(17): 1023-1032.
268. Sohail M.F., Hussain S.Z., Saeed H. 2018. Polymeric nanocapsules embedded with ultra-small silver nanoclusters for synergistic pharmacology and improved oral delivery of Docetaxel. *Sci. Rep*. 8 (1): 1-11.
269. Sondi I., Salopek-Sondi B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid. Interface. Sci*. 275(1): 177-182.

270. Stalmach M., Wilczek G., Wilczek P., Skowronek M., Medrzak M., 2015a. DNA damage in hemocytes and midgut gland cells of *Steatoda grossa* (Theridiidae) spiders exposed to food contaminated with cadmium. *Ecotoxicol. and Environ. Saf.* 113: 353-361
271. Stalmach M., Wilczek G., Homa J., Szulińska E., 2015b. Antioxidative and immunological responses in the hemolymph of wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) exposed to starvation and dimethoate. *Environ Pol.* 206: 551-559.
272. Stalmach M., Wilczek G., Wilczek P., Skowronek M., Mędrzak M. 2015. DNA damage in haemocytes and midgut gland cells of *Steatoda grossa* (Theridiidae) spiders exposed to food contaminated with cadmium. *Ecotox. Environ. Safe.* 113: 353–361.
273. Stander L., Theodore L. 2011. Environmental implications of nanotechnology--an update. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 8(2): 470-479.
274. Starnes D.L., Lichtenberg S.S., Unrine J.M., Starnes C.P., Oostveen E.K., Lowry G.V., Bertsch P.M., Tsyusko O.V., 2016. Distinct transcriptomic responses of *Caenorhabditis elegans* to pristine and sulfidized silver nanoparticles. *Environ. Pollut.* 213: 314–321.
275. Starnes D.L., Unrine J.M., Starnes C.P., Collin B.E., Oostveen E.K., Ma R., Lowry G.V., Bertsch P.M., Tsyusko O.V. 2015. Impact of sulfidation on the bioavailability and toxicity of silver nanoparticles to *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Pollut.* 196: 239–246.
276. Sung J. H., Ji J. H., Yoon J. U., Kim D. S., Song M. Y., Jeong J., Han B. S., Han J. H., Chung Y. H., Kim J., Kim T. S., Chang H. K., Lee E. J., Lee J. H., Yu I. J. 2008. Lung function changes in Sprague-Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal. Toxicol.* 20(6): 567-574.
277. Sung J. H., Ji J. H., Yoon J. U., Kim D. S., Song M. Y., Jeong J., Han B. S., Han J. H., Chung Y. H., Kim J., Kim T. S., Chang H. K., Lee E. J., Lee J. H., Yu I. J. 2008. Lung function changes in Sprague Dawley rats after prolonged inhalation exposure to silver nanoparticles. *Inhal. Toxicol.* 20(6): 567-574.
278. Sung, J. H., Ji J. H., Park J. D., Yoon J. U., Kim D. S., Jeon K. S., Song M. Y., Jeong J., Han B. S., Han J. H., Chung Y. H., Chang H. K., Lee J. H., Cho M. H., Kelman B. J., Yu I. J. 2009. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. *Toxicol. Sci.* 108(2): 452-461.
279. Świdwińska-Gajewska A., Czerczak S. 2014. Nanosrebro – szkodliwe skutki działania biologicznego. *Medycyna Pracy.* 65(6): 831–845.
280. Taju G., Abdul Majeed S., Nambi K.S.N., Sahul Hameed A.S. 2014. In vitro assay for the toxicity of silver nanoparticles using heart and gill cell lines of *Catla catla* and gill cell line of *Labeo rohita*, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 161: 4152.
281. Tamboli D. P., Lee D. S. 2013. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *J. Hazard. Mater.* 260: 878-884.
282. Tortella G.R., Rubilar O., Durán N., Diez M.C., Martínez M., Parada J., Seabra A.B. 2020. Silver nanoparticles: toxicity in model organisms as an overview of its hazard for human health and the environment. *J. Hazard. Mater.* 390: 121974.
283. Tourinho P.S., Loureiro S., Talluri V.S.S.L.P., Dolar A., Verweij R., Chvojka, J., Michalcová, A., Kočí, V., van Gestel, C.A.M. 2021. Microplastic fibers influence Ag toxicity and bioaccumulation in *Eisenia andrei* but not in *Enchytraeus crypticus*. *Ecotoxicology.* 30: 1216–1226.
284. Tso I., Chiang S., Blackledge T. 2007. Does the giant wood spider *Nephila pilipes* respond to prey variation by altering web or silk properties?. *Ethology.* 113: 324–333.

285. Tso I., Wu H., Hwang I. 2005. Giant wood spider *Nephila pilipes* alters silk protein in response to prey variation. *J. Exp. Biol.* 208: 1053–1061.
286. Vaidyanathan R., Kalishwaralal K., Gopalram S., Gurunathan E. 2009. Nanosilver – the burgeoning therapeutic molecule and its green synthesis. *Biotechnology Advances.* 27: 924.
287. Varner K., Sanford J., El-Badawy A. 2010. State of the science literature review: everything nanosilver and more. US Environmental Protection Agency. Washington DC. p. 363.
288. Vasileiadis S., Puglisi E., Trevisan M., Scheckel K.G., Langdon K.A., McLaughlin M.J., Lombi E., Donner E. 2015. Changes in soil bacterial communities and diversity in response to long-term silver exposure. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91.
289. Vazquez-Muñoz R., Borrego B., Juárez-Moreno K., García-García M., Mota Morales J.D., Bogdanchikova N., Huerta-Saquero A. 2017. Toxicity of silver nanoparticles in biological systems: does the complexity of biological systems matter? *Toxicol. Lett.* 276: 11–20.
290. Vehoff T., Glisovic A., Schollmeyer H., Zippelius A., Salditt T. 2007. Mechanical Properties of Spider Dragline Silk: Humidity, Hysteresis and Relaxation. *Biophys. J.* 93(12): 4425–4432.
291. Velicogna J.R., Ritchie E.E., Scroggins R.P., Princz J.I. 2016. A comparison of the effects of silver nanoparticles and silver nitrate on a suite of soil dwelling organisms in two field soils. *Nanotoxicology.* 10: 1144–1151.
292. Venugopal K., Rather H.A., Rajagopal K., Shanthi M.P., Sheriff K., Illiyas M., Rather R.A., Manikandan E., Uvarajan S., Bhaskar M., Maaza M. 2017. Synthesis of silver nanoparticles (Ag NPs) for anticancer activities (MCF 7 breast and A549 lung cell lines) of the crude extract of *Syzygium aromaticum*. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 167: 282–289.
293. Verano-Braga T., Wojdyla K., Miethling-Graff R., Rogowska-Wrzesinska A. 2014. Insights into the Cellular Response Triggered by Silver Nanoparticles Using Quantitative Proteomics. *ACS Nano.* 8(3): 2161–2175.
294. Vetter R.S. 2017. *Widow Spiders and their Relatives. Integrated Pest Management for Homes, Gardens, and Landscapes.* Oakland: University of California Pest Notes. 4149.
295. Vetter R.S., Stoecker W.V., Dart R.C. 2018. Envenomations by Widow, Recluse, and Medically Implicated Spiders. In: *Clinical Toxinology in Australia, Europe, and Americas.* Toxinology. Gopalakrishnakone P., Vogel C.W., Seifert S., Tambourgi D. (red.). Dordrecht: Springer. 1–26.
296. Vlachogianni T., Valavanidis A. 2014. Nanomaterials: Environmental pollution, ecological risks and adverse health effects. *Nano Sci. Nano Technol. Indian J.*, 8: 208–226.
297. Vogt R., Mozhayeva D., Steinhoff B., Schardt A., Spelz B.T.F., Philippe A., Kurtz S., Schaumann G.E., Engelhard C., Schönherr H., Lamatsch D.K., Wanzenböck J. 2019. Spatiotemporal distribution of silver and silver-containing nanoparticles in a prealpine lake in relation to the discharge from a wastewater treatment plant. *Sci. Total Environ.* 696: 134034.
298. Vollrath F., Madsen B., Shao Z. 2001. The effect of spinning conditions on the mechanics of a spider's dragline silk. *Proceedings of the Royal Society B: Biol. Sci.* 268(1483): 2339–2346.
299. Walser T., Demou E., Lang D., Hellweg S. 2011. Prospective Environmental Life Cycle Assessment of Nanosilver T-Shirts. *Environ. Sci. Technol.* 45(10): 4570–4578.
300. Wang C., Liu X., Han Z., Zhang X., Wang J., Wang K., Yang Z., Wei Z. 2019. Nanosilver induces the formation of neutrophil extracellular traps in mouse neutrophil granulocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 183: 109508.

301. Wang J. L., Alasonati E., Tharaud M., Gelabert A., Fiscaro P., Benedetti M.F. 2020. Flow and fate of silver nanoparticles in small French catchments under different land-uses: the first one-year study. *Water Res.* 176: 115722.
302. Wang X., Li T., Su X., Li J., Li W., Gan J., Wu T., Kong L., Zhang T., Tang M., Xue Y. 2019. Genotoxic effects of silver nanoparticles with/without coating in human liver HepG2 cells and in mice. *J. Appl. Toxicol.* 39: 908–918.
303. Weldon B. A., Oberdorster G., Workman T., Griffith W. C., Kneuer C., Yu I. J. 2016. Occupational exposure limit for silver nanoparticles: considerations on the derivation of a general health-based value. *Nanotoxicology.* 1-13.
304. Wilczek G. 2017. The use of spiders in the assessment of cellular effects of environmental stressors. In: Larramendy M., (Ed.). *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-Traditional Terrestrial Models. Issues in Toxicology*, Royal Society of Chemistry. pp. 96–124.
305. Wilczek G., Babczyńska A., Augustyniak M., Migula P. 2004. Relations between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient. *Environ. Pollut.* 132: 453–461.
306. Wilczek G., Babczyńska A., Majkus Z. 2005. Body burdens of metals in spiders from Lidice coal dump near Ostrava (Czech Republic). *Biologia (Bratislava).* 60: 599–605.
307. Wilczek G., Babczyńska A., Migula P., Wencelis B. 2003. Activity of esterases as biomarkers of metal exposure in spiders from the metal pollution gradient. *Pol. J. Environ. Stud.* 12: 765–771.
308. Wilczek G., Babczyńska A., Wilczek P. 2013. Antioxidative responses in females and males of the spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) exposed to natural and anthropogenic stressors. *Comp. Biochem. Physiol.* 157C: 119–131.
309. Wilczek G., Babczyńska A., Wilczek P., Doleżych B., Migula P., Młyńska H. 2008. Cellular stress reactions in female and male spiders from areas variously polluted with heavy metals. *Ecotox. Environ. Safe.* 70: 127–137.
310. Wilczek G., Karcz J., Rost-Roszkowska M., Kędziorski A., Wilczek P., Skowronek M., Wiśniewska K., Kaszuba F., Surmiak K. 2019. Evaluation of selected biological properties of the hunting web spider (*Steatoda grossa*, Theridiidae) in the aspect of short- and long-term exposure to cadmium. *Sci. Total. Environ.* 656: 297–306.
311. Wilczek G., Mędrzak M., Augustyniak M., Wilczek P., Stalmach M., 2016. Genotoxic effects of starvation and dimethoate in haemocytes and midgut gland cells of wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae). *Environ. Pollut.* 213: 370–378.
312. Wilczek G., Migula P. 1996. Metal body burdens and detoxifying enzymes in spiders from industrially polluted areas. *Fresenius' J. Anal. Chem.* 354: 643–647.
313. Wilczek G., Rost-Roszkowska M., Wilczek P., Babczynska A., Szulinska E., Sonakowska L., Marek-Swedziol M. 2014. Apoptotic and necrotic changes in the midgut glands of the wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) in response to starvation and dimethoate exposure. *Ecotox. Environ. Safe.* 101: 157–167.
314. Wilczek G., Surmiak–Stalmach K., Morenc M., Niemiec–Cyganek A., Rost–Roszkowska M., Karcz J., Skowronek M. 2024. The effect of ingested copper on the structural and cytotoxic properties of *Steatoda grossa* (Theridiidae) spider silk. *Zoology.* 162: 126143.
315. Wolska K.I., Markowska K., Wypij M., Golińska P., Dahm H. 2017. Nanocząstki srebra, synteza i biologiczna aktywność. *Kosmos.* 314 (66): 125-138.
316. Wu C., Xu S., Wang W. 2021. Synthesis and applications of silver nanocomposites: a review, *Journal of Physics: Conference Series.* IOP Publishing. p. 012216.

317. Xiang D., Zheng Y., Duan W., Li X., Yin J., Shigdar S., O'Connor M. L., Marappan M., Zhao X., Miao Y., Xiang B., Zheng C. 2013. Inhibition of A/Human/Hubei/3/2005 (H3N2) influenza virus infection by silver nanoparticles in vitro and in vivo. *Int. J. Nanomedicine*. 8: 4103-4113.
318. Xiao-li S., Yu P., Hose G., Jian C., Feng-Xiang L. 2006. Spider webs as indicators of heavy metal pollution in air. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76: 271-277.
319. Xu D., Guo C., Holland G. 2015. Probing the impact of acidification on spider silk assembly kinetics. *Biomacromolecules*. 16(7): 2072-2079.
320. Xue Y., Zhang S., Huang Y., Zhang T., Liu X., Hu Y., Zhang Z., Tang M. 2012. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. *J. Appl. Toxicol.* 32(11): 890-899.
321. Yan X., He B., Liu L. 2018. Antibacterial mechanism of silver nanoparticles in *Pseudomonas aeruginosa*: proteomics approach. *J. Metallomics*. 10 (4): 557-564.
322. Yang X., Gondikas A.P., Marinakos S.M., Auffan M., Liu J., Hsu-Kim H., Meyer J.N., 2012. Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and Surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Sci. Technol.* 46. 1119-1127.
323. Yang X., Jiang C., Hsu-Kim H., Badireddy A.R., Dykstra M., Wiesner M., Hinton D.E., Meyer J.N. 2014. Silver nanoparticle behavior, uptake, and toxicity in *Caenorhabditis elegans*: effects of natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 48: 3486-3495.
324. Yang Y., Chen X., Shao Z., Zhou P., Porter D., Knight D., Vollrath F. 2005. Toughness of spider silk at high and low temperatures. *Adv. Mater.* 17(1): 84-88.
325. Yaqoob A.A., Ahmad H., Parveen T., Ahmad A., Oves M., Ismail I.M.I., Qari H.A., Umar K., Ibrahim M.N. 2020. Recent Advances in Metal Decorated Nanomaterials and Their Various Biological Applications. A Review. *Front. Chem.* 8: 341.
326. Yin N., Liu Q., Liu J., He B., Cui L., Li Z., Yun Z., Qu G., Liu S., Zhou Q., Jiang G. 2013. Silver nanoparticle exposure attenuates the viability of rat cerebellum granule cells through apoptosis coupled to oxidative stress. *Small*. 9 (9-10): 1831-1841.
327. Youssef A.M., Abdel-Aziz M.S. 2013. Preparation of polystyrene nanocomposites based on silver nanoparticles using marine bacterium for packaging. *Polym. Plast. Technol. Eng.* 52: 607-613.
328. Yuan L., Richardson C.J., Ho M., Willis C.W., Colman B.P., Wiesner M.R. 2018. Stress responses of aquatic plants to silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 52: 2558-2565.
329. Zande M., Vandebriel R. J., Doren E., Kramer E., Herrera Rivera Z., Serrano-Rojero C.S., Gremmer E. R., Mast J., Peters R. J., Hollman P. C., Hendriksen P. J., Marvin H. J., Peijnenburg A. A., Bouwmeester H. 2012. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano*. 6(8): 7427-7442.
330. Zax D., Armanios D., Horak S., Malowniak C., Yang Z. 2004. Variation of mechanical properties with amino acid content in the silk of *Nephila clavipes*. *Biomacromolecules*. 5(3): 732-738.
331. Zhao J., Wang X., Hoang S.A., Bolan N.S., Kirkham M.B., Liu J. 2021. Silver nanoparticles in aquatic sediments: occurrence, chemical transformations, toxicity, and analytical methods. *J. Hazard. Mater.* 418:126368.
332. Zhu X., Zhu L., Duan Z., Qi R., Li Y., Lang Y. 2008. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *J. Environ. Sci. Heal. A* 43(3): 278-284.

333. Zhu X., Zhu L., Yongsheng C., Tian S. 2009. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. *J. Nanopart. Res.* 11: 67–75.
334. Zhu Y., Ahlberg S., Choe Ch., Meinke M. 2015. Penetration of silver nanoparticles into porcine skin *ex vivo* using fluorescence lifetime imaging microscopy, Raman microscopy, and surface-enhanced Raman scattering microscopy. *Journal of Biomedical Optics.* 20(5): 051006.
335. Zieminska E., Stafiej A., Struzynska L. 2014. The role of the glutamatergic NMDA receptor in nanosilver-evoked neurotoxicity in primary cultures of cerebellar granule cells. *Toxicology.* 315: 38-48.
336. Zook J., Halter M., Cleveland D., Long S. 2012. Disentangling the effects of polymer coatings on silver nanoparticle agglomeration, dissolution, and toxicity to determine mechanisms of nanotoxicity. *J. Nanopart. Res.* 14: 1165.

8. ANEKS – STATYSTYKI OPISOWE

Tab. A.1. Stężenie metali [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ suchej masy] w ciele much *D. hydei* z grup: kontrolnej oraz eksponowanych na srebro w wybranych formach. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

Grupa	Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola	0,207	0,178	0,178	0,233	0,188	0,208	0,225
AgNO₃	2,021	0,406	1,485	2,336	1,707	2,132	2,336
PVP–AgNPs	0,955	0,041	0,896	0,987	0,930	0,969	0,980
AgNPs	1,380	0,244	1,021	1,563	1,237	1,469	1,524

Tab. A.2. Stężenie metali [$\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ suchej masy] w ciele samic *S. grossa* z grup: kontrolnej oraz eksponowanych na srebro w wybranych formach przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

Grupa	Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola	0,190	0,124	0,104	0,372	0,113	0,143	0,268
AgNO₃	1 m	7,481	0,982	6,579	8,852	6,806	7,247
	3 m	8,642	0,700	7,623	9,159	8,189	8,894
	12 m	12,374	0,961	10,987	13,081	11,731	12,714
PVP–AgNPs	1 m	3,990	1,207	2,896	5,552	3,047	3,756
	3 m	5,275	1,219	4,313	7,012	4,438	4,887
	12 m	8,628	1,503	6,524	10,006	7,604	8,991
AgNPs	1 m	4,717	1,124	3,195	5,863	3,943	4,905
	3 m	6,231	1,011	5,234	7,612	5,529	6,040
	12 m	10,070	0,690	9,254	10,902	9,564	10,061

Tab. A.3. Aktywność katalazy [$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ białka] w hemolimfie, komórkach gruczołu jelita środkowego oraz komórkach ampulkowatych gruczołów przednich samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

HEMOLIMFA								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		6,422	0,746	5,391	7,338	5,949	6,408	7,041
AgNO₃	1 m	24,905	2,237	20,999	27,577	24,263	25,133	26,324
	3 m	21,080	1,584	19,266	23,966	20,237	20,829	21,356
	12 m	12,732	2,751	10,324	17,577	10,992	11,618	14,263
PVP–AgNPs	1 m	14,269	1,074	12,388	15,345	13,977	14,352	15,201
	3 m	13,616	0,503	12,929	14,273	13,238	13,617	14,020
	12 m	10,107	0,697	9,345	11,128	9,388	10,102	10,576
AgNPs	1 m	14,560	0,816	13,128	15,355	14,388	14,571	15,345
	3 m	13,250	1,088	11,996	14,786	12,255	13,126	14,212
	12 m	9,408	0,717	8,388	10,345	8,992	9,352	10,021
GRUCZOŁ JELITA ŚRODKOWEGO								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		10,386	1,454	8,391	11,775	9,364	10,690	11,408
AgNO₃	1 m	34,791	2,873	30,999	37,577	32,631	35,294	36,950
	3 m	32,171	1,020	30,999	33,476	31,489	32,106	32,854
	12 m	24,791	2,873	20,999	27,577	22,631	25,294	26,950
PVP–AgNPs	1 m	16,609	1,743	14,388	18,345	15,258	16,852	17,960
	3 m	16,340	1,169	15,237	17,990	15,611	16,067	17,069
	12 m	14,859	0,709	14,128	15,576	14,258	14,866	15,460
AgNPs	1 m	17,359	0,919	16,128	18,345	16,758	17,482	17,960
	3 m	17,063	0,848	15,971	17,985	16,447	17,148	17,680
	12 m	16,109	0,795	15,388	17,128	15,482	15,960	16,736
AMPULKOWATE GRUCZOŁY PRZĘDNE								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		1,886	0,403	1,391	2,338	1,583	1,908	2,190
AgNO₃	1 m	8,291	1,976	6,324	10,999	6,950	7,920	9,631
	3 m	5,817	0,428	5,237	6,235	5,511	5,898	6,123
	12 m	4,041	0,533	3,324	4,577	3,662	4,131	4,420
PVP–AgNPs	1 m	4,359	0,726	3,388	5,128	3,866	4,460	4,852
	3 m	3,700	0,465	3,012	4,012	3,419	3,888	3,982
	12 m	2,859	0,614	2,128	3,388	2,352	2,960	3,366
AgNPs	1 m	4,359	0,919	3,128	5,345	3,758	4,482	4,960
	3 m	3,604	0,456	2,979	4,048	3,288	3,695	3,921
	12 m	2,859	0,482	2,345	3,388	2,460	2,852	3,258

Tab. A.4. Poziom TAC [μM troloksu $\cdot\text{mg}^{-1}$ białka] w hemolimfie, komórkach gruczołu jelita środkowego oraz komórkach ampułkowatych gruczołów przednich samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

HEMOLIMFA								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,219	0,069	0,135	0,281	0,163	0,229	0,275
AgNO₃	1 m	0,497	0,078	0,406	0,593	0,441	0,495	0,554
	3 m	0,382	0,089	0,296	0,487	0,308	0,372	0,456
	12 m	0,261	0,044	0,207	0,309	0,227	0,265	0,296
PVP–AgNPs	1 m	0,391	0,090	0,317	0,505	0,319	0,370	0,462
	3 m	0,327	0,044	0,276	0,381	0,295	0,326	0,360
	12 m	0,243	0,054	0,172	0,305	0,208	0,248	0,278
AgNPs	1 m	0,391	0,117	0,325	0,566	0,327	0,337	0,455
	3 m	0,336	0,042	0,296	0,393	0,304	0,328	0,368
	12 m	0,247	0,057	0,173	0,310	0,208	0,253	0,287
GRUCZOŁ JELITA ŚRODKOWEGO								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,204	0,033	0,171	0,239	0,176	0,203	0,233
AgNO₃	1 m	0,576	0,062	0,498	0,643	0,529	0,582	0,623
	3 m	0,443	0,070	0,368	0,512	0,384	0,446	0,502
	12 m	0,322	0,070	0,248	0,398	0,264	0,321	0,380
PVP–AgNPs	1 m	0,482	0,102	0,395	0,626	0,410	0,454	0,554
	3 m	0,357	0,047	0,303	0,409	0,319	0,358	0,395
	12 m	0,298	0,054	0,251	0,372	0,258	0,284	0,338
AgNPs	1 m	0,465	0,095	0,371	0,595	0,399	0,446	0,531
	3 m	0,336	0,042	0,296	0,393	0,304	0,328	0,368
	12 m	0,303	0,049	0,264	0,372	0,268	0,288	0,338
AMPUŁKOWATE GRUCZOŁY PRZĘDNE								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,219	0,069	0,135	0,281	0,163	0,229	0,275
AgNO₃	1 m	0,260	0,083	0,180	0,362	0,194	0,250	0,327
	3 m	0,273	0,092	0,197	0,395	0,201	0,250	0,345
	12 m	0,265	0,054	0,197	0,318	0,223	0,273	0,307
PVP–AgNPs	1 m	0,231	0,094	0,141	0,362	0,168	0,210	0,294
	3 m	0,258	0,075	0,176	0,346	0,199	0,255	0,318
	12 m	0,246	0,053	0,195	0,297	0,201	0,246	0,291
AgNPs	1 m	0,233	0,107	0,141	0,376	0,151	0,207	0,314
	3 m	0,252	0,052	0,197	0,317	0,212	0,247	0,292
	12 m	0,242	0,054	0,166	0,290	0,205	0,255	0,278

Tab. A.5. Poziom komórek wczesnoapoptycznych [% komórek] w hemolimfie, gruczole jelita środkowego oraz ampułkowatych gruczolach przednich samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

HEMOLIMFA								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		1,120	0,177	0,860	1,260	1,020	1,180	1,220
AgNO ₃	1 m	5,780	0,340	5,440	6,120	5,440	5,780	6,120
	3 m	5,050	0,446	4,540	5,370	4,540	5,240	5,370
	12 m	1,327	0,136	1,200	1,470	1,200	1,310	1,470
PVP–AgNPs	1 m	5,490	0,308	5,230	5,830	5,230	5,410	5,830
	3 m	4,920	0,411	4,450	5,210	4,450	5,100	5,210
	12 m	1,263	0,086	1,170	1,340	1,170	1,280	1,340
AgNPs	1 m	5,470	0,390	5,020	5,710	5,020	5,680	5,710
	3 m	4,917	0,205	4,710	5,120	4,710	4,920	5,120
	12 m	1,257	0,095	1,160	1,350	1,160	1,260	1,350
GRUCZOŁ JELITA ŚRODKOWEGO								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		1,880	0,072	1,800	1,940	1,800	1,900	1,940
AgNO ₃	1 m	7,020	0,584	6,510	7,840	6,615	6,865	7,425
	3 m	5,478	0,548	4,930	6,180	5,055	5,400	5,900
	12 m	4,440	0,512	4,110	5,030	4,110	4,180	5,030
PVP–AgNPs	1 m	5,760	0,316	5,460	6,090	5,460	5,730	6,090
	3 m	4,883	0,396	4,440	5,200	4,440	5,010	5,200
	12 m	4,543	1,072	3,870	5,780	3,870	3,980	5,780
AgNPs	1 m	5,813	0,206	5,580	5,970	5,580	5,890	5,970
	3 m	4,940	0,380	4,550	5,310	4,550	4,960	5,310
	12 m	4,600	0,556	3,970	5,020	3,970	4,810	5,020
AMPUŁKOWATE GRUCZOŁY PRZĘDNE								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		1,350	0,289	1,180	1,780	1,180	1,220	1,520
AgNO ₃	1 m	2,983	0,418	2,540	3,370	2,540	3,040	3,370
	3 m	1,663	0,329	1,310	2,020	1,390	1,660	1,935
	12 m	1,593	0,290	1,310	1,890	1,310	1,580	1,890
PVP–AgNPs	1 m	2,617	0,239	2,450	2,890	2,450	2,510	2,890
	3 m	1,490	0,175	1,320	1,670	1,320	1,480	1,670
	12 m	1,267	0,087	1,170	1,340	1,170	1,290	1,340
AgNPs	1 m	2,357	0,310	2,130	2,710	2,130	2,230	2,710
	3 m	1,553	0,247	1,290	1,780	1,290	1,590	1,780
	12 m	1,340	0,261	1,090	1,610	1,090	1,320	1,610

Tab. A.6. Poziom komórek późnoapoptycznych [% komórek] w hemolimfie, gruczole jelita środkowego oraz ampułkowatych gruczolach przednich samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

HEMOLIMFA								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,108	0,059	0,050	0,190	0,070	0,095	0,145
AgNO₃	1 m	1,630	0,189	1,360	1,790	1,505	1,685	1,755
	3 m	1,250	0,135	1,110	1,380	1,110	1,260	1,380
	12 m	0,760	0,154	0,590	0,890	0,590	0,800	0,890
PVP–AgNPs	1 m	0,767	0,097	0,660	0,850	0,660	0,790	0,850
	3 m	0,597	0,097	0,490	0,680	0,490	0,620	0,680
	12 m	0,567	0,110	0,480	0,690	0,480	0,530	0,690
AgNPs	1 m	0,700	0,101	0,590	0,820	0,620	0,695	0,780
	3 m	0,527	0,126	0,410	0,660	0,410	0,510	0,660
	12 m	0,627	0,047	0,590	0,680	0,590	0,610	0,680
GRUCZOŁ JELITA ŚRODKOWEGO								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,555	0,223	0,330	0,780	0,365	0,555	0,745
AgNO₃	1 m	3,755	0,205	3,540	4,010	3,595	3,735	3,915
	3 m	3,373	0,421	2,940	3,780	2,940	3,400	3,780
	12 m	0,770	0,229	0,510	0,940	0,510	0,860	0,940
PVP–AgNPs	1 m	2,498	0,392	2,090	3,010	2,210	2,445	2,785
	3 m	1,857	0,726	1,030	2,390	1,030	2,150	2,390
	12 m	0,753	0,138	0,650	0,910	0,650	0,700	0,910
AgNPs	1 m	2,473	0,350	2,020	2,870	2,240	2,500	2,705
	3 m	1,923	0,237	1,670	2,140	1,670	1,960	2,140
	12 m	0,688	0,135	0,510	0,830	0,590	0,705	0,785
AMPUŁKOWATE GRUCZOŁY PRZĘDNE								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,648	0,199	0,390	0,810	0,490	0,695	0,805
AgNO₃	1 m	1,575	0,366	1,080	1,910	1,305	1,655	1,845
	3 m	1,697	0,163	1,520	1,840	1,520	1,730	1,840
	12 m	0,878	0,296	0,590	1,230	0,635	0,845	1,120
PVP–AgNPs	1 m	0,660	0,085	0,560	0,740	0,590	0,670	0,730
	3 m	0,747	0,076	0,680	0,830	0,680	0,730	0,830
	12 m	0,698	0,121	0,560	0,820	0,590	0,710	0,810
AgNPs	1 m	0,640	0,102	0,490	0,710	0,575	0,680	0,705
	3 m	0,735	0,087	0,630	0,820	0,665	0,745	0,805
	12 m	0,702	0,106	0,590	0,820	0,600	0,710	0,790

Tab. A.7. Poziom komórek nekrotycznych [% komórek] w hemolimfie, gruczole jelita środkowego oraz ampułkowatych gruczolach przednich samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

HEMOLIMFA								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,233	0,107	0,090	0,320	0,150	0,260	0,315
AgNO₃	1 m	0,263	0,076	0,180	0,330	0,180	0,280	0,330
	3 m	0,395	0,131	0,220	0,500	0,295	0,430	0,495
	12 m	1,213	0,387	0,970	1,660	0,970	1,010	1,660
PVP–AgNPs	1 m	0,353	0,071	0,290	0,430	0,290	0,340	0,430
	3 m	0,348	0,078	0,240	0,410	0,290	0,370	0,405
	12 m	0,268	0,056	0,190	0,320	0,230	0,280	0,305
AgNPs	1 m	0,357	0,100	0,280	0,470	0,280	0,320	0,470
	3 m	0,348	0,057	0,280	0,400	0,300	0,355	0,395
	12 m	0,293	0,062	0,210	0,360	0,250	0,300	0,335
GRUCZOŁ JELITA ŚRODKOWEGO								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,513	0,133	0,330	0,630	0,415	0,545	0,610
AgNO₃	1 m	2,440	0,213	2,250	2,670	2,250	2,400	2,670
	3 m	2,187	0,532	1,590	2,610	1,590	2,360	2,610
	12 m	1,173	0,297	0,900	1,490	0,900	1,130	1,490
PVP–AgNPs	1 m	1,570	0,207	1,340	1,740	1,340	1,630	1,740
	3 m	1,497	0,341	1,140	1,820	1,140	1,530	1,820
	12 m	0,505	0,103	0,380	0,630	0,435	0,505	0,575
AgNPs	1 m	1,510	0,204	1,280	1,670	1,280	1,580	1,670
	3 m	1,417	0,229	1,260	1,680	1,260	1,310	1,680
	12 m	0,510	0,107	0,390	0,650	0,440	0,500	0,580
AMPUŁKOWATE GRUCZOŁY PRZĘDNE								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,530	0,151	0,390	0,690	0,390	0,510	0,690
AgNO₃	1 m	0,547	0,125	0,420	0,670	0,420	0,550	0,670
	3 m	0,623	0,091	0,540	0,720	0,540	0,610	0,720
	12 m	0,520	0,167	0,370	0,700	0,370	0,490	0,700
PVP–AgNPs	1 m	0,580	0,161	0,400	0,710	0,400	0,630	0,710
	3 m	0,523	0,127	0,410	0,660	0,410	0,500	0,660
	12 m	0,443	0,170	0,310	0,690	0,335	0,385	0,550
AgNPs	1 m	0,583	0,271	0,280	0,800	0,280	0,670	0,800
	3 m	0,575	0,211	0,290	0,800	0,440	0,605	0,710
	12 m	0,520	0,187	0,350	0,720	0,350	0,490	0,720

Tab. A.8. Poziom potencjału mitochondrialnego [%] w komórkach hemolimfy, gruczołu jelita środkowego oraz ampułkowatych gruczołów przednich samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

HEMOLIMFA								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		12,262	0,216	11,960	12,550	12,220	12,220	12,360
AgNO₃	1 m	11,150	0,227	10,990	11,410	10,990	11,050	11,410
	3 m	10,350	0,239	10,090	10,560	10,090	10,400	10,560
	12 m	9,343	0,761	8,520	10,020	8,520	9,490	10,020
PVP–AgNPs	1 m	12,235	0,244	11,920	12,500	12,060	12,260	12,410
	3 m	12,143	0,294	11,940	12,480	11,940	12,010	12,480
	12 m	11,760	0,467	11,410	12,290	11,410	11,580	12,290
AgNPs	1 m	12,207	0,095	12,110	12,300	12,110	12,210	12,300
	3 m	12,297	0,343	11,920	12,590	11,920	12,380	12,590
	12 m	12,183	0,199	12,010	12,400	12,010	12,140	12,400
GRUCZOŁ JELTA ŚRODKOWEGO								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		15,010	1,109	13,610	15,910	14,120	15,260	15,900
AgNO₃	1 m	12,433	2,126	10,050	14,290	10,640	12,695	14,225
	3 m	10,448	1,272	9,040	12,100	9,565	10,325	11,330
	12 m	10,675	1,167	9,100	11,700	9,800	10,950	11,550
PVP–AgNPs	1 m	13,308	1,295	11,610	14,800	12,430	13,500	14,200
	3 m	13,477	1,299	12,010	14,480	12,010	13,940	14,480
	12 m	13,923	0,820	12,980	14,470	12,980	14,320	14,470
AgNPs	1 m	13,378	1,257	11,730	14,680	12,600	13,360	14,520
	3 m	13,630	0,930	12,590	14,380	12,590	13,920	14,380
	12 m	14,257	0,440	13,810	14,690	13,810	14,270	14,690
AMPUŁKOWATE GRUCZOŁY PRZEDNE								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		10,438	1,192	8,990	12,100	9,890	10,120	11,090
AgNO₃	1 m	9,860	1,111	8,360	11,030	9,150	10,010	10,750
	3 m	9,480	1,048	8,230	10,560	8,635	9,565	10,325
	12 m	8,284	1,376	6,920	9,840	7,020	8,070	9,570
PVP–AgNPs	1 m	9,768	1,709	8,140	12,070	8,515	9,430	11,020
	3 m	10,010	0,992	8,940	11,010	9,175	10,045	10,845
	12 m	9,037	0,935	8,100	9,970	8,100	9,040	9,970
AgNPs	1 m	10,165	1,054	9,020	11,560	9,455	10,040	10,875
	3 m	10,063	1,022	8,920	10,890	8,920	10,380	10,890
	12 m	9,975	1,634	8,020	12,010	8,900	9,935	11,050

Tab. A.9. Poziom intensywności autofagii [% komórek] w hemolimfie, gruczole jelita środkowego oraz ampułkowatych gruczolach przednich samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

HEMOLIMFA								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		12,667	1,234	11,300	13,700	11,300	13,000	13,700
AgNO₃	1 m	21,567	1,960	19,500	23,400	19,500	21,800	23,400
	3 m	14,700	2,750	12,300	17,700	12,300	14,100	17,700
	12 m	15,333	3,001	12,700	18,600	12,700	14,700	18,600
PVP–AgNPs	1 m	20,433	0,814	19,500	21,000	19,500	20,800	21,000
	3 m	13,767	1,457	12,400	15,300	12,400	13,600	15,300
	12 m	14,200	2,352	12,600	16,900	12,600	13,100	16,900
AgNPs	1 m	19,500	0,872	18,900	20,500	18,900	19,100	20,500
	3 m	13,600	0,889	12,900	14,600	12,900	13,300	14,600
	12 m	13,967	1,960	11,900	15,800	11,900	14,200	15,800
GRUCZOŁ JELITA ŚRODKOWEGO								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		14,633	0,666	13,900	15,200	13,900	14,800	15,200
AgNO₃	1 m	23,800	3,219	20,800	27,200	20,800	23,400	27,200
	3 m	23,433	1,877	21,400	25,100	21,400	23,800	25,100
	12 m	16,500	0,794	15,600	17,100	15,600	16,800	17,100
PVP–AgNPs	1 m	23,033	3,711	19,500	26,900	19,500	22,700	26,900
	3 m	21,833	2,658	19,300	24,600	19,300	21,600	24,600
	12 m	15,933	1,124	14,700	16,900	14,700	16,200	16,900
AgNPs	1 m	21,167	3,754	18,900	25,500	18,900	19,100	25,500
	3 m	21,333	1,888	19,700	23,400	19,700	20,900	23,400
	12 m	16,200	1,539	14,900	17,900	14,900	15,800	17,900
AMPUŁKOWATE GRUCZOŁY PRZĘDNE								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		14,400	1,900	12,300	16,000	12,300	14,900	16,000
AgNO₃	1 m	25,533	2,974	22,100	27,300	22,100	27,200	27,300
	3 m	19,900	2,722	17,000	22,400	17,000	20,300	22,400
	12 m	15,867	1,750	14,100	17,600	14,100	15,900	17,600
PVP–AgNPs	1 m	24,200	3,245	20,600	26,900	20,600	25,100	26,900
	3 m	19,767	2,219	17,300	21,600	17,300	20,400	21,600
	12 m	16,933	1,457	15,300	18,100	15,300	17,400	18,100
AgNPs	1 m	22,600	2,805	19,900	25,500	19,900	22,400	25,500
	3 m	19,733	1,250	18,500	21,000	18,500	19,700	21,000
	12 m	18,600	2,862	15,300	20,400	15,300	20,100	20,400

Tab. A.10. Poziom populacji komórek z ROS (ROS+) [% komórek] w hemolimfie, gruczole jelita środkowego oraz ampułkowatych gruczolach przednich samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

HEMOLIMFA								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,513	0,270	0,200	0,870	0,270	0,520	0,700
AgNO ₃	1 m	11,906	1,977	9,750	15,050	10,930	11,630	12,170
	3 m	4,067	0,764	3,400	4,900	3,400	3,900	4,900
	12 m	2,800	1,352	1,630	5,010	2,030	2,200	3,130
PVP– AgNPs	1 m	6,580	1,718	4,360	8,200	5,245	6,880	7,915
	3 m	4,118	1,065	2,730	5,030	3,285	4,355	4,950
	12 m	1,557	0,494	1,160	2,110	1,160	1,400	2,110
AgNPs	1 m	6,897	2,515	4,930	9,730	4,930	6,030	9,730
	3 m	3,783	1,098	2,770	4,950	2,770	3,630	4,950
	12 m	1,740	0,335	1,400	2,130	1,465	1,715	2,015
GRUCZOŁ JELITA ŚRODKOWEGO								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		1,808	0,735	0,850	2,590	1,275	1,895	2,340
AgNO ₃	1 m	16,298	3,524	12,660	19,680	13,290	16,425	19,305
	3 m	11,683	1,968	9,660	14,020	10,090	11,525	13,275
	12 m	9,883	1,614	8,210	11,430	8,210	10,010	11,430
PVP– AgNPs	1 m	13,117	1,513	11,800	14,770	11,800	12,780	14,770
	3 m	10,995	1,161	9,760	12,020	10,005	11,100	11,985
	12 m	8,663	0,727	7,910	9,360	7,910	8,720	9,360
AgNPs	1 m	12,950	2,043	10,970	15,050	10,970	12,830	15,050
	3 m	10,910	1,211	9,640	12,330	9,930	10,835	11,890
	12 m	8,397	0,949	7,530	9,410	7,530	8,250	9,410
AMPUŁKOWATE GRUCZOŁY PRZĘDNE								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,405	0,208	0,150	0,700	0,250	0,385	0,560
AgNO ₃	1 m	5,617	0,989	4,930	6,750	4,930	5,170	6,750
	3 m	1,953	0,293	1,630	2,200	1,630	2,030	2,200
	12 m	0,620	0,159	0,440	0,740	0,440	0,680	0,740
PVP– AgNPs	1 m	3,973	1,024	3,100	5,100	3,100	3,720	5,100
	3 m	1,887	0,483	1,330	2,200	1,330	2,130	2,200
	12 m	0,543	0,121	0,430	0,670	0,430	0,530	0,670
AgNPs	1 m	4,293	0,667	3,730	5,030	3,730	4,120	5,030
	3 m	1,743	0,456	1,240	2,130	1,240	1,860	2,130
	12 m	0,527	0,130	0,400	0,660	0,400	0,520	0,660

Tab. A.11. Poziom stężenia ATP [nmol ATP · mg⁻¹ białka] w komórkach hemolimfy, gruczołu jelita środkowego oraz ampułkowatych gruczołach przednich samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

HEMOLIMFA								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,347	0,104	0,232	0,472	0,266	0,342	0,428
AgNO₃	1 m	1,245	0,244	0,995	1,481	0,995	1,259	1,481
	3 m	1,299	0,200	1,069	1,427	1,069	1,402	1,427
	12 m	1,069	0,225	0,812	1,230	0,812	1,164	1,230
PVP–AgNPs	1 m	0,553	0,150	0,398	0,697	0,398	0,563	0,697
	3 m	1,182	0,311	0,876	1,498	0,876	1,171	1,498
	12 m	0,626	0,337	0,403	1,014	0,403	0,462	1,014
AgNPs	1 m	0,326	0,098	0,192	0,402	0,253	0,354	0,398
	3 m	0,366	0,200	0,173	0,646	0,244	0,323	0,488
	12 m	0,558	0,256	0,294	0,904	0,315	0,632	0,644
GRUCZOŁ JELITA ŚRODKOWEGO								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		40,323	27,695	11,568	66,750	16,697	41,486	63,948
AgNO₃	1 m	9,959	4,827	6,425	15,458	6,425	7,993	15,458
	3 m	10,321	3,995	6,572	15,280	7,114	9,715	13,528
	12 m	14,282	7,689	6,572	24,927	9,501	12,815	19,064
PVP–AgNPs	1 m	6,969	3,589	4,313	11,053	4,313	5,541	11,053
	3 m	7,636	3,984	4,313	12,053	4,313	6,541	12,053
	12 m	11,731	16,285	0,271	35,873	2,465	5,389	20,996
AgNPs	1 m	9,021	4,929	5,369	14,628	5,369	7,066	14,628
	3 m	12,202	3,939	9,548	17,998	9,742	10,631	14,663
	12 m	11,385	9,057	2,033	21,605	3,899	10,952	18,871
AMPUŁKOWATE GRUCZOŁY PRZĘDNE								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		14,465	8,778	5,470	24,070	7,127	14,159	21,802
AgNO₃	1 m	13,977	7,038	7,232	21,276	7,232	13,424	21,276
	3 m	12,196	5,363	6,308	18,789	8,082	11,844	16,311
	12 m	12,400	6,796	4,713	21,243	7,997	11,821	16,802
PVP–AgNPs	1 m	7,496	4,106	2,964	10,968	2,964	8,555	10,968
	3 m	13,128	7,539	5,009	23,152	8,057	12,175	18,199
	12 m	7,840	4,467	3,050	12,788	4,159	7,761	11,521
AgNPs	1 m	10,249	7,852	1,782	17,293	1,782	11,671	17,293
	3 m	12,676	9,351	2,053	22,909	5,098	12,871	20,254
	12 m	6,743	2,075	4,500	9,301	5,140	6,585	8,346

Tab. A.12. Stosunek ADP/ATP w komórkach hemolimfy, gruczołu jelita środkowego oraz ampułkowatych gruczołów przednich samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

HEMOLIMFA								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,219	0,148	0,027	0,375	0,110	0,236	0,327
AgNO₃	1 m	0,269	0,167	0,070	0,477	0,161	0,264	0,377
	3 m	1,821	0,229	1,579	2,033	1,579	1,852	2,033
	12 m	1,258	1,076	0,210	2,750	0,545	1,037	1,972
PVP–AgNPs	1 m	1,229	0,668	0,756	1,993	0,756	0,937	1,993
	3 m	0,354	0,157	0,206	0,512	0,220	0,349	0,488
	12 m	0,273	0,246	0,119	0,636	0,123	0,168	0,423
AgNPs	1 m	1,564	0,428	1,132	1,987	1,132	1,574	1,987
	3 m	0,174	0,122	0,088	0,352	0,096	0,127	0,251
	12 m	0,123	0,088	0,049	0,251	0,069	0,096	0,177
GRUCZOŁ JELITA ŚRODKOWEGO								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,036	0,025	0,016	0,073	0,019	0,028	0,053
AgNO₃	1 m	0,223	0,058	0,158	0,272	0,158	0,239	0,272
	3 m	0,409	0,246	0,222	0,769	0,259	0,323	0,559
	12 m	0,378	0,150	0,240	0,562	0,256	0,355	0,500
PVP–AgNPs	1 m	0,498	0,185	0,360	0,708	0,360	0,427	0,708
	3 m	0,276	0,190	0,136	0,556	0,166	0,205	0,386
	12 m	0,312	0,108	0,191	0,427	0,224	0,315	0,400
AgNPs	1 m	0,230	0,125	0,099	0,395	0,142	0,214	0,319
	3 m	0,403	0,198	0,223	0,661	0,249	0,364	0,558
	12 m	0,391	0,188	0,254	0,661	0,264	0,325	0,518
AMPUŁKOWATE GRUCZOŁY PRZĘDNE								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,059	0,052	0,016	0,121	0,016	0,049	0,102
AgNO₃	1 m	0,145	0,156	0,025	0,322	0,025	0,089	0,322
	3 m	0,078	0,044	0,023	0,129	0,048	0,080	0,108
	12 m	0,156	0,121	0,008	0,266	0,058	0,175	0,254
PVP–AgNPs	1 m	0,166	0,109	0,073	0,287	0,073	0,139	0,287
	3 m	0,140	0,079	0,065	0,251	0,092	0,122	0,188
	12 m	0,175	0,215	0,042	0,493	0,044	0,082	0,306
AgNPs	1 m	0,145	0,079	0,060	0,249	0,090	0,135	0,199
	3 m	0,149	0,147	0,043	0,367	0,065	0,094	0,234
	12 m	0,177	0,145	0,043	0,367	0,065	0,148	0,288

Tab. A.13. Poziom białek metalotioneinopodobnych [% białka całkowitego] w komórkach hemolimfy, gruczołu jelita środkowego oraz ampułkowatych gruczołów przednich samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

HEMOLIMFA								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,460	0,205	0,236	0,716	0,304	0,443	0,615
AgNO₃	1 m	4,744	1,426	3,439	6,266	3,439	4,527	6,266
	3 m	7,278	2,047	5,008	8,983	5,008	7,842	8,983
	12 m	7,892	1,629	6,023	9,008	6,023	8,646	9,008
PVP–AgNPs	1 m	4,222	1,113	3,139	5,362	3,139	4,164	5,362
	3 m	5,369	1,675	4,357	7,302	4,357	4,448	7,302
	12 m	6,404	1,348	5,110	7,800	5,110	6,302	7,800
AgNPs	1 m	4,094	0,626	3,427	4,670	3,427	4,185	4,670
	3 m	5,318	1,575	3,969	7,048	3,969	4,936	7,048
	12 m	6,155	1,358	4,628	7,227	4,628	6,610	7,227
GRUCZOŁ JELITA ŚRODKOWEGO								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,761	0,183	0,613	0,965	0,613	0,703	0,965
AgNO₃	1 m	4,206	1,799	2,848	6,750	2,937	3,612	5,475
	3 m	8,175	1,189	6,804	8,926	6,804	8,795	8,926
	12 m	8,519	0,912	7,486	9,215	7,486	8,855	9,215
PVP–AgNPs	1 m	2,761	0,816	2,062	3,658	2,062	2,562	3,658
	3 m	5,170	0,931	4,110	5,851	4,110	5,550	5,851
	12 m	5,650	0,626	5,080	6,320	5,080	5,550	6,320
AgNPs	1 m	2,804	0,272	2,618	3,116	2,618	2,677	3,116
	3 m	5,174	0,728	4,336	5,642	4,336	5,545	5,642
	12 m	6,263	1,006	5,110	6,960	5,110	6,720	6,960
AMPUŁKOWATE GRUCZOŁY PRZĘDNE								
Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		0,758	0,660	0,130	1,689	0,360	0,607	1,156
AgNO₃	1 m	1,459	0,529	0,848	1,768	0,848	1,761	1,768
	3 m	1,388	0,354	0,981	1,627	0,981	1,557	1,627
	12 m	1,317	0,456	0,876	1,786	0,876	1,290	1,786
PVP–AgNPs	1 m	1,411	0,643	0,690	1,926	0,690	1,617	1,926
	3 m	1,202	0,704	0,451	1,992	0,623	1,182	1,780
	12 m	1,611	0,747	0,813	2,595	1,086	1,518	2,136
AgNPs	1 m	2,147	0,973	1,034	2,839	1,034	2,568	2,839
	3 m	1,658	0,814	0,965	2,582	0,974	1,542	2,342
	12 m	1,697	0,958	0,700	2,610	0,700	1,780	2,610

Tab. A.14. Średnica włókien jedwabiu [μm] występujących w strukturach pojedynczych, dwuniciowych i wieloniciowych w sieciach łownych pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

ŚREDNICA WŁÓKNA W STRUKTURACH POJEDYNCZYCH								
Grupa		Średnia	\pmSD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		3,660	1,249	1,440	5,420	2,800	3,430	4,700
AgNO₃	1 m	1,783	0,455	1,140	2,310	1,440	1,775	2,190
	3 m	1,777	0,564	0,970	2,760	1,450	1,550	2,250
	12 m	1,763	0,326	1,450	2,100	1,450	1,740	2,100
PVP– AgNPs	1 m	1,532	0,295	1,050	1,810	1,310	1,670	1,800
	3 m	1,696	0,387	0,740	2,410	1,460	1,650	1,960
	12 m	1,446	0,270	0,940	2,040	1,330	1,475	1,500
AgNPs	1 m	1,466	0,386	1,140	2,440	1,260	1,380	1,490
	3 m	1,692	0,431	1,020	2,700	1,370	1,620	1,900
	12 m	1,134	0,358	0,780	1,950	0,925	1,105	1,140
ŚREDNICA WŁÓKNA W STRUKTURACH DWUNICIOWYCH								
Grupa		Średnia	\pmSD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		2,557	0,396	1,670	3,180	2,240	2,625	2,900
AgNO₃	1 m	1,187	0,424	0,640	1,950	0,865	1,170	1,410
	3 m	1,649	0,476	1,150	2,920	1,350	1,410	1,770
	12 m	1,348	0,190	1,040	1,660	1,220	1,340	1,480
PVP– AgNPs	1 m	2,066	0,167	1,690	2,240	2,020	2,130	2,160
	3 m	1,820	0,542	1,060	2,830	1,380	1,610	2,380
	12 m	2,090	0,338	1,580	2,610	1,800	2,055	2,425
AgNPs	1 m	1,625	0,251	1,270	1,950	1,380	1,575	1,905
	3 m	1,513	0,288	0,920	2,380	1,320	1,460	1,650
	12 m	1,192	0,327	0,630	1,740	0,940	1,185	1,470
ŚREDNICA WŁÓKNA W STRUKTURACH WIELONICIOWYCH								
Grupa		Średnia	\pmSD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		2,539	0,359	2,040	3,340	2,240	2,385	2,860
AgNO₃	1 m	1,259	0,326	0,640	1,890	1,030	1,180	1,440
	3 m	1,711	0,350	1,000	2,190	1,350	1,840	2,010
	12 m	1,197	0,406	0,420	2,300	0,900	1,190	1,400
PVP– AgNPs	1 m	1,734	0,234	1,490	2,110	1,640	1,650	1,780
	3 m	1,799	0,247	1,350	2,080	1,560	1,895	2,005
	12 m	1,183	0,281	0,700	1,970	0,980	1,100	1,360
AgNPs	1 m	1,546	0,458	0,860	2,790	1,100	1,495	1,860
	3 m	1,232	0,385	0,480	2,200	0,990	1,180	1,390
	12 m	1,040	0,325	0,430	1,600	0,740	1,065	1,310

Tab. A.15. Wartości kaloryczne sieci łownych w przeliczeniu na $J \cdot g^{-1}$ suchej masy jedwabiu samic pająka *S. grossa* z grupy kontrolnej oraz grup eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		21,952	1,825	19,376	24,012	19,560	22,232	23,451
AgNO₃	1 m	22,531	4,405	17,081	28,226	19,333	23,345	24,671
	3 m	18,365	4,645	12,463	25,035	16,514	17,684	20,127
	12 m	21,517	4,873	13,018	27,015	17,523	23,937	24,778
PVP– AgNPs	1 m	16,595	5,908	8,558	23,115	13,704	16,114	21,485
	3 m	23,069	10,680	16,708	42,032	18,106	18,163	20,339
	12 m	14,764	6,211	3,760	18,824	16,729	16,764	17,745
AgNPs	1 m	16,655	6,256	7,978	22,846	14,040	15,809	22,601
	3 m	21,683	8,618	15,076	36,732	18,106	18,163	20,339
	12 m	14,045	5,936	3,536	17,978	15,896	15,945	16,870

Tab. A.16. Wartości kaloryczne sieci łownych samic pająka *S. grossa* w przeliczeniu na osobnika [J/osobnika] z grupy kontrolnej oraz grup eksponowanych na wybrane formy srebra przez 1, 3 i 12 miesięcy. Wartości średniej, odchylenia standardowego (\pm SD), Mediany (Me), Q25 (kwartył dolny), Q75 (kwartył górny), minimum (Min) i maksimum (Max).

Grupa		Średnia	\pm SD	Min	Max	Q25	Me	Q75
Kontrola		20,500	4,799	15,746	30,531	17,051	19,576	20,831
AgNO₃	1 m	12,027	3,033	8,339	15,339	10,661	10,796	15,000
	3 m	7,908	1,768	6,441	10,915	6,813	7,604	7,769
	12 m	11,895	4,1057	4,965	17,407	10,607	12,505	13,383
PVP– AgNPs	1 m	10,495	5,031	3,783	15,949	7,983	9,830	14,932
	3 m	8,958	1,366	7,604	10,898	7,986	8,500	9,803
	12 m	11,626	4,6025	4,587	15,339	9,474	13,424	15,305
AgNPs	1 m	9,944	5,282	2,985	15,372	7,477	8,812	15,075
	3 m	9,137	0,494	8,667	9,898	8,781	9,016	9,326
	12 m	11,354	4,8653	3,986	15,764	9,023	13,120	14,874