

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Živa PIPAN TKALEC (PIPAN)

**PRIVZEM, RAZPOREDITEV IN UČINKI NANODELCEV KOVIN IN
KOVINSKIH OKSIDOV NA PREHRANJEVANJE IN ZGRADBO
PREBAVILA KOPENSKEGA RAKA ENAKONOŽCA *Porcellio scaber*
(Isopoda; Crustacea)**

DOKTORSKA DISERTACIJA

**INTERNALIZATION, LOCATION AND EFFECT OF
NANOPARTICLES OF METALS AND METAL OXIDES ON
FEEDING AND STRUCTURE OF DIGESTIVE SYSTEM OF
TERRESTRIAL ISOPOD *Porcellio scaber* (Isopoda; Crustacea)**

DOCTORAL DISSERTATION

Ljubljana, 2013

Doktorska disertacija je zaključek podiplomskega študija bioloških in biotehniških znanosti na Biotehniški fakulteti, Univerze v Ljubljani. Doktorsko delo je bilo opravljeno na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Merjenja vsebnosti elementov v vzorcih (mikro-PIXE in TEM/EDX) so bila opravljena na Institutu Jožef Stefan.

Po sklepu Senata Biotehniške fakultete in sklepu Senata Univerze v Ljubljani je bila dne 12. 2. 2009 sprejeta tema doktorske disertacije. Potrjeno je bilo, da kandidatka izpolnjuje pogoje za neposreden prehod na doktorski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje doktorata znanosti s področja biologije. Za mentorico je bila imenovana prof. dr. Damjana Drobne, za somentorico pa prof. dr. Jasna Štrus.

Komisija za oceno in zagovor imenovana na seji senata dne 22. 4. 2013:

- Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- Članica: prof. dr. Maja REMŠKAR
Institut Jožef Stefan, Odsek za fiziko trdne snovi
- Članica: prof. dr. Polonca TREBŠE
Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta

Datum zagovora: 9. 10. 2013

Doktorsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Živa Pipan Tkalec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dd
DK UDK 591:595.373:546.3(043.3)=163.6
KG nanodelci/nano-TiO₂, nano-ZnO, nano-Ag, ZnCl₂/(ultra) struktura celic/prebavne žleze/Crustacea/Isopoda/*Porcellio scaber*
AV PIPAN TKALEC Živa, univ. dipl. biologinja
SA DROBNE Damjana (mentorica)/ŠTRUS Jasna (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Doktorski študij bioloških in biotehniških znanosti, znanstveno področje biologija
LI 2013
IN PRIVZEM, RAZPOREDITEV IN UČINKI NANODELCEV KOVIN IN KOVINSKIH OKSIDOV NA PREHRANJEVANJE IN ZGRADBO PREBAVILA KOPENSKEGA RAKA ENAKONOŽCA *Porcellio scaber* (Isopoda; Crustacea)
TD Doktorska disertacija
OP XIV, 100 str., 6 pregl., 37 sl., 131 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Po prehranjevalnih poskusih, v okviru katerih so živali *Porcellio scaber* jedle hrano z nanodelci (nano-TiO₂, nano-ZnO, nano-Ag) ali ZnCl₂, smo preučevali vplive nanodelcev na strukturne spremembe v celicah prebavnih žlez s pomočjo svetlobne in presevne elektronske mikroskopije. Z metodami protonsko vzbujenih rentgenskih žarkov, atomsko absorpcijsko spektroskopijo in energijsko disperzivno rentgensko spektroskopijo na presevnem elektronskem mikroskopu smo ugotavljali prisotnost različnih nanodelcev ali ionov v celicah prebavnih žlez in v organizmu. V celicah B in S prebavnih žlez živali, ki so se prehranjevale s hrano z nanodelci, smo ugotovili v primerjavi s kontrolnimi živalmi več vezikulacije endoplazemskega retikla, lamelarnih teles, dolgih in razvejanih mitohondrijev, bolj naguban jedrni ovoj, gostejšo citoplazmo ter več elektronsko gostih depozitov. Med nanodelci TiO₂, ZnO in Ag ni bilo razlik glede vplivov na ultrastrukturo celic. Razlike smo opazili le pri živalih, ki so se prehranjevale s hrano z ZnCl₂. Pri teh živalih se je zmanjšala intenzivnost prehranjevanja, spremembe v celicah prebavnih žlez pa so bile manj izrazite v primerjavi z živalmi, ki so se prehranjevale s hrano z nano-ZnO. Ugotovili smo prisotnost nanodelcev TiO₂ v sledih in sicer le v celicah s poškodovano membrano pri živalih, ki so se prehranjevale z najvišjo koncentracijo nano-TiO₂. Srebrovi ioni so bili prisotni v celicah S prebavnih žlez vseh živali, ki so se prehranjevale s hrano z nano-Ag. V primeru prehranjevanja s hrano z nano-ZnO ali ZnCl₂ smo ugotovili enako prisotnost celokupnega cinka v organizmu *P. scaber* ne glede na vir. Ugotovili smo, da učinki nanodelcev ne privedejo do strupenosti, na strukturo celic pa poleg ionov vplivajo tudi nanodelci. Ultrastrukturne značilnosti celic B in S prebavnih žlez živali, hranjenih z nanodelci ali ZnCl₂, kažejo na vpliv kovin in/ali nanodelcev na celični ravni.

KEY WORD DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 591:595.373:546.3(043.3)=163.6
- CX nanoparticles/nano-TiO₂, nano-ZnO, nano-Ag, ZnCl₂/(ultra)structure of cells/digestive glands/Crustacea/Isopoda/*Porcellio scaber*
- AU PIPAN TKALEC Živa
- AA DROBNE Damjana (supervisor)/ ŠTRUS Jasna (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University in Ljubljana; Biotechnical faculty, Postgraduate study programme of biological and biotechnical science, area Biology
- PY 2013
- TI INTERNALIZATION, LOCATION AND EFFECT OF NANOPARTICLES OF METALS AND METAL OXIDES ON FEEDING AND STRUCTURE OF DIGESTIVE SYSTEM OF TERRESTRIAL ISOPOD *Porcellio scaber* (Isopoda; Crustacea)
- DT Doctoral dissertation
- NO XIV, 100 p., 6 tab., 37 fig., 131 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB In our work, during which specimens *Porcellio scaber* were feeding with food with different nanoparticles (nano-TiO₂, nano-ZnO, nano-Ag) and ZnCl₂, we investigated changes in the structure of digestive glands with light and electron transmission microscopy. With particle induced X-ray emission, atomic absorption spectrometry and energy dispersive spectroscopy on electron transmission microscopy we investigated the presence of nanoparticles or ions in digestive glands and in organisms. In the digestive gland cells of animals that were feeding with food with nanoparticles we observed more ultrastructural alterations than in control animals: vesiculation of endoplasmic reticulum, lamellar bodies, alteration in microvilli, long and branched mitochondria, denser nucleus, irregular shaped nuclear envelope and more electron dense deposits. Nanoparticles TiO₂, ZnO and Ag did not differ in effects on ultrastructural alterations in digestive glands. We observed differences in the influence on ultrastructural alterations in digestive glands between nanoparticles and ZnCl₂. The alterations in the ultrastructure of digestive glands were less frequent in case of ZnCl₂. In addition to the effect of ions we also observed the influence of nanoparticles. In the digestive gland cells of some animals that were fed with food with the highest concentration of nano-TiO₂, we observed a small amount of TiO₂ nanoparticles. We observed silver ions in the small cells in all animals that were feeding with nano-Ag. In cases where animals were feeding with nano-ZnO and ZnCl₂, we noticed the same assimilation of zinc from different sources. On the basis of the results on feeding rate, mortality and weight, nanoparticles did not cause toxic effects. Both ions and nanoparticles had an effect on the cell structure. The ultrastructural alterations in B and S cells of digestive glands in animals fed with nano-Ag, nano-Zn, nano-TiO₂ or ZnCl₂ show effects of both nanoparticles and metals on cellular structure.

KAZALO VSEBINE

| | |
|---|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA..... | III |
| KEY WORD DOCUMENTATION..... | IV |
| KAZALO VSEBINE..... | V |
| KAZALO PREGLEDNIC..... | IX |
| KAZALO SLIK..... | X |
| KRATICE IN OKRAJŠAVE..... | XIV |
| | |
| 1 PREDSTAVITEV PROBLEMATIKE IN HIPOTEZE..... | 1 |
| 1.1 NANOTEHNOLOGIJA..... | 1 |
| 1.2 LASTNOSTI NANODELCEV..... | 1 |
| 1.3 VPLIV NANODELCEV NA ULTRASTRUKTURNE SPREMEMBE V CELICAH..... | 3 |
| 1.4 AKUMULACIJA NANODELCEV V ŽIVALSKIH ORGANIZMIH..... | 6 |
| 1.5 NANODELCI UPORABLJENI V NAŠIH ŠTUDIJAH..... | 11 |
| 1.5.1 Nanodelci titanovega dioksida (nano-TiO)..... | 11 |
| 1.5.2 Nanodelci cinkovega oksida (nano-ZnO)..... | 11 |
| 1.5.3 Nanodelci srebra (nano-Ag)..... | 11 |
| 1.6 OPIS POSKUSNE ŽIVALI – RAKA ENAKONOŽCA <i>Porcellio scaber</i> | 12 |
| 1.6.1 Zgradba in delovanje prebavil raka enakonožca <i>P. scaber</i>..... | 13 |
| 1.6.1.1 Zgradba in delovanje prebavnih žlez raka enakonožca <i>P. scaber</i> | 14 |
| 1.6.1.2 Spremembe v celicah prebavnih žlez raka enakonožca <i>P. scaber</i> | 15 |
| 1.6.1.3 Kopičenje kovin v celicah prebavnih žlez raka enakonožca <i>P. scaber</i> | 16 |
| 1.6.1.4 Vpliv nano-TiO ₂ , nano ZnO in nano-Ag na raka enakonožca <i>P. scaber</i> | 17 |
| 1.7 NAMEN IN HIPOTEZE DOKTORSKE NALOGE..... | 18 |
| 2 METODE IN MATERIALI..... | 19 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 2.1 | SEZNAM KEMIČALIJ..... | 19 |
| 2.2 | KARAKTERIZACIJA NANODELCEV, UPORABLJENIH V NAŠIH POSKUSIH..... | 19 |
| 2.3 | <i>IN VIVO</i> POSKUSI Z MODELNIM ORGANIZMOM <i>P. scaber</i> | 20 |
| 2.3.1 | Poskusne živali..... | 20 |
| 2.3.2 | Priprava hrane in poskusov <i>in vivo</i>..... | 21 |
| 2.3.3 | Potek poskusov <i>in vivo</i>..... | 21 |
| 2.4 | OPAZOVANJE PREHRANJEVANJA, SPREMEMBE MASE IN PREŽIVETJA..... | 22 |
| 2.5 | PRIPRAVA PREBAVNIH ŽLEZ ZA MIKROSKOPSKO ANALIZO..... | 22 |
| 2.5.1 | Priprava prebavnih žlez za presevno elektronsko mikroskopijo..... | 23 |
| 2.5.2 | Priprava prebavnih žlez za svetlobno mikroskopijo..... | 24 |
| 2.6 | VREDNOTENJE DEBELINE EPITELIJA IN KOLIČINE LIPIDNIH KAPELJ V CELICAH B PREBAVNIH ŽLEZ..... | 25 |
| 2.7 | VREDNOTENJE FIZIOLOŠKEGA STANJA ORGANIZMA <i>P. scaber</i> | 27 |
| 2.8 | VREDNOTENJE ULTRASTRUKTURE EPITELIJA PREBAVNIH ŽLEZ..... | 27 |
| 2.9 | PRIPRAVA VZORCEV ZA ANALIZO ELEMENTOV..... | 27 |
| 2.9.1 | Priprava prebavnih žlez za analizo z mikro-PIXE (metoda protonsko vzbujenih rentgenskih žarkov)..... | 27 |
| 2.9.2 | Priprava prebavnih žlez za analizo s TEM/EDX (energijsko disperzivna rentgenska spektroskopija)..... | 28 |
| 2.9.3 | Priprava živali <i>P. scaber</i> za analizo z AAS (atomska absorpcijska spektroskopija)..... | 29 |
| 2.10 | STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV..... | 30 |
| 3 | REZULTATI..... | 31 |
| 3.1 | ZNAČILNOSTI NANODELCEV UPORABLJENIH V POSKUSIH..... | 31 |
| 3.2 | VPLIV NANODELCEV NA PREHRANJEVANJE, SPREMEMBE MASE IN PREŽIVETJE ORGANIZMA..... | 34 |
| 3.3. | VPLIV NANODELCEV NA HISTOLOŠKE ZNAČILNOSTI CELIC PREBAVNIH ŽLEZ..... | 36 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3.3.1 | Histološke značilnosti celic prebavnih žlez pri živalih iz terarija in poskusa z nano-TiO₂..... | 36 |
| 3.3.2 | Histološke značilnosti celic prebavnih žlez pri živalih iz terarija in poskusa z nano-ZnO in ZnCl₂..... | 38 |
| 3.3.3 | Histološke značilnosti celic prebavnih žlez pri živalih iz terarija in poskusa z nano-Ag..... | 40 |
| 3.4 | VPLIV NANODELCEV NA FIZIOLOŠKO STANJE ŽIVALI..... | 42 |
| 3.5 | VPLIV NANODELCEV NA ULTRASTRUKTURNE ZNAČILNOSTI V CELICAH PREBAVNIH ŽLEZ..... | 45 |
| 3.5.1 | Ultrastrukturne značilnosti v celicah prebavnih žlez pri živalih iz terarijev in pri živalih iz kontrole poskusa..... | 45 |
| 3.5.2 | Ultrastrukturne značilnosti v celicah prebavnih žlez pri živalih iz poskusa z nano-TiO₂..... | 51 |
| 3.5.3 | Ultrastrukturne značilnosti v celicah prebavnih žlez pri živalih iz poskusa z nano-ZnO in ZnCl₂..... | 56 |
| 3.5.4 | Ultrastrukturne značilnosti v celicah prebavnih žlez pri živalih iz poskusa z nano-Ag..... | 61 |
| 3.6 | ELEMENTI V ORGANIZMU ALI V CELICAH PREBAVNIH ŽLEZ PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM..... | 65 |
| 3.6.1 | Vsebnost nano-TiO₂ v celicah prebavnih žlez..... | 65 |
| 3.6.2 | Vsebnost srebrovih ionov v celicah prebavnih žlez..... | 66 |
| 3.6.3 | Vsebnost celokupnega cinka v organizmu..... | 68 |
| 3.6.3.1 | Celokupna vsebnost cinka v telesu..... | 68 |
| 4 | RAZPRAVA IN SKLEPI..... | 69 |
| 4.1 | RAZPRAVA..... | 69 |
| 4.1.1 | Prehranjevanje, smrtnost in sprememba mase..... | 70 |
| 4.1.2 | Debelina epitelijskega in količina lipidnih kapelj v celicah prebavnih žlez..... | 71 |
| 4.1.3 | Sprememba fiziološkega stanja živali..... | 72 |
| 4.1.4 | Ultrastrukturne značilnosti celic prebavnih žlez..... | 73 |
| 4.1.4.1 | Vpliv priprave tkiva na ultrastrukturne spremembe v celicah prebavnih žlez..... | 79 |
| 4.1.5 | Vsebnost nanodelcev oziroma kovin v celicah prebavnih žlez in organizmu...80 | 80 |

| | | |
|----------|--------------------------------|-----------|
| 4.2 | SKLEPI..... | 85 |
| 5 | POVZETEK (SUMMARY)..... | 88 |
| 5.1 | POVZETEK..... | 89 |
| 5.2 | SUMMARY..... | 90 |
| 6 | VIRI..... | 92 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|---|----|
| Preglednica 1. Poskusi s <i>P. scaber</i> , ki so bili hranjeni z različnimi nanodelci ali ZnCl ₂ (končne koncentracije testiranih nanodelcev in ZnCl ₂ , (+ parametri so bili analizirani, – parametri niso bili analizirani)..... | 22 |
| Preglednica 2. Povzetek značilnosti nanodelcev, ki smo jih ugotovili s pomočjo elektronske mikroskopije (TEM, TEM/EDX, SEM), metod DLS, BET in XRD. Opisane so tudi informacije o nanodelcih, ki smo jih dobili pri proizvajalcu..... | 33 |
| Preglednica 3. Ultrastrukturne značilnosti in posebnosti na posameznih organelih v celici pri <i>P. scaber</i> po 14-dnevni izpostavitvi različnim nanodelcem ali ZnCl ₂ | 46 |
| Preglednica 4. Pojavljanje ultrastrukturnih značilnosti v celicah prebavnih žlez pri <i>P. scaber</i> po 14-dnevni izpostavitvi različnim nanodelcem ali ZnCl ₂ | 47 |
| Preglednica 5. Povzetek vseh rezultatov poskusov s <i>P. scaber</i> | 70 |
| Preglednica 6. Rezultati poskusov z nanodelci ali ZnCl ₂ pri <i>P. scaber</i> | 79 |

KAZALO SLIK

| | |
|--|----|
| Slika 1. Razmerje med velikostjo delcev in deležem molekul na njihovi površini (Nel in sod., 2006)..... | 2 |
| Slika 2. Različne možne poti nanodelcev v celico (1 – fagocitoza, 2 - makropinocitoza, 3 – s klatrinom posredovana endocitoza, 4 – endocitoza neodvisna od klatrina in kaveol, 5 – s kaveolami posredovana endocitoza in 6 – difuzija (Unfried in sod., 2007)..... | 6 |
| Slika 3. Navadni prašiček (<i>P. scaber</i>)..... | 11 |
| Slika 4. Shematski prikaz prebavnega sistema pri odraslem kopenskem enakonožnem raku (<i>Oniscus asellus</i>). Levi par hepatopankreasa je zaradi boljše preglednosti odstranjen (Hames in Hopkin, 1989)..... | 13 |
| Slika 5. Shematska predstavitev celice B in S v prebavnih žlezah enakonožca <i>Porcellio scaber</i> . GER – granulirani endoplazmatski retikulum; gB, gB/A in gC – različne vrste granul, v katerih se kopičijo različne kovine; h – hemocel; li – lipidna kaplja; sv – svetlina žleze; m – mitohondrij; mv – mikrovili; mo – mikroorganizem; j – jedro; bl – bazalni labirint (Hames in Hopkin, 1991)..... | 15 |
| Slika 6. Debelina epitelija celic prebavnih žlez; (A) velike kupulaste celice B (> 90 µm) predstavljajo 5. razred, (B) velike kupulaste celice B s posameznimi piramidnimi ali rahlo sploščenimi celicami B (80 µm) 4. razred, (C) piramidne oblike ali rahlo sploščene celice B (60 µm) 3. razred, (D) ploščate celice B s posameznimi celicami piramidne oblike ali rahlo sploščene celice B (50 µm) 2. razred, (E) ploščate celice B (< 40 µm) 1. razred..... | 25 |
| Slika 7. Količina lipidnih kapelj v celicah B prebavne žleze pri <i>P. scaber</i> ; (A) zelo veliko lipidnih kapelj predstavlja 5. razred, (B) veliko lipidnih kapelj predstavlja 4. razred, (C) srednje veliko lipidnih kapelj predstavlja 3. razred, (D) malo lipidnih kapelj predstavlja 2. razred, (E) zelo malo lipidnih kapelj predstavlja 1. razred..... | 26 |
| Slika 8. Inštrument PIXE (vir: http://www.rcp.ijs.si/mic/our_work/applications/environment/pixe-method.jpg)..... | 28 |
| Slika 9. Mikrografije nanodelcev, izdelane s presežno svetlobno mikroskopijo. A) nano-TiO ₂ , B) nano-ZnO, C) nano-Ag..... | 32 |
| Slika 10. Stopnja prehranjevanja <i>P. scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nano-TiO ₂ koncentracije 1 000 in 5 000 µg/g suhe mase lista. Na x-osi so označene izpostavitvene koncentracije nano-TiO ₂ , n – število živali v skupini..... | 34 |
| Slika 11. Stopnja prehranjevanja <i>P. scaber</i> po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nano-ZnO in ZnCl ₂ koncentracij 2 000 in 5 000 µg/g suhe mase lista. Na x-osi so označene izpostavitvene koncentracije nano-ZnO in ZnCl ₂ , n – število živali v skupini. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo so označene z zvezdicami (t-test; ***p < 0,005).. | 35 |

Slika 12. Stopnja prehranjevanja *P. scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nano-Ag koncentracij 1 000 in 5 000 $\mu\text{g/g}$ suhe mase lista. Na x -osi so označene izpostavitvene koncentracije nano-Ag, n – število živali v skupini.....36

Slika 13. (A) Odstotek živali v različnih skupinah z različno debelino epitelija (glede na obliko in velikost celic B smo epitelij razdelili na pet razredov, tj. od ploščatih celic (1) do velikih, kupulastih celic B (5)). (B) Odstotek živali v različnih skupinah z različno količino lipidnih kapelj v celicah B prebavne žleze pri *P. scaber*, ki so bili izpostavljeni nano-TiO₂. Količino lipidnih kapelj smo ocenili od zelo malo (1) do zelo veliko (5). Na x -osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola, 1 000 in 5 000 μg nano-TiO₂/g hrane); n – število živali v skupini.....37

Slika 14. (A) Odstotek živali v različnih skupinah z različno debelino epitelija (glede na obliko in velikost celic B smo epitelij razdelili na pet razredov, tj. od ploščatih celic (1) do velikih kupulastih celic B (5)). (B) Odstotek živali v različnih skupinah z različno količino lipidnih kapelj v celicah B prebavne žleze pri *P. scaber*, ki so bili izpostavljeni nano-ZnO in ZnCl₂. Količino lipidnih kapelj smo ocenili od zelo malo (1) do zelo veliko (5). Na x -osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola, 2 000 in 5 000 μg nano-ZnO ali ZnCl₂/g hrane); n – število živali v skupini. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo poskusa so označene z zvezdicami (t-test; * $p < 0,05$)39

Slika 15. (A) Odstotek živali v različnih skupinah z različno debelino epitelija (glede na obliko in velikost celic B smo epitelij razdelili na pet razredov, tj. od ploščatih celic (1) do velikih kupulastih celic B (5)). (B) Odstotek živali v različnih skupinah z različno količino lipidnih kapelj v celicah B prebavne žleze pri *P. scaber*, ki so bili izpostavljeni nano-Ag. Količino lipidnih kapelj smo ocenili od zelo malo (1) do zelo veliko (5). Na x -osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola, 1 000 in 5 000 μg nano-Ag/g hrane); n – število živali v skupini.....41

Slika 16. Odstotek živali v 14-dnevnih poskusih z nano-TiO₂ z različnim fiziološkim stanjem, ocenjenim glede na debelino epitelija in količino lipidnih kapelj v celicah B (NS – živali, ki niso pod stresom, SS – živali pod srednjim stresom, S – živali pod stresom). Na x -osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola iz poskusa, 1 000 in 5 000 μg nano-TiO₂/g hrane); n – število živali v skupini.....42

Slika 17. Odstotek živali v 14-dnevnih poskusih z nano-ZnO in ZnCl₂ z različnim fiziološkim stanjem, ocenjenim glede na debelino epitelija in količino lipidnih kapelj v celicah B (NS – živali, ki niso pod stresom, SS – živali pod srednjim stresom, S – živali pod stresom). Na x -osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola iz poskusa, 2 000 in 5 000 μg nano-ZnO/g hrane, 2 000 in 5 000 μg ZnCl₂/g hrane); n – število živali v skupini. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo so označene z zvezdicami (t-test, * $p < 0,05$).....43

Slika 18. Odstotek živali v 14-dnevnih poskusih z nano-Ag z različnim fiziološkim stanjem, ocenjenim glede na debelino epitelija in količino lipidnih kapelj v celicah B (NS – živali, ki niso pod stresom, SS – živali pod srednjim stresom, S – živali pod stresom). Na x -osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola iz poskusa, 1 000 in 5 000 μg nano-Ag/g hrane); n – število živali v skupini.....44

- Slika 19. (A) Prečni prerez prebavne žleze s kupulastimi celicami in s posameznimi piramidnimi celicami B in vmesnimi celicami S živali iz gojišča in kontrole poskusa (poskusi z nano-TiO₂, nano-ZnO in ZnCl₂). (B) Prečni prerez prebavne žleze, večja povečava.....46
- Slika 20. Ultrastruktura kupulastih celic s posameznimi piramidnimi celicami B prebavnih žlez živali iz terarija in kontrole poskusa (poskusi z nano-TiO₂, nano-ZnO in ZnCl₂). (A) Velike (B) in male celice (S). (B) Celica B z mikrovili (M), mitohondriji (m), GER (G)..49
- Slika 21. Ultrastruktura kupulastih celic B s posameznimi piramidnimi celicami prebavnih žlez živali iz terarija in kontrole poskusa (poskusi z nano-TiO₂, nano-ZnO in ZnCl₂). (A) Celica B, del jedra (J), lipidne kaplje (Li), GER (G). (B) Večja povečava celice B, mitohondriji (m), lamelarna telesa (L), GER (G).....50
- Slika 22. Ultrastruktura celice B prebavnih žlez živali iz kontrole poskusa z nano-Ag, mikrovili (M), elektronsko gosta citoplazma (EGC), lamelarna telesa (L).....51
- Slika 23. Epitelij iz ploščatih celic B in celic S prebavnih žlez živali, hranjene s hrano z nano-TiO₂ (1 000 µg/g).....52
- Slika 24. Ultrastruktura ploščate celice B prebavnih žlez živali, hranjene z nano-TiO₂ (1 000 µg/g). (A) Spremenjena oblika mikrovilov (M), avtofagne vakuole (V). (B) mrežasto jedro (J). Elektronsko gosta citoplazma (EGC).....53
- Slika 25. (A) Epitelij iz piramidnih ali rahlo sploščenih celic B in celic S prebavnih žlez živali, hranjene z nano-TiO₂ (1 000 µg/g). (B) Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic prebavne žleze živali, hranjene z nano-TiO₂. Temna celica B (B) z mikrovili (M) in mitohondriji (m), svetlejša celica S (S).....54
- Slika 26. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic prebavnih žlez živali, hranjene z nano-TiO₂ (5 000 µg/g). (A) Velika celica B z GER (G), lipidno kapljo (Li), mitohondriji (m) in jedrom (J). (B) Velika celica B z mikrovili (M), lamelarnimi telesi (L) in avtofagnimi vakuolami (V).....55
- Slika 27. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic B prebavnih žlez živali, hranjenih z nano-ZnO. (A) Celica B, dolgi mitohondriji (m), vezikli GER (G) živali, hranjene z 2 000 µg nano-ZnO/g hrane. (B) Celica B, vezikli z EGD (D), diktiosomi (GA), del jedra (J) živali, hranjene s 5 000 µg nano-ZnO/g hrane.....57
- Slika 28. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic B in celic S prebavnih žlez živali, hranjene z nano-ZnO (5 000 µg/g). (A) Velika celica B (B) z vezikli, rahlo naguban jedrni ovoje, mala celica S (S) z GER v obliki veziklov (G). (B) večja povečava celice B, vezikli GER (G), del jedra (J).....58
- Slika 29. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic B prebavnih žlez živali, hranjene z ZnCl₂ (2 000 µg/g). (A) Celica B z delno resorbiranimi lipidnimi kapljami (Li) in jedrom (J). (B) Celica B z reduciranimi mikrovili (M), delno resorbirana lipidna kaplja (Li), elektronsko gosta citoplazma (EGC).....59

- Slika 30. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic prebavnih žlez živali, hranjenih z $ZnCl_2$. (A) Celica B (B) z velikimi vakuolami (V), celica S (S) s posameznimi mitohondriji (m) živali, hranjene z 2 000 μg nano- $ZnCl_2/g$ hrane. (B) Naguban jedrni ovoj v celici S (J) živali, hranjene s 5 000 μg nano- $ZnCl_2/g$ hrane.....60
- Slika 31. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic B prebavnih žlez živali, hranjene z nano-Ag (1 000 $\mu g/g$). (A) Celica B z mikrovili (M), vezikli z EDG (D), lipidna kaplja (Li). (B) Celica B, gosta vezikularizacija na konicah mikrovilov (M), EGD (D), lamelarna telesa (L).....62
- Slika 32. Ultrastruktura cilindričnih celic S prebavnih žlez živali, hranjene z nano-Ag (1 000 $\mu g/g$). (A) Celica S z GER v obliki veziklov (G). (B) Celica S z granulami (G), dolgi kačasti mitohondriji (m).....63
- Slika 33. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic B prebavnih žlez živali, hranjene z nano-Ag (5 000 $\mu g/g$). (A) Celica B z lipidnimi kapljami (Li), med njimi številne vakuole z EDG (V). (B) Naguban jedrni ovoj in jedro (J) v celici B64
- Slika 34. Elementna mapa mikro-PIXE Cu, Zn in Ti pri *P. scaber*: (A) prečni prerez prebavne žleze kontrolne živali; (B) prečni prerez prebavne žleze živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano- TiO_2 (5 000 μg nano- TiO_2/g hrane); (C) prečni prerez prebavne žleze živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano- TiO_2 (5 000 μg nano- TiO_2/g hrane).....65
- Slika 35. Elementna mapa mikro-PIXE Cu, Zn in Ag pri *P. scaber*: (A) prečni prerez prebavne žleze kontrolne živali; (B) prečni prerez prebavne žleze živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-Ag (1 000 μg nano-Ag/g hrane); (C) prečni prerez prebavne žleze živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-Ag (5 000 μg nano-Ag/g hrane); (D) prečni prerez prebavne žleze živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-Ag (5 000 μg nano-Ag/g hrane).....67
- Slika 36. Granula v mali celici: TEM-EDX Ag. TEM mikrografija granule B. (A) granula v celici živali iz kontrole; (D) granula v celici živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-Ag (5 000 $\mu g/g$ hrane). B, C, D, F. EDX/TEM analiza, opravljena na granuli (B in E \rightarrow) ter v citoplazmi (C in F \rightarrow). Elementna mapa granula v celici kontrolne živali (B, C) in elementna mapa granula v celici živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-Ag (5 000 $\mu g/g$ hrane) (E, F).....67
- Slika 37. Izračunana celokupna koncentracija Zn v celi živali *P. scaber* po 28-dnevnom hranjenju z nano-ZnO ali $ZnCl_2$ (koncentracij 2 000 in 5 000 $\mu g/g$). Na x-osi so označene izpostavitvene koncentracije nano-ZnO in $ZnCl_2$, n – število živali v skupini. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo so označene z zvezdicami (t-test; * $p < 0,05$).....68

KRATICE IN OKRAJŠAVE

AAS – atomska absorpcijska spektroskopija

EDX – energijsko disperzivna rentgenska spektroskopija

EGD – elektronsko gosti depoziti

GER – granuliran endoplazemski retikel

Mikro -PIXE – metoda protonsko vzbujenih rentgenskih žarkov

Nano-TiO₂ – nanodelci titana

Nano-ZnO – nanodelci cinka

Nano-Ag – nanodelci srebra

TEM – presečna elektronska mikroskopija

1 PREDSTAVITEV PROBLEMATIKE IN HIPOTEZE

1.1 NANOTEHNOLOGIJA

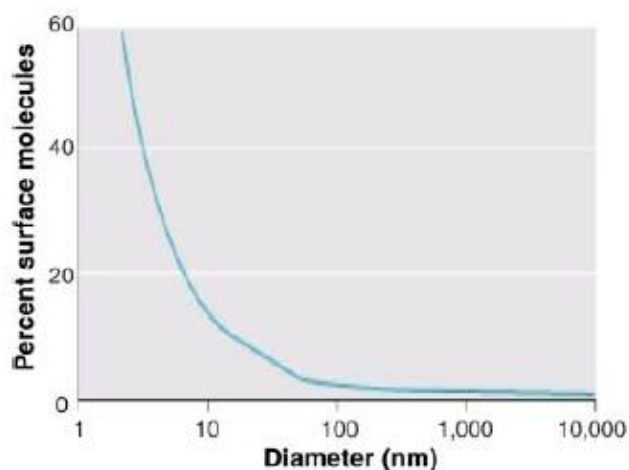
Nanotehnologija je bila še pred kratkim predstavljena kot tehnologija prihodnosti. S hitrim razvojem nanoznanosti strmo narašča število nanomaterialov, prisotnih v vsakdanji uporabi. Po nekaterih ocenah bo imela nanotehnologija večji vpliv na družbeno življenje, kot ga je imela industrijska revolucija. Nanomateriale najdemo v kozmetiki, tekstilni industriji, farmaciji, medicini in številnih drugih panogah. Njihove lastnosti se izkoriščajo predvsem za zaščito pred svetlobo, odboj vode in tudi kot zaščito pred bakterijami. Trenutno so v nanotehnologiji med najbolj uporabljanimi nanomateriali kovinski nanodelci, in sicer nano-Ag, nano-ZnO, nano-TiO₂ in nano-Fe (Nel in sod., 2006; Tourinho in sod., 2012).

1.2 LASTNOSTI NANODELCEV

Nanodelci so strukture, ki v vsaj eni dimenziji merijo manj kot 100 nm. Njihove lastnosti se zaradi njihove majhnosti bistveno razlikujejo od lastnosti, ki jih imajo večji delci enake kemijske sestave. Nanodelci so zmožni različnih interakcij z biološkimi sistemi in so zato potencialno strupeni (Handy in sod., 2008).

Biološko reaktivnost nanodelcev določajo lastnosti delcev, kot so velikost, oblika, kemijska sestava, odtapljanje in lastnosti nanodelcev v suspenziji. Zaradi majhnosti imajo povečano površinsko aktivnost. Nanodelci so različnih oblik (igličasti, nitkasti, okrogli ...). Oblika nanodelca določa njegovo površino, na kateri so proste kemijske vezi ali električni naboj, ki vpliva na kemijske in fizikalne lastnosti delca. Pomembna je tudi kemijska sestava, in sicer glede na topnost v vodi ali bioloških tekočinah. Kovinski nanodelci so običajno topni in se raztapljajo v ione, ti pa lahko različno vplivajo na procese v celici in organizmih. Kovinski oksidi so običajno kemijsko stabilnejši, vendar tisti, ki vsebujejo prehodne kovine, še vedno lahko povzročajo kemijske reakcije in ravno tako vplivajo na celice zaradi večjega števila možnih oksidacijskih stanj kovinskega iona (Remškar, 2009).

Velikost delcev in specifična površina so pomembne karakteristike nanodelcev z vidika biološke reaktivnosti. Ob manjšanju velikosti delca se specifična površina povečuje, s tem pa se povečuje tudi delež atomov in molekul na površini delca. Povečanje specifične površine predstavlja povečanje reaktivnosti skupin na površini nanodelca in posledično tudi povečanje reaktivnosti nanodelcev (Nel in sod., 2006).



Slika 1. Razmerje med velikostjo delcev in deležem molekul na njihovi površini (Nel in sod., 2006)

Nanomateriali so lahko različne elementarne in kemijske sestave, kar vpliva na njihov učinek in delovanje na organizme. Kemijska sestava nanomaterialov je lahko anorganska, kamor prištevamo kovine (železo, nikelj, cink, titan, srebro ...) in kovinske okside (titanov oksid, cinkov oksid ...), ali organska (fulereni, ogljikove nanocevke, nanopolimeri, razne biomolekule ...), lahko pa imajo tudi hibridno strukturo (kvantne pike). Poleg kemijske sestave je pomembna tudi čistost nanodelcev, saj lahko nečistoče vplivajo na biološki učinek in tako povzročijo drugačne biološke odzive, kot bi jih čisti delci (Maynard in sod., 2004; Pulskamp in sod., 2007).

Nanodelci se lahko povezujejo v agregate ali aglomerate. Agregacija je opredeljena kot močna povezava primarnih delcev, aglomeracija pa kot šibka povezava z Van der Waalsovimi vezmi med delci (Jiang in sod., 2009). Na agregacijo in aglomeracijo vplivajo fizikalne lastnosti.

(Brownovo gibanje, težnost, medij, v katerem so nanodelci) in karakteristike nanodelcev (površinske značilnosti in velikost delca) (Farre in sod., 2009). Zaradi Brownovega gibanja prihaja med delci do trkov in posledično do aglomeracije (Lin in sod., 2008).

Pri nekaterih kovinskih nanodelcih, ki so termodinamično nestabilni, prihaja do odtapljanja ionov (Tourinho in sod., 2012). Odtapljanje ionov od nanodelcev določa usodo le-teh v okolju in organizmih. Odtapljanje je odvisno od topnosti kovine v okolju oziroma mediju in od koncentracijskega gradienta med površino nanodelca in raztopino (Auffan in sod., 2009). Na stopnjo odtapljanja ionov od nanodelcev vplivajo tudi specifična površina nanodelcev in od velikosti odvisne spremembe v strukturiranosti površine. Odtapljanje je pri nanodelcih oziroma manjših delcih običajno večje kot pri večjih delcih iste kemijske

sestave (Borm in sod., 2006). Odtapljanje močno zmanjšajo razne prevleke in ovoji, s katerimi obdajajo nanodelce (Monteiro-Riviere in Orsiere, 2007).

Zaradi vseh navedenih lastnosti nanodelcev je karakterizacija sveže pripravljenih nanodelcev v medijih, s katerimi delamo v nadaljnjih poskusih, in nanodelcev v prahu nujno potrebna. S karakterizacijo pridobimo fizikalne in kemijske lastnosti ter informacije o nanodelcih. Na voljo je več analitskih postopkov in metod, ki vključujejo različne tehnike, tj. mikroskopske, spektroskopske, kromatografske in nuklearne. Da so podatki o vplivu nanomaterialov na organizme relevantni, je potrebna karakterizacija naslednjih lastnosti: velikosti suhih delcev in porazdelitve velikosti, specifične površine v mediju, kristalne strukture, aglomeracije v mediju, površinskega naboja, hidrofobnosti, čistosti vzorca in odtapljanja materiala (<http://characterizationmatters.org/>).

1.3 VPLIV NANODELCEV NA ULTRAŠTRUKTURNE SPREMEMBE V CELICAH

V naših poskusih nas je zanimal predvsem vpliv nanodelcev na ultrastrukturne spremembe v celicah. Opravljene so študije o vplivu nanodelcev na različnih celičnih kulturah (*in vitro*) in na celicah oziroma organih različnih organizmov (*in vivo*).

Na različnih celičnih kulturah so bile opravljene študije *in vitro*, v okviru katerih so opazovali vpliv različnih nanodelcev (TiO₂, ZnO, Ag, delcev iz onesnaženega zraka, hidroksiapatita, Au) na ultrastrukturo celic. Kocbek in sod. (2010) so opazovali spremembe v keratinocitah zaradi vpliva nano-TiO₂ in nano-ZnO. Po 3-mesečni izpostavitvi celic nanodelcem koncentracij 10 µg/mL so ugotovili prisotnost aglomeratov nanodelcev le v veziklih, drugje pa ne. Ugotovili so, da se je v celicah nano-TiO₂ bolj kopičil kot nano-ZnO. Po 72-urni izpostavitvi celic nano-TiO₂ v koncentraciji 100 µg/mL niso zaznali vpliva na celice, nano-ZnO pa je v enaki koncentraciji povzročil zmanjšanje viabilnosti celic. Vpliv TiO₂ so opazovali tudi Fisichella in sod. (2012) na črevesnih celicah caco-2. Po 72 urah izpostavitve nanodelcem v koncentraciji 100 µg/ml so ugotovili, da nano-TiO₂ ne vpliva na morfologijo celic. Kim in sod. (2011) so opazovali vpliv nano-Ag (v koncentraciji 1–16 µg/ml). Po 48 urah izpostavitve nano-Ag so na celicah MC3T3-E1 (mišje celice preosteoblasti) ugotovili znake apoptoze, in sicer kondenzacijo kromatina, spremembe v obliki jedrnega ovoja in prisotnost večjega števila avtofagnih vakuol, citoplazma celic pa je bila ohranjena. Pri celicah PC12 (celice adrenalne žleze podgan) so ugotovili znake nekroze, prisotni so bili razpadajoči organeli in velike pore v membrani. Li in sod. (2003) so opazovali vpliv drobnih nanodelcev v koncentraciji 1,9 in 3,9 µg/m³ iz onesnaženega zraka na celice RAW 264,7. Po 16 urah izpostavitve so ugotovili prisotnost

delcev v mitohondrijih, poškodbe na kristah, prisotnost večjega števila mielinskih struktur in avtofagnih vakuol v celicah. Sun in sod. (2007) so na podganjih makrofagih po 24-urni izpostavitvi nanodelcem hidroksiapatita (nano-HAP) v koncentraciji 20 µg/mL ugotovili redukcijo psevdopodijev, zgostitev karioplazme in povečanje števila avtofagnih vakuol. Izpostavitve nano-HAP v koncentraciji 100 µg/mL je povzročila pojav apoptotskih teles, še večja izpostavitve 200 µg nano-HAP/mL pa je povzročila propad celic. Taylor in sod. (2009) so po 96 urah izpostavitve celic nano-Au v koncentraciji 25 µm ugotovili prisotnost delcev v elektronsko gostih granulah, v strukturi celic pa niso opazili sprememb.

Dve študiji sta preučevali vpliv nano-ogljika na celične kulture. Di Giorgio in sod. (2011) so po 24-, 48- in 72-urni izpostavitvi celic nano-ogljiku v koncentraciji 10 µg/mL ugotovili kondenzacijo kromatina v jedru in strukturne spremembe v mitohondrijih. Opazili so tudi apoptotske celice. Wang in sod. (2012) so po izpostavitvi nano-ogljiku v koncentraciji 80 µg/g pri celicah RAW ugotovili znake apoptoze, in sicer so bili prisotni fagosomi, opazili pa so tudi degeneracijo jedra, spremembe v strukturi mitohondrijev in endoplazemskega retikla (ER) ter prisotnost večjega števila avtofagnih vakuol v celicah.

Nekaj študij glede vpliva nanodelcev na ultrastrukturo celic je bilo izvedenih tudi na rakastih celicah. Qi in sod. (2005) so opazovali vpliv nanodelcev hitozana na rakaste celice v koncentraciji 100 µg/mL. Že po 30 minutah izpostavitve so ugotovili poškodbe v strukturi mikrovilov, po 2 urah pa so ugotovili redukcijo in razpad mikrovilov, velike pore v celičnih membranah in prisotnost avtofagnih vakuol. Po 4 urah izpostavitve nanodelcem hitozana so celice razpadle. Han in sod. (2006) so opazovali spremembe na različnih rakastih celicah zaradi nanodelcev apatita. Že po 24 urah izpostavitve koncentracijam 0,14 in 0,34 mmol/L so ugotovili spremembe v obliki jedrnega ovoja in jedra ter tudi skrajšanje in razpad mikrovilov. Po 72 urah so ugotovili, da nanodelci apatita v navedenih koncentracijah povzročijo kondenzacijo kromatina, povečanje števila avtofagnih vakuol in manjše število mitohondrijev ter tudi manj ER. Chen in sod. (2007) so prav tako na rakastih celicah po 2 dnevih izpostavitve nano-HAP v koncentraciji 0,56 mmol/L ugotovili znake apoptoze (povečanje vakuol, spremembe v strukturi ER in mitohondrijev ter preluknjan jedrni ovoj). Nano-HAP so prav tako povzročili znake apoptoze na rakastih celicah BEL-7402. Po 48 urah izpostavitve nano-HAP v koncentraciji 50–200 mg/L so ugotovili kondenzacijo kromatina, apoptotska telesa in spremembe v strukturi celične membrane (Liu in sod., 2003). De Berardis in sod. (2010) so opazovali spremembe rakastih celic zaradi vpliva nano-ZnO. Po 24 urah izpostavitve nano-ZnO v koncentraciji 10 µg/mL so v celicah odkrili kondenzacijo kromatina, povečanje velikosti mitohondrijev in poškodbe na kristah mitohondrijev. Sun in sod. (2011) so po 24 urah na rakastih celicah

ugotavljali vpliv nanodelcev silicija v koncentraciji 200 µg/mL. Ugotovili so spremembe v številu mitohondrijev (redukcija) in strukturi mitohondrijev (nabreklost, izginjanje krist in luknje v kristah) ter pojav številnih vakuol v citoplazmi.

Izvedenih je bilo tudi nekaj *in vivo* študij o vplivu nanodelcev na ultrastrukturne spremembe različnih celic podgan. Hara in sod. (2012) so pri celicah pljuč podgan, ki so jim v traheje injicirali nanodelce poliaktid-glikolida v koncentraciji 80 mg/mL, po 5, 30, 60 minutah in 24 urah ugotovili povečanje števila pinocitotskih veziklov ob membranah celic, v makrofagih pa veliko lizosomov. Tseng in sod. (2012) so v podganah, v katere so z intravenozno infuzijo vnesli nano-CeO₂ (koncentracije 85 mg/kg), odkrili piknotične celice v jetrih, povečanje števila lizosomov z delci in kondenzacijo kromatina. Onischenko in sod. (2012) so v črevesje podgan injicirali nano-TiO₂ in po 3 urah ugotovili, da se ultrastruktura celic enterocitov ni spremenila.

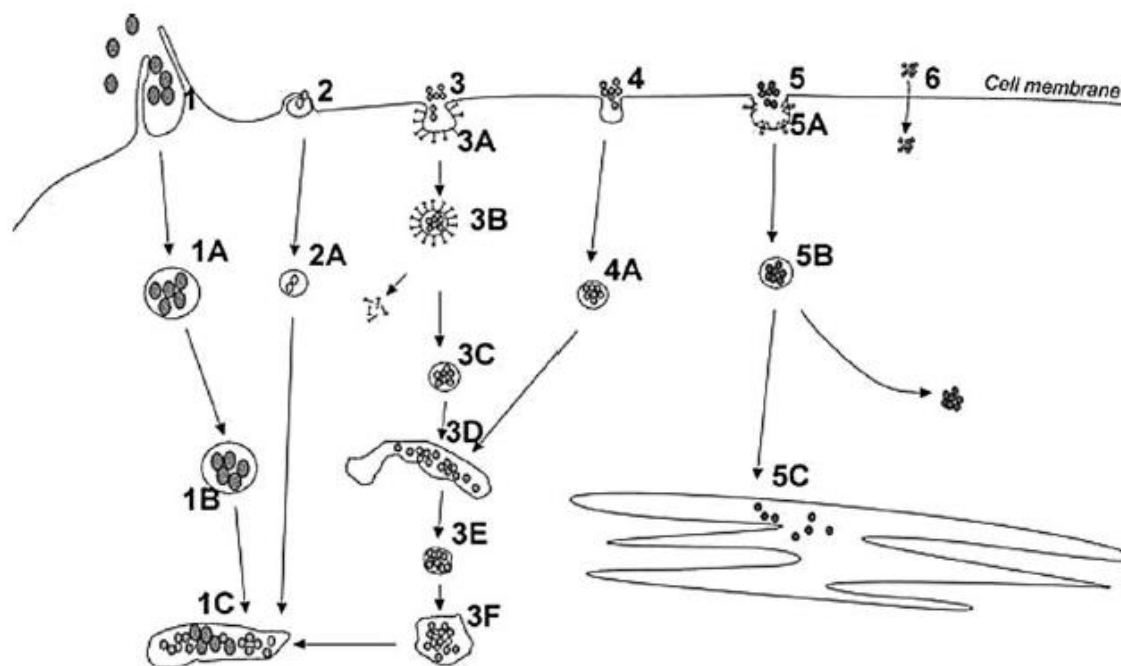
In vivo študije o vplivu nanodelcev na ultrastrukturne spremembe celic so bile izvedene tudi na miših. Wang in sod. (2008) so po 30 dneh izpostavitve miši nanodelcem TiO₂ (doziranje v nosno odprtino vsak drugi dan, 500 µg nano-TiO₂/miš) ugotovili v celicah olfaktornega bulbosa kondenzacijo kromatina in manjše število povečanih mitohondrijev. V nevronih hipokampusu so opazili kondenzacijo kromatina, naguban jedrni ovoj, zmanjšanje velikosti mitohondrijev ter povečanje ER in prostih ribosomov. Zensi in sod. (2009) so mišim intravenozno injicirali nanodelce („HAS-human serum albumin nanoparticles“, v koncentraciji 20 mg/mL). Po 15 in 30 minutah so ugotovili, da ti albuminski nanodelci ne vplivajo na morfologijo endotelnih celic. Inoue in sod. (2009) so v traheje miši injicirali nano-ogljik v koncentraciji 12 mg/mL. Po 5 minutah so ugotovili povečano število makrofagov in nevtrofilcev, degeneracijo alveol in poškodbe na nevtrofilcih ter tudi tanjšo alveolarno steno, velike pore na membranah celic in povečanje števila veziklov. Oostuzen in sod. (2012) so pri miših, ki so inhalirale nano-TiO₂ (v koncentraciji 10 mg/m³), v jetrih po 6 tednih ugotovili vnetje v celicah in gostejša kolagenska vlakna. Liu in sod. (2012) so opazovali celice v jetrih miši po 6 tednih izpostavitve nanodelcem silicija v najvišji koncentraciji 50 mg/kg. Že pri nižji koncentraciji 25 mg/kg so opazili povečanje celic, številne lizosome in veliko nekrotičnih celic.

In vivo študija je bila izvedena tudi na vodnem nevretenčarju *Daphnia magna*. Opazili so spremembe v ultrastrukturi celic srednjega črevesa po izpostavitvi različnim koncentracijam nano-Cu (koncentracije 50 in 175 mg/L) in večjim delcem Cu v enaki koncentraciji. Pri večjih delcih so se spremembe v celicah pojavile pozneje, in sicer šele po 48 urah, pri nanodelcih pa že po 24 urah. Opazili so dilatacijo medceličnih prostorov in

prisotnost lipidnih vključkov v celicah. Po 48 urah so opazili tudi spremembe v obliki in velikosti mikrovilov, prisotne so bile bakterije, v lumnu pa veliko veziklov z nanodelci (Heinlaan in sod., 2011).

1.4 AKUMULACIJA NANODELCEV V ŽIVALSKIH ORGANIZMIH

Vstop snovi in tudi nanodelcev v celico je možen na več različnih načinov. Snovi lahko v celico vstopajo s fagocitozo, makropinocitozo, s klatrinom posredovano endocitozo, endocitozo, neodvisno od klatrina in kaveolina, s kaveolinom posredovano endocitozo in difuzijo (Unfried in sod., 2007).



Slika 2. Različne možne poti nanodelcev v celico (1 – fagocitoza, 2 – makropinocitoza, 3 – s klatrinom posredovana endocitoza, 4 – endocitoza, neodvisna od klatrina in kaveol, 5 – s kaveolami posredovana endocitoza in 6 – difuzija (Unfried in sod., 2007)

Kako oziroma na kakšen način bodo nanodelci vstopili v celico, je odvisno predvsem od fizikalnih in kemijskih lastnosti nanodelcev (velikosti, kemijske strukture, ovojev okrog nanodelcev, površinskih nabojev, aglomeracije in agregacije) ter tudi od tipa celice (Unfried in sod., 2007).

Vendar pa obstajajo tudi izjeme; ugotovili so, da srebrovi nanodelci v različne celice vstopajo na enak način. V tem primeru so opazovali epiteljske celice, fibroblaste in monocite. Ugotovili so internalizacijo obeh tipov srebra (srebrovih kompleksov in nanodelcev srebra) s fagocitozo in difuzijo (Unfried in sod., 2007).

Prisotnost celokupnega titana so potrdili v nekaj študijah na različnih organizmih. Hu in sod. (2010) so z metodo ICP-AES (atomska emisijska spektroskopija z induktivno sklopljeno plazmo) ugotavljali prisotnost celokupnega titana v smrdljivem deževniku *Eisenia fetida* po 7-dnevni izpostavitvi nano-TiO₂ v koncentraciji 5 g/kg. Ugotovili so le prisotnost, ne vemo pa, ali se je nahajal tudi v tkivih. V drugi študiji so Bigorgne in sod. (2011) po 24-urni izpostavitvi *E. fetida* nano-TiO₂ v koncentraciji 10 mg/L prav tako z uporabo ICP-AES ugotovili prisotnost celokupnega titana le pri najvišji koncentraciji. Glede na to, da so ugotavljali prisotnost v celotnem organizmu, tudi v tej študiji ne vemo, ali je bil prisoten tudi v celicah. Zhu in sod. (2010) so po 72 urah izpostavitve nano-TiO₂ (v koncentraciji 1 mg/L) vodnim bolham *D. magna* z uporabo ICP-OES (optične emisijske spektroskopije z induktivno sklopljeno plazmo) ugotovili akumulacijo celokupnega titana le v telesu. V navedenih študijah so ugotavljali prisotnost celokupnega titana v celem organizmu, zato ne vemo, ali je prehajal tudi v tkiva oziroma celice.

V nekaterih študijah so ugotavljali porazdelitev titana tudi v tkivih oziroma celicah, vendar pa ga v tkivih oziroma celicah ni bilo. Galloway in sod. (2010) so po 10-dnevni izpostavitvi morskega mnogoščetinca *Arenicola marina* nano-TiO₂ v koncentraciji 3 g/kg z metodama CARS („coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy“) in TEM (presevne elektronske mikroskopije) ugotovili prisotnost agregatov nano-TiO₂ le v lumnu črevesa, niso pa opazili nanodelcev v tkivih. Lapied in sod. (2011) so po različni izpostavitvi (7 dni v vodi, koncentracij 0–100 mg TiO₂/L, 4 in 8 tednov v prsti 0–100 mg TiO₂/kg) deževnikov *Lumbricus terrestris* z uporabo metode μ XRF (rentgenske fluorescentne mikro spektroskopije) ugotovili prisotnost nano-TiO₂ le v lumnu črevesa, v tkivu pa ga niso našli. Najverjetneje je bila prisotnost nano-TiO₂ le posledica preostanka v črevesu.

Prisotnost celokupnega titana tudi v tkivih ali celicah so ugotovili Bacchetta in sod. (2011), Scown in sod. (2009) ter Jonston in sod. (2010). Bacchetta in sod. (2012) so po 96-urni izpostavitvi embrijev žab krempljičark *Xenopus laevis* nano-TiO₂ (v koncentraciji 500 mg/L) z uporabo TEM in ESI (elementne spektroskopije) ugotovili prisotnost titana v celicah črevesa. Scown in sod. (2009) so šarenkam *Oncorhynchus mykiss* intravenozno injicirali nano-TiO₂. Po 6 urah in po 21 dnevih injiciranja nano-TiO₂ so z uporabo ICP-OES ugotovili majhno prisotnost titana v tkivih ledvic, ki pa se glede na različen čas

analize ni razlikovala. Manjšo prisotnost so našli tudi v jetrih in krvi, v možganih, škrgah in vranici pa ga ni bilo. Jonston in sod. (2010) so po 14 dnevih izpostavitve šarenk *O. mykiss* nano-TiO₂ (v koncentracijah 500 in 5 000 µg/L) v vodi z uporabo CARS mikroskopije ugotovili prisotnost nano-TiO₂ v tkivu škrg.

Prisotnost celokupnega cinka v organizmih so ugotavljali v nekaj študijah, vendar pa ne izvemo, ali je prehajal tudi v tkiva oziroma celice. Hu in sod. (2010) so ugotavljali prisotnost celokupnega cinka v deževniku *E. fetida* po 7-dnevni izpostavitvi nano-ZnO v koncentraciji 5 g/kg. Z metodo ICP-AES so ugotovili le prisotnost, ne vemo pa, ali se je nahajal tudi v tkivih, zato bi bilo potrebno narediti še analizo posameznih tkiv. Croteau in sod. (2011a) so opazovali akumulacijo celokupnega cinka iz nano-ZnO in Zn ionov pri polžih *Lymnaea stagnalis* z metodo ICP-MS (masne spektroskopije). Polže so v tej študiji hranili po 3 ali 4 ure z nanodelci iz vodne raztopine ali z diatomejami (*Nitzschia palea*), ki so zaužile nanodelce (najvišja koncentracija je bila 52 000 g/kg). Ugotovili so enako dostopnost cinka ne glede na vir. Prisotnost nano-ZnO tudi v tkivih pa so potrdili Hooper in sod. (2011). Po 24-urni izpostavitvi nano-ZnO (v koncentraciji 196 mg/L) so pri deževnikih *Eisenia veneta* s SEM (vrstično elektronsko mikroskopijo) in EDX (energijsko disperzivno rentgensko spektroskopijo) ugotovili akumulacijo agregatov nano-ZnO v integumentu.

Prisotnost srebra (določitev le elementa Ag, v nekaterih primerih je ugotovljena prisotnost srebrovih ionov in/ali nanodelcev) v kopenskih in vodnih organizmih so potrdili v številnih študijah. Meyer in sod. (2010) so pri glistah *Caenorabditis elegans*, ki so bile izpostavljene koncentracijam 107 µg nano-Ag/L, z mikroskopom (citovivo/hiperspektralno analizo) opazovali privzem različnih delcev nano-Ag. Po 24 urah izpostavitve nano-Ag so ugotovili prehajanje nanodelcev v črevo. Opazili so tudi prehajanje nanodelcev v celice in njihov prenos do razvijajočih se embrijev v telesu glist. Prav tako so v drugi študiji Roh in sod. (2009) po 24-urni izpostavitvi nano-Ag v koncentraciji 0,5 mg/L pri organizmu *C. elegans* z uporabo mikroskopije („light scattering dark field microscopy“) ugotovili prehajanje nanodelcev srebra v telo.

Shoults-Wilson in sod. (2011a, b) so pri deževnikih *E. fetida* po 28-dnevni izpostavitvi nano-Ag in AgNO₃ z uporabo metode ICP-MS ugotovili večjo akumulacijo celokupnega srebra pri živalih, ki so bile izpostavljene AgNO₃, v primerjavi z živalmi, izpostavljenimi nano-Ag ekvivalentnih koncentracij (10, 100, 1 000 mg Ag/g). Akumulacija je bila

koncentracijsko odvisna v vseh primerih. V drugi študiji so Courtis in sod. (2012) po 28-dnevni izpostavitvi nano-Ag (koncentraciji $0,77 \pm 0,10 \mu\text{g/g}$) in AgNO_3 (koncentraciji $0,55 \pm 0,15 \mu\text{g/g}$) v enakem organizmu *E. fetida* z uporabo ICP-MS ugotovili akumulacijo celokupnega srebra. Na koncu poskusa je bila akumulacija višja pri organizmih, izpostavljenih nano-Ag, v primerjavi z organizmi, ki so bili izpostavljeni AgNO_3 .

Cong in sod. (2011) so pri morski strigi *Nereis diversicolor* z analizo celih živali z GFAAS po 10 dneh izpostavitve nano-Ag, mikro-Ag in AgNO_3 (v koncentraciji do $50 \mu\text{g/g}$) ugotovili, da ni razlik v akumulaciji celokupnega srebra med različnimi viri. Akumulacija se je povečevala s koncentracijo, ki so ji bile živali izpostavljene. V študiji niso razlikovali med nanodelci in ioni. V drugi študiji, prav tako pri morski strigi, pa so Garcia-Alonso in sod. (2011) po 10 dnevih izpostavitve nano-Ag v koncentraciji $250 \mu\text{g/g}$ ugotovili vstop nano-Ag v epitelij, z EDX pa so ugotovili prisotnost nanodelcev v endosomih. S subcelularno frakcionacijo so ugotovili, da se srebrovi ioni iz nano-Ag nahajajo predvsem v anorganskih granulah, organelih in toplotno denaturiranih proteinih. V primeru AgNO_3 so se ioni vezali na metalotioneine. Ti rezultati prikazujejo različne poti srebrovih ionov glede na različen vir (nanodelci, srebrovi ioni). Nanodelci srebra so v celice prehajali z endocitozo.

Pri morskih polžih so ugotavljali akumulacijo celokupnega srebra, niso pa razlikovali med nanodelci in ioni srebra. Croteau in sod. (2011b) so pri vodnem polžu *Limnea stegnalis* ugotovili podobno akumulacijo srebra ne glede na vir (srebrovi ioni, nano-Ag s citratom ali huminskimi kislinami, v koncentracijah med $0,4$ in 87 nM), vendar pa je bil privzem iz srebrovih ionov hitrejši kot privzem iz nano-Ag. Srebro se je hitreje izločilo iz živali, ki so bile izpostavljene nano-Ag. Khan in sod. (2012) so pri polžu *Peringia ulvae* po 24 urah ugotovili manjšo akumulacijo v primeru nano-Ag (v koncentraciji $200 \mu\text{g/L}$), zaradi agregacije nanodelcev pa naj bi bila zmanjšana dostopnost srebrovih ionov. Izločanje celokupnega srebra je bilo v tem primeru podobno ne glede na vir srebra. Li in sod. (2013) so pri polžu *Littorina littorea* po 5-dnevni izpostavitvi nano-Ag (koncentracije $20 \mu\text{g/L}$) in AgNO_3 (koncentracije $10 \mu\text{g/L}$) z uporabo ICP-MS ugotovili prisotnost celokupnega srebra v različnih tkivih (v ledvicah, glavi in nogi ter visceralnem tkivu). Ugotovili so nižjo akumulacijo v primeru izpostavitve organizmom nano-Ag v primerjavi z AgNO_3 . V primeru nano-Ag je bilo zelo veliko celokupnega srebra v iztrebkih. To pomeni, da je prišlo v primeru nano-Ag do majhnega odtapljanja srebrovih ionov in da se je večina srebra v obliki nano-Ag izločila iz organizmov.

Pri vodnih bolhah *D. magna* so ugotavljali akumulacijo celokupnega srebra in z uporabo AAS ugotovili njegovo prisotnost v celi živali. Zhao in sod. (2012a) so pri *D. magni* po 48-

urni izpostavitvi nano-Ag in AgNO₃ v koncentraciji 50 µg/L ugotovili prisotnost celokupnega srebra. Tudi v drugi študiji so avtorji Zhao in sod. (2012b) ugotovili prisotnost celokupnega srebra. Živali so bile v tej raziskavi do 24 ur izpostavljene nano-Ag (koncentracij 5 µg/L in 500 µg/L). Resano in sod. (2013) so na enakem organizmu ugotavljali prisotnost celokupnega srebra, ki je bila večja pri živalih, ki so bile 48 ur izpostavljene nano-Ag. Ugotavljali so tudi preživetje po izpostavitvi nano-Ag in AgNO₃. Pri živalih, izpostavljenih AgNO₃, so dobili pričakovan rezultat (LC₅₀ 3,5 µg/L), pri živalih, izpostavljenih nano-Ag, pa je bil rezultat nepričakovan, in sicer odgovor ni bil koncentracijsko odvisen (LC₅₀ je bila med 3,5 in 50 µg/L). Rezultat razlagajo s tem, da ioni in nanodelci verjetno različno vstopajo v organizem. Tudi McTeer in sod. (2013) so z uporabo ICP-MS metode po 5-dnevni izpostavitvi vodnih bolh algam, ki so bile predhodno izpostavljene nano-Ag (v koncentracijah 20, 50 in 100 µg/g), ugotovili prisotnost celokupnega srebra le v telesu vodnih bolh. V vseh teh študijah (Zhao in sod., 2012a, 2012b; Resano in sod., 2013; McTeer in sod., 2013) na vodnih bolhah ne vemo, ali je srebro prehajalo tudi v tkiva oziroma celice. V študiji Audinot in sod. (2012) so pri vodnih bolhah, ki so bile 48 ur izpostavljene nano-Ag v koncentraciji 0,1 mg/L, z uporabo metod TEM in SIMS („secondary ion mass spectrometry imaging“) ugotovili prisotnost nanodelcev srebra v sledih tudi v črevesnih celicah.

Prisotnost celokupnega srebra so ugotavljali tudi po izpostavitvi nano-Ag v različnih vrstah rib. Scown in sod. (2010) so pri šarenkah *O. mykiss*, ki so jih izpostavili nano-Ag v koncentraciji 10 µg/L in 100 µg/L ter AgNO₃ v koncentraciji 0,1 µg/L, z uporabo ICP-OES ugotovili prisotnost celokupnega srebra, in sicer v tkivih škrig in jeter, v ledvicah pa ga niso našli. V drugi študiji so v škržne celice šarenk *O. mykiss* nano-Ag prehajali le v primeru, ko so bili le-ti vezani s citratom. Farmen in sod. (2011) so pri atlantskem lososu *Salmo salar* po 48 urah izpostavitve nano-Ag in AgNO₃ v koncentraciji 100 µg/L z ICP-MS ugotovili prisotnost celokupnega srebra v tkivih škrig. Niso ugotovili, ali se akumulirajo nanodelci srebra ali srebrovi ioni, verjetno pa gre za kombinacijo obeh. Nastale so razlike v smrtnosti živali, in sicer med živalmi, ki so bile izpostavljene nano-Ag, in živalmi, izpostavljenimi AgNO₃. Laban in sod. (2009) so v tkivih embrijev črnoglavega pisanca *Pimephales promelas* z uporabo TEM ugotovili prisotnost nanodelcev srebra po 24 urah izpostavitve nano-Ag v koncentraciji 5 mg/mL. Nanodelci naj bi v notranjost embrijev vstopili prek por v membranah ali aktivno z endocitozo. Kwok in sod. (2012) so pri sladkovodni ribi *Oryzias latipes*, ki so jo za 21 dni izpostavili nano-Ag v koncentraciji 15 000 mg Ag/L, z mikroskopijo (citoviva/hiperspektralne analize) ugotovili prisotnost nanodelcev srebra v tkivih škrig, možganih in jetrih. Lopez-Serano in sod. (2013) so pri cebricah *D. rerio* po 48-urni izpostavitvi nano-Ag v koncentraciji 100 in 1 000 µg/g

s TEM/EDX ugotovili prisotnost nanodelcev srebra v celicah možganov. Lee in sod. (2007, 2012) so po izpostavitvi embrijev cebric *D. rerio* nano-Ag v koncentraciji do 166 µg/mL z mikroskopijo ugotovljali pot nanodelcev srebra in ugotovili, da nanodelci pasivno prehajajo v embrije prek horionskih kanalov.

1.5 NANODELCI UPORABLJENI V NAŠIH ŠTUDIJAH

1.5.1 Nanodelci titanovega dioksida (nano-TiO₂)

TiO₂ je naravni mineral, ki ga najdemo v treh kristalnih strukturah (anatasni, rutilni in brookitni) ter v amorfem stanju (Reyes in sod., 2008). V uporabi je že od leta 1900, in sicer predvsem kot prevleka in pigment. TiO₂ ima lahko po obdelavi tudi visoko katalitično aktivnost, zato se uporablja kot katalizator in fotokatalizator. Kot beli pigment se dodaja tudi k barvam, papirju, zobni pasti in kremam (Mueller in Nowack, 2008).

1.5.2 Nanodelci cinkovega oksida (nano-ZnO)

Cinkov oksid je bel prah in je skoraj netopen v vodi (topnost med 1,6 mg/L in 5 mg/L). Je amfoterna spojina, ki jo redko najdemo v naravi („Physical Properties of Zinc Oxide” – CAS 1314-13-2012). Nanodelci ZnO se uporabljajo zaradi ugodnih lastnosti (protibakterijskega delovanja, absorpcije UV sevanja in propustnosti za vidno svetlobo) kot dodatek k plastiki, keramiki, steklu, cementu, gumi, barvam, hrani, sončnim kremam, baterijam in mnogim drugim proizvodom (Ma in sod., 2013).

1.5.3 Nanodelci srebra (nano-Ag)

Nano-Ag je med najbolj uporabljanimi nanodelci. Uporablja se v različnih panogah, kot so medicina, tekstilna in prehrabna industrija, in sicer predvsem zaradi njegovega protibakterijskega delovanja. Najdemo ga v različnih izdelkih splošne rabe (detergentih, milih, filtrih, pralnih strojih, oblačilih, medicinskih pripomočkih ...) (Luoma, 2008).

1.6 OPIS POSKUSNE ŽIVALI – RAKA ENAKONOŽCA VRSTE *Porcellio scaber*

Modelni organizem v naših poskusih je bil kopenski rak *P. scaber* (Isopoda; Crustacea). Uvrščamo ga med višje rake valilničarje (Malacostraca: Pericarida), enakonožce (red Isopoda) in prašičke, kočiče ali mokrice (podred Oniscidea). Raki enakonožci so kozmopoliti, večina vrst živi v morju, poselili pa so tudi sladkovodne habitate in kopno. Kopenske vrste najdemo v zmerno vlažnih območjih (med lubjem, debli, kamenjem in blizu človeških bivališč, v bližini komposta). Prehranjujejo se z algami, glivami, mahom, lubjem in razpadajočim rastlinskim ali živalskim materialom. Enakonožci so dekompozitorji in imajo pomembno vlogo pri nastajanju humusa (Ruppert, 2004; Paoletti in Hassall, 1999).



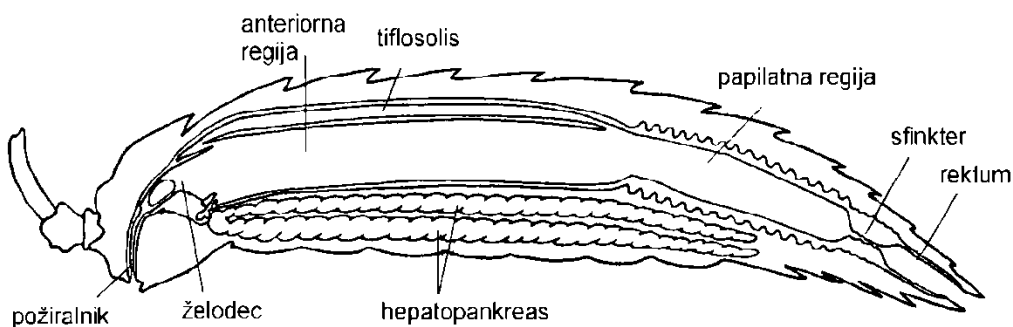
Slika 3. Navadni prašiček (*P. scaber*)

Figure 3. Common rough woodlouse (*P. scaber*)

Za enakonožce je značilen odziv na onesnaženje okolja z različnimi kovinami, in sicer z izgubo mase, smrtnostjo in upadanjem števila vrst. V različnih veziklih endosomsko-lizosomskega sistema akumulirajo težke kovine (baker, cink, železo in kadmij). Navadni prašiček, *P. scaber*, je primeren kot bioindikator zaradi velikosti, pogostosti v okolju, enostavnosti za identifikacijo in ravnanje v laboratoriju ter dobro raziskanih odzivov na kovine na različnih nivojih biološke organizacije (Drobne, 1997; Paoletti in Hassall, 1999).

1.6.2 Zgradba in delovanje prebavil raka enakonožca *P. scaber*

Prebavilo rakov enakonožcev je sestavljeno iz krajšega sprednjega in daljšega zadnjega črevesa, ki sta ektodermalnega izvora in pokrita s kutikulo. Endodermalno črevo je sestavljeno iz cevastih prebavnih žlez. Večina vrst ima po dva para cevk, nekateri tudi tri (Štrus in sod., 1995; Zimmer, 2000). Sprednje črevo je sestavljeno iz kratkega požiralnika in želodca (proventrikulus), ki leži v glavoprsju. Požiralnik je ravna cev z mišicami, ki hrani omogočajo pot do želodca. V želodcu so prisotne hitinske strukture, ki preprečujejo vračanje hrane v požiralnik in hkrati omogočajo žvečenje hrane. V tem delu sta še dva filtrirna sistema, skozi katera se hrana prefiltrira. Tekočina in majhni delci gredo v lumen prebavnih žlez, ostalo pa v anteriorni del črevesa. Imajo zadnje črevo in prebavne žleze, ki se povezujejo s posteriorno-ventralnim delom želodca. V zadnjem črevesu potekata resorpcija in transport prebavnih produktov (Wagele, 1992; Hames in Hopkin, 1989; Zimmer, 2002).



Slika 4. Shematski prikaz prebavnega sistema pri odraslem kopenskem raku enakonožcu (*Oniscus asellus*).
Levi del hepatopankreasa je zaradi boljše preglednosti odstranjen (Hames in Hopkin, 1989)

Zadnje črevo se povezuje z anteriornim delom z želodcem in se konča posteriorno z anusom. Razdeljeno je na anteriorni del z dorzalno invaginacijo (tiflosolis), posteriorni del (papilarno regijo), sfinkter in rektum (Wagele, 1992). V zadnjem črevesu poteka prebava in prevzem hranil, sodeluje pa tudi pri vodnem in ionskem ravnotežju. Pomemben del črevesa je tiflosolis iz vzdolžne gube in dveh lateralnih kanalov. Kopenskim enakonožcem omogoča recikliranje hrane in ohranjanje tekočine znotraj prebavnega trakta. Ob krčenju mišic tiflosolisa nastaneta dve cevi, po katerih potuje tekoči del prebavljene hrane iz zadnjega dela anteriorne regije v želodec, kjer se precedi skozi filtre in gre v prebavne žleze (Hames in Hopkin, 1989).

Glavna naloga papilatne regije je potiskanje prebavljene hrane in absorpcija vode skozi epiteljske celice. V rektumu se oblikujejo iztrebki, ki se izločijo skozi anus (Hames in Hopkin, 1989).

1.6.2.1 Zgradba in delovanje prebavnih žlez raka enakonožca *P. scaber*

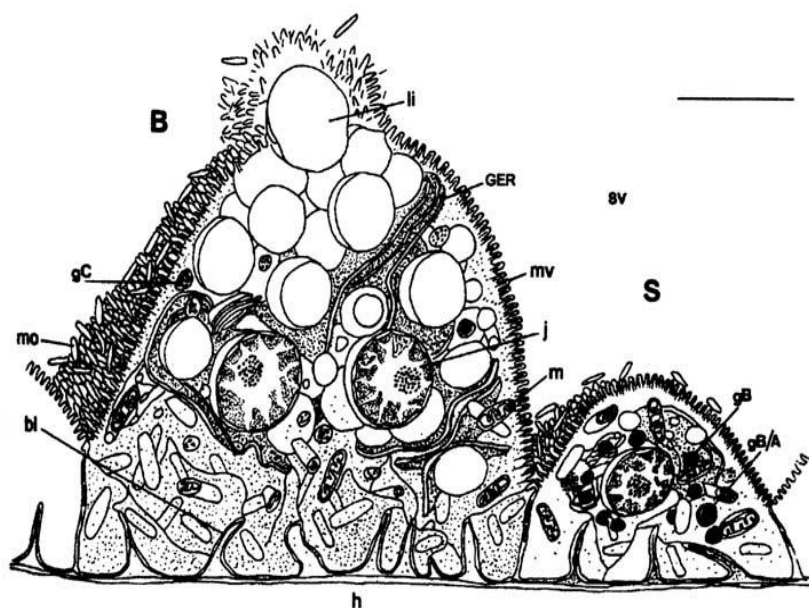
Prebavne žleze so pri raku enakonožcu *P. scaber* sestavljene iz dveh parov slepo zaprtih cevk, ki ležijo prosto v telesu. Izhajajo iz želodca in segajo do zadnjega segmenta pereona.

Enoslojni epitelij žlez je sestavljen iz dveh tipov celic:

- velikih celic, ki jih imenujejo tudi celice B,
- malih celic, ki jih imenujejo tudi celice S.

Male celice so klinasto zagozdene med dve veliki celici. Slepí konci cevk vsebujejo predvsem izvorne celice, za katere so značilne pogoste delitve. Celice so višje v distalnem delu in se nižajo proti proksimalnemu delu hepatopankreasa. Obe vrsti celic imata ovalno jedro, običajno pa imajo velike celice dve jedri. Vse celice imajo na svetlini strani mikrovile, v apikalni citoplazmi imajo mitohondrije, ER, na bazalni strani pa so invaginacije membrane povezane z mitohondriji (Hopkin, 1989; Zimmer, 2002).

Velike celice imajo vlogo sekrecije in absorpcije, v njih se skladiščijo glikogen in lipidi. Običajno imajo več lipidnih kapelj, več zrnatega endoplazemskega retikla in prostih ribosomov ter gostejšo citoplazmo kot male celice. Male celice so klinaste oblike (Hopkin, 1989; Zimmer, 2002). Za njih so značilni z membrano obdani vključki, znotrajcelične granule, ki so mesta kopičenja težkih kovin (Fe, Cu, Zn, Pb), značilno pa je tudi shranjevanje kalcija in sečne kisline (Hopkin in Martin, 1982).



Slika 5. Shematska predstavitev celice B in celice S v prebavnih žlezah enakonožca *Porcellio scaber*. GER – granularni endoplazemski retikulum; gB, gB/A in gC – različne vrste granul, v katerih se kopičijo različne kovine; h – hemocel; li – lipidna kaplja; sv – svetlina žleze; m – mitohondrij; mv – mikrovili; mo – mikroorganizem; j – jedro; bl – bazalni labirint (Hames in Hopkin, 1991)

1.6.2.2 Spremembe v celicah prebavnih žlez raka enakonožca *P. scaber*

Na spremembe strukture celic (debeline epitelija, količine lipidnih kapelj in ultrastrukture) prebavnih žlez pri rakah enakonožcih vplivajo različni dejavniki, kot so levitev, stradanje, vrsta hrane in prisotnost kovin, pesticidov ter drugih snovi v hrani (Štrus in sod., 1985, 1987, 1995; Prossi in Dallinger, 1988; Kohler in sod., 1996; Drobne, 1997; Štrus in Blejec, 2001; Žnidaršič in sod., 2003; Tarnavska in sod., 2007; Lešer in sod., 2008).

Kohler in sod. (1996) so pri *P. scaber* preučevali vpliv kovin na spremembe v celicah prebavnih žlez. Živali so se tri tedne prehranjevale s hrano z višjo koncentracijo kadmija (57,3–418,6 mg kadmija/kg hrane), svinca (7,1–7 676 mg svinca/kg hrane) ali cinka (4,0–22 052,3 mg cinka/kg hrane). Pri vseh treh skupinah živali, ki so se prehranjevale s kovinami, so ugotovili podobne značilnosti v celicah prebavnih žlez: uničenje in razgradnjo mikrovilov, kondenzacijo citoplazme, zmanjšanje števila organelov, pojavljanje večjega števila mielinskih struktur in granul B v celicah S, cisterne GER v paralelnih in koncentričnih skladovnicah v celicah B, mrežast kromatin, zmanjšanje količine lipidnih kapelj in akumulacijo elektronsko gostega materiala v veziklih.

Žnidaršič in sod. (2003) so po 5 tednih prehranjevanja s hrano z višjo koncentracijo cinka (1 070–1 950 μg cinka/g hrane) ali kadmija (52–300 μg kadmija/g hrane) pri *P. scaber* opazovali ultrastrukturo celic prebavnih žlez. Ugotovili so naslednje značilnosti: razpadle ploščate celice pri tretjini živali, zmanjšanje lipidnih kapelj, redukcija glikogena, elektronsko gosta citoplazma, razpad mikrovilov, GER v obliki veziklov in razširjenih cistern, diktiosomi v obliki veziklov, dolgi in razvejani mitohondriji, nekateri elektronsko prosojni in nekateri z manj kristami, z membrano obdani vključki ter več drobnih elektronsko gostih depozitov.

Tarnawska in sod. (2007) so preučevali vpliv niklja na *P. scaber*. Po 24-tedenskem poskusu, v okviru katerega so živali jedle hrano s povišano koncentracijo niklja (10–1 000 mg Ni/L), so glede na kontrolne živali ugotovili naslednje spremembe in značilnosti v celicah prebavnih žlez: GER v obliki majhnih veziklov, več mielinskih struktur in granul, spremembe v obliki mikrovilov ter prisotnost lizosomov.

1.6.2.3 Kopičenje kovin v celicah prebavnih žlez raka enakonožca *P. scaber*

V celicah prebavnih žlez se kopičijo kovine v dveh glavnih tipih intracelularnih granul. V celicah S najdemo granule B, ki vsebujejo baker, žveplo in malo kalcija. Imenujemo jih tudi bakrove granule ter pri živalih z onesnaženih območij lahko vsebujejo tudi cink, kadmij in svinec (Hopkin 1989, 1989, 1990). Pri živalih, hranjenih z nanodelci srebra, smo z uporabo metod mikro-PIXE (metoda protonsko vzbujenih rentgenskih žarkov) in TEM/EDX v teh granulah našli srebro (Tkalec in sod., 2011). V celicah B najdemo granule C, ki vsebujejo železo in jih imenujemo tudi železove granule. Pri živalih z onesnaženih območij najdemo v teh granulah tudi cink in svinec (Hopkin, 1989, 1990).

Granule v celicah B se sproščajo med prebavnim ciklom, ko veliko teh celic razpade. Material v granulah v celicah S pa ostane v živali, saj so celice S stalne in ne sproščajo vsebine v lumen žleze (Hopkin, 1990).

Tarnawska in sod. (2007) so v 24-tedenskih poskusih živali *P. scaber* hranili s hrano s povišano koncentracijo niklja (10–1 000 mg Ni/L). Z uporabo mikro-PIXE metode so ugotovili akumulacijo niklja (3 $\mu\text{g/g}$ do 840 $\mu\text{g/g}$) v celicah prebavnih žlez, odvisno od koncentracije. Nikelj je bil razporejen neenakomerno v obliki majhnih agregatov, ugotovili pa so ujemanje z razporeditvijo železa.

1.6.1.4 Vpliv nano-TiO₂, nano-ZnO in nano-Ag na raka enakonožca *P. scaber*

Jemec in sod. (2008) so preučevali vpliv nano-TiO₂ na *P. scaber*. Po 3-dnevni izpostavitvi živali hrani, ki je vsebovala 3 000 µg/g, in po 14-dnevni izpostavitvi hrani s 1 000 µg/g niso ugotovili nobenih sprememb v preživetju živali, spremembi mase ali prehranjevanju živali. Valant in sod. (2012) prav tako niso ugotovili sprememb v preživetju, masi ali prehranjevanju živali. V njihovem primeru so se živali *P. scaber* prehranjevale 7 dni s hrano, ki je vsebovala 2 000 µg/g nano-TiO₂. Ugotovili so, da se membrana destabilizira že po 3 dneh izpostavitve (koncentracije 1 000 µg/g) in da koncentracija 1 000 µg/g po 7 dnevih povzroči lipidno peroksidacijo. Novak in sod. (2012) po 14-dnevnem prehranjevalnem poskusu z nano-TiO₂ prav tako niso ugotovili sprememb v prehranjevanju, spremembi mase in smrtnosti pri *P. scaber*, opazili pa so destabilizacijo membrane pri 30 % živali, ki so bile hranjene s hrano s 3 000 in 5 000 µg/g nano-TiO₂. Z mikro-PIXE analizo so ugotovili tudi prisotnost titana v celicah prebavnih žlez le pri najvišji koncentraciji in samo v primeru destabilizacije membrane.

Pipan Tkalec in sod. (2010) so po 28-dnevni izpostavitvi nano-ZnO ali ZnCl₂ (koncentracij 2 000 in 5 000 µg/g) v kopenskih enakonožcih *P. scaber* z uporabo AAS (atomske absorpcijske spektrofotometrije) ugotovili, da ni razlik v celokupni koncentraciji cinka v telesu med živalmi, ki so se hranile z različnimi oblikami cinka. Stopnja prehranjevanja se ni spremenila v nobeni skupini živali, opazili so le večjo učinkovitost asimilacije pri skupini ZnCl₂ v koncentraciji 5 000 µg/g hrane.

Tkalec in sod. (2011) so po 14-dnevni izpostavitvi živali *P. scaber* nano-Ag v koncentraciji 5 000 µg/g ugotovili, da le-ta koncentracija ne vpliva na prehranjevanje, preživetje ali maso živali. Z mikro-PIXE analizo so ugotovili prisotnost srebra v celicah prebavnih žlez pri živalih, ki so jedle hrano z nano-Ag.

1.7 NAMEN IN HIPOTEZE DOKTORSKE NALOGE

V doktorski disertaciji smo preučevali različne nanodelce (TiO_2 , ZnO in Ag), ki so v današnjem času najpogostejši v izdelkih splošne rabe. Vse študije so bile izvedene na modelnem organizmu, tj. kopenskem raku enakonožcu vrste *P. scaber* (Isopoda; Crustacea).

Namen doktorske naloge je ugotoviti učinke zaužitih nanodelcev na ultrastrukturne spremembe v celicah prebavnih žlez pri kopenskih rakih enakonožcih vrste *P. scaber* v primerjavi s kontrolnimi živalmi. Ugotoviti želimo tudi kopičenje zaužitih delcev v prebavnih žlezah ali organizmu in razlike med različnimi nanodelci ob enaki zaužiti količini delcev. Ugotoviti želimo tudi, ali gre za kvarno delovanje nanodelcev ali za aktivacijo metabolizma in ali je prišlo do nano-specifičnega učinka na ciljna tkiva pri modelnem organizmu.

Naše hipoteze so:

- Zaužiti nanodelci prehajajo v celice prebavnih žlez v obliki nanodelcev in/ali ionov.
- Zaužiti nanodelci povzročajo spremembe v strukturi celic prebavnih žlez, ker pridejo ob zaužitju v neposreden stik z njimi.
- Spremembe v strukturi celic prebavnih žlez so podobne tistim, ki nastanejo zaradi stresa ali stradanja; pričakujemo pa tudi nano-specifične spremembe.

Z našim delom bomo prispevali k razumevanju delovanja zaužitih nanodelcev na strukturo celic prebavnih žlez pri kopenskem raku enakonožcu *P. scaber*. Učinek smo ugotavljali z uporabo različnih mikroskopskih tehnik (svetlobne in preseвне elektronske mikroskopije) in analitskih postopkov za ugotavljanje kopičenja kovin v preiskovanih tkivih.

Naši rezultati bodo v pomoč nadaljnjim raziskavam na področju interakcij med nanodelci in celicami prebavnih žlez. S tem želimo prispevati k nadzorovani uporabi nanodelcev.

2. METODE IN MATERIALI

2.1 SEZNAM KEMIKALIJ

Natrijev klorid, magnezijev klorid, cinkov klorid, kakodilatni pufer, fosfatni pufer in glukozo smo kupili pri proizvajalcu Merck (Nemčija), lutaraldehid, paraformaldehid, osmijev tetroksid pa pri proizvajalcu SPI Supplies (ZDA). Agar 100 smo kupili pri proizvajalcu Agar Scientific (Združeno kraljestvo). Ksilen, paraplant Plus in agregate nanodelcev v prahu (nano-TiO₂, nano-ZnO, nano-Ag) smo kupili pri proizvajalcu Sigma-Aldrich (Združeno kraljestvo).

Značilnosti nano-TiO₂, ki jih je navedel proizvajalec, so bile: nanoprah, anatazna kristalna struktura, velikost delca < 25 nm, specifična površina med 200 in 220 m²/g.

Značilnosti nano-ZnO, ki jih je navedel proizvajalec, so bile: povprečna velikost delca < 100 nm v premeru, specifična površina med 15 in 25 m²/g.

Značilnosti nano-Ag, ki jih je navedel proizvajalec, so bile: čistost 99, povprečna velikost delca < 100 nm, specifična površina 5,0 m²/g.

2.2 KARAKTERIZACIJA NANODELCEV UPORABLJENIH V NAŠIH POSKUSIH

Karakterizacija nanodelcev (nano-TiO₂, nano-ZnO in nano-Ag) je bila opravljena na prahu nanodelcev ali v suspenziji nanodelcev v destilirani vodi. Suspenzijo nanodelcev v destilirani vodi smo pripravili tako kot suspenzijo, ki smo jo nanašali na liste v poskusih z raki enakonožci (opis v oddelku 2.3.2, Priprava hrane in poskusov *in vivo*).

Za pregledovanje nanodelcev s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM) smo disperzijo agregatov nanodelcev (koncentracije 0,66 mg/mL v destilirani vodi) nanесли na bakrovo mrežico, ki je bila prevlečena s folijo. Nanodelce na mrežici smo posušili in pregledali z mikroskopoma TEM (Philips CM 100 TEM, Oddelek za Biologijo, Univerza v Ljubljani) in TEM/EDX (Jeol 2010F, Institut Jožef Stefan, Ljubljana). S tem smo dobili podatke o velikosti in obliki nanodelcev ter elementno sestavo v disperziji.

Nanodelce smo pregledali tudi z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), da bi dobili podatke o velikosti in obliki nanodelcev ter njihovih agregatov. Agregate nanodelcev v prahu smo nanесли na zgornjo površino ogljikovega nosilca, ki smo ga pritrdili na aluminijast nosilec in takoj pregledali s SEM (Jeol JSM-6500F, Inštitut za material in tehnologije, Ljubljana).

Velikost agregatov nanodelcev v destilirani vodi smo merili s 3D-DLS-SLS spektrometrom (LS Instruments, Fribourg, Švica). Metoda omogoča določanje velikosti hidrodinamskih radijev suspendiranih delcev z uporabo HeNe laserja pri valovni dolžini 632,8 nm in merjenjem sipanja žarkov pod kotom 90°.

Prah nanodelcev nano-TiO₂ in nano-ZnO smo pregledali z Braunauer-Emmet-Tellerjevo metodo (BET). Pri tej metodi se analizira in meri specifična površina delcev, in sicer se ti pred analizo z aparaturo Tristar 3000 (Micrometrics Co., Norcross, GA, ZDA) posušijo ter razplinijo z dušikom.

Prah nanodelcev nano-TiO₂ in nano-Ag smo preučevali in mu določali kristalno strukturo z metodo rentgenske praškovne difrakcije (XRD). Uporabili smo defraktometer Bruker AXS D4 Endeavor (Karlsruhe, Nemčija), ki uporablja rentgensko črto Cu-K α 1 in detektor Sol-X. Pri nanodelcih nano-TiO₂ je meritev potekala v območju kotov med 20° in 80°, s korakom 0,04° med posameznimi meritvami in s časom zajema posamezne meritve 3 s. Pri nanodelcih nano-Ag je meritev potekala v območju kotov med 6° in 73°, s korakom 0,04° med posameznimi meritvami in časom zajema posamezne meritve 4 s.

2.3 IN VIVO POSKUSI Z MODELNIM ORGANIZMOM *P. scaber*

2.3.1 Poskusne živali

Kopenske rake enakonožce (*P. scaber*) smo nabrali na neonesnaženem območju v bližini Celja v Sloveniji. Pred poskusom so bile živali v steklenem terariju, napolnjenem z 2–5 cm debelo zemljo in suhimi listi leske (*Corylus avellana*). Kulturo z živalmi smo hranili več kot mesec dni v nadzorovanih laboratorijskih razmerah (pri sobni temperaturi 20 ± 2 °C, naravnem svetlobnem ciklu (16 ur svetlobe in 8 ur teme) ter visoki vlagi). Za poskuse smo izbrali odrasle živali *P. scaber*, obeh spolov in v različnih levitvenih fazah. Njihova masa je bila od 30 do 70 mg.

Ob začetku vsakega poskusa smo analizirali tudi fiziološko stanje živali, ugotavljali smo debelino epitelija in količino lipidnih kapelj v celicah B prebavnih žlez živali iz terarija. Tako smo želeli oceniti stanje živali pred poskusom (Jemec in sod., 2012). Živali smo pripravili za svetlobno in presevno elektronsko mikroskopijo ter pregledali epitelij teh živali (debelino epitelija, količino lipidov in ultrastrukturo celic prebavnih žlez), in sicer enako kot pri živalih iz poskusov z nanodelci.

2.3.2 Priprava hrane in poskusov *in vivo*

Za prehranjevalne poskuse smo uporabili plastične petrijevke, ki smo jih ustrezno označili. Pripravili smo suspenzije posameznih nanodelcev TiO₂, ZnO in Ag ter suspenzijo ZnCl₂ (Sigma-Aldrich, ZDA) v destilirani vodi. Nato smo suspenzije nanodelcev določenih koncentracij razmazali s čopičem na spodnjo stran 100 mg lista. Končne koncentracije nanodelcev, ki smo jih nanесли na liste, so bile različne, in sicer sta bili pri poskusih z nano-TiO₂ in nano-Ag 1 000 in 5 000 µg/g suhe teže lista, pri poskusih z nano-ZnO/ZnCl₂ pa 2 000 in 5 000 µg/g suhe teže lista (preglednica 1). Kontrolne skupine smo namazali na enak način z destilirano vodo (dH₂O). Posušene liste smo razrezali na štiri približno enake dele in jih znotraj posamezne skupine premešali. V vsako petrijevko smo dali po 4 različne kose listov, ki so skupaj tehtali po 100 ± 15 mg.

2.3.3 Potek poskusov *in vivo*

V vsako petrijevko s štirimi listi smo dali po eno žival. Ustrezno navlažene petrijevke smo dali v terarij, ki smo ga hranili v času 14-dnevnega poskusa pod nadzorovanimi laboratorijskimi razmerami (pri sobni temperaturi 20 ± 2 °C, naravnem svetlobnem ciklu (16 ur svetlobe in 8 ur teme) ter visoki vlagi), ki so bile enake razmeram, v katerih smo živali hranili pred poskusom. Le v primeru AAS analize (z nano-ZnO in ZnCl₂) smo izvedli 28-dnevni poskus. Vse razmere so bile enake kot pri 14-dnevnem poskusu. Število živali v skupinah, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam, se je razlikovalo glede na tip analiz, ki so bile izvedene na koncu poskusa.

Iz živali smo po 14 dnevih hranjenja (oziroma po 28 dnevih) z različnimi nanodelci izolirali prebavne žleze ter jih ustrezno pripravili za nadaljnje analize in merjenja (preglednica 1).

Preglednica 1. Poskusi s *P. scaber*, ki so bili hranjeni z nanodelci ali ZnCl₂ (končne koncentracije testiranih nanodelcev in ZnCl₂ (+ parametri so bili analizirani, – parametri niso bili analiziran)

Table 1. Experiments with *P. scaber* which were feeding with various nanoparticles and ZnCl₂ (final exposure concentrations of nanoparticles and ZnCl₂ (+ parameters were analyzed, – parameters were not analyzed)

| Parametri Poskusi (koncentracije nanodelcev in ZnCl ₂ (µg/g hrane)) | Vrednotenje na nivoju organizma (masa, smrtnost, prehranjevanje) | Vrednotenje na histološkem nivoju celic B prebavnih žlez (epitelij, lipidi, ocena fiziološkega stanja živali) | Vrednotenje na nivoju ultrastrukture celic B in S prebavnih žlez | Meritve AAS (akumulacija elementov v organizmu) | Meritve micro-PIXE (razporeditev elementov v celicah B in S prebavnih žlez) |
|--|--|--|--|---|---|
| Trajanje poskusa | 14 dni | 14 dni | 14 dni | 28 dni | 14 dni |
| Poskusi nano-TiO ₂ (0, 1 000, 5 000) | + | + | + | - | + |
| | (1.,2.,3.,4. poskus) | (3.,4.,6. poskus) | (6. poskus) | | (6. poskus) |
| Poskusi nano-ZnO in ZnCl ₂ (0, 2 000, 5 000) | + | + | + | + | - |
| | (7. poskus) | (7. poskus) | (7. poskus) | (12. poskus) | |
| Poskusi nano-Ag (0, 1 000, 5 000) | + | + | + | - | + |
| | (9.,31. poskus) | (9.,31. poskus) | (9. poskus) | | (9. poskus) |

2.4 OPAZOVANJE PREHRANJEVANJA, SPREMEMBE MASE IN PREŽIVETJA

V obdobju trajanja 14-dnevnih poskusov smo pri vsaki živali pobirali iztrebke, in sicer 5., 10. in 14. dan. Iztrebke smo posušili ter jih po 24 urah prešteli in stehtali. Po 14 dneh poskusa smo preostanek listov v petrijevki posušili na sobni temperaturi in po 24 urah stehtali. Izračunali smo stopnjo prehranjevanja (masa lista, ki ga je žival pojedla/suho težo živali/dan) in spremembo mase živali (razlika med maso na začetku poskusa in maso na koncu poskusa).

2.5 PRIPRAVA PREBAVNIH ŽLEZ ZA MIKROSKOPSKO ANALIZO

Živali smo žrtvovali dopoldan. Živalim smo odrezali glavo in v fiziološki raztopini izolirali prebavne žleze ter jih dali v ustrezen fiksativ. Eno ali dve cevki smo pripravili za analizo s

presevnim elektronskim mikroskopom (TEM). Ultrastrukturo celic prebavnih žlez smo primerjali med različnimi živalmi vedno v medianem delu, in sicer zaradi razlik v strukturi celic v različnih predelih žleznega epitelijskega (Bettica in sod., 1984). Ultratankih rezin nismo kontrastirali zaradi lažje detekcije nanodelcev, ki bi se lahko kopičili v celicah prebavnih žlez. Iz poskusov smo nekatere prebavne žleze pripravili za svetlobni mikroskop. V tem primeru smo prebavno žlezo fiksirali v fiksativu Carnoy in pozneje vklopili v paraplast (glej oddelek 2.5.2(B)).

2.5.1 Priprava prebavnih žlez za presevno elektronsko mikroskopijo

Prebavne žleze živali iz poskusov z nano-TiO₂ in nano-ZnO smo pripravili po naslednjem postopku: a) fiksacija v 1,0-odstotnem glutaraldehidu in 0,4-odstotnem paraformaldehidu v 0,1 M Na-kakodilatnem pufu (2 h), b) spiranje v 0,1 M Na-kakodilatnem pufu (3 x 10 min), c) postfiksacija v 1 % OsO₄ v Na-kakodilatnem pufu (1 h), d) spiranje v 0,1 M Na-kakodilatnem pufu (3 x 10 min), e) dehidracija v C₂H₅OH (30 % 10 min, 50 % 10 min, 70 % 10 min, 80 % 10 min, 90 % 10 min, 100 % 2 x 10 min, 100 %: aceton 10 min, aceton 3 x 10 min), f) vklapljanje v smolo agar 100 (Agar 100 resin kit, Agar scientific, Stansted, Združeno kraljestvo) aceton: agar (2 h), agar (1 h), agar (24 h), agar (1 h), g) prenos vzorcev v ploščate modelčke za polimerizacijo, h) polimerizacija; 65° (24 h), i) izdelava ultratankih rezin; Reichert ultracut S, diamantni nož Diatome, j) pregledovanje vzorcev s presevnim elektronskim mikroskopom (Philips CM 100 TEM) in dokumentiranje rezultatov s fotografiranjem s kamero Bioscan 792 (Gatan, Združeno kraljestvo).

Prebavne žleze poskusa nano-Ag so bile pripravljene na naslednji način: a) fiksacija v 3,5-odstotnem glutaraldehidu v 0,1 M Na-fosfatnem pufu (Sørensen) (2 h), b) spiranje v 0,1 M Na-fosfatnem pufu (3 x 10 min), c) postfiksacija v 1 % OsO₄ v fosfatnem pufu (1 h), d) spiranje v 0,1 M Na-fosfatnem pufu (3 x 10 min), e) dehidracija v C₂H₅OH 30 % (10 min, 50 % 10 min, 70 % 10 min, 80 % 10 min, 90 % 10 min, 100 % 2 x 10 min, 100 %: aceton 10 min, aceton 3 x 10 min), f) vklapljanje v smolo agar 100 (Agar 100 resin kit, Agar scientific, Stansted, Združeno kraljestvo) aceton: agar (2 h), agar (1 h), agar (24 h), agar (1 h), g) prenos vzorcev v ploščate modelčke za polimerizacijo, h) polimerizacija; 65° (24 h), i) izdelava ultratankih rezin; Reichert ultracut S, diamantni nož Diatome, j) pregledovanje vzorcev s presevnim elektronskim mikroskopom (Philips CM 100 TEM) in dokumentiranje rezultatov s fotografiranjem s kamero Bioscan 792 (Gatan, Združeno kraljestvo).

2.5.2 Priprava prebavnih žlez za svetlobno mikroskopijo

Žleze smo pripravili po naslednjih dveh postopkih:

A) poltanke rezine: a)–h), glej oddelek 2.5.1(i)) izdelava poltankih rezin debeline 0,1 do 1 μm s steklenim nožem, j) barvanje z Azur II.-metilen modrim barvilom (Robinson s sod., 1987), k) pregledovanje poltankih rezin s svetlobnim mikroskopom (Axioimager.Z1 light microscope (Zeiss));

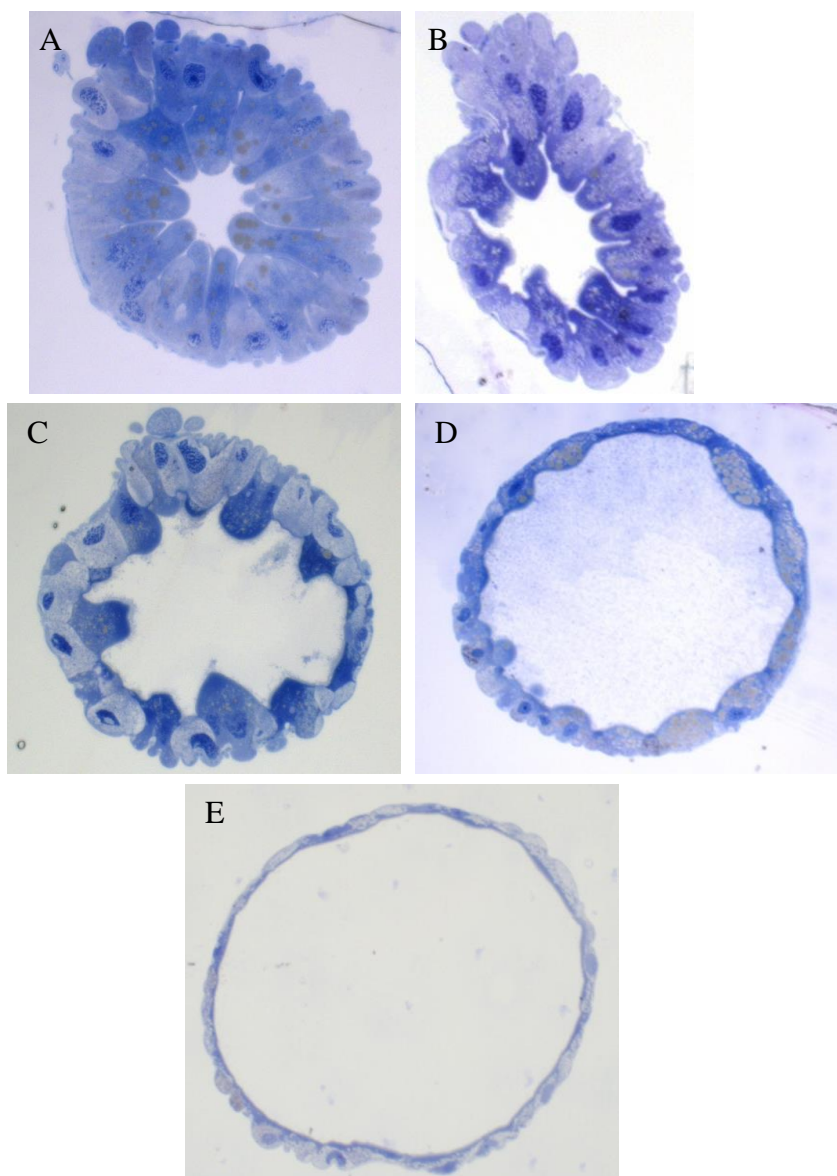
B) histološke rezine: a) fiksacija v fiksativu Carnoy (2 h), b) dehidracija, spiranje, c) prepojitev s ksilenom, d) vklapljanje v Paraplast Plus wax (Sigma), e) izdelava blokov, f) priprava histoloških rezin debeline 8 μm ; Reichert-Jung 2040, g) prepojitev s ksilenom, h) rehidracija, i) barvanje z eozinom, j) dehidracija, k) prepojitev s ksilenom, l) vklapljanje v kanadski balzam, m) pregledovanje histoloških rezin s svetlobnim mikroskopom (Axioimager.Z1 light microscope (Zeiss)).

2.6. VREDNOTENJE DEBELINE EPITELIJA IN KOLIČINE LIPIDNIH KAPELJ V CELICAH B PREBAVNIH ŽLEZ

Za oceno debeline epitelijskega sloja in količine lipidnih kapelj v celicah B smo določili 6 delov enake dolžine od proksimalnega do distalnega dela žlezne cevke. V vsakem delu smo izbrali po štiri med seboj enako oddaljene histološke rezine in jih analizirali. Distalne in proksimalne dele smo izločili iz nadaljnje analize, ker je proksimalni del pogosto poškodovan med sekcijo, distalni del pa je zgrajen iz embrionalnih celic, zato je ta del nepomemben za analizo morfoloških značilnosti (Jemec in sod., 2012). Na histoloških vzorcih smo na koncu analizirali po 16 rezin na eno žlezno cevko, na vzorcih, pripravljenih za ultrastrukturno opazovanje, pa smo analizirali 6 rezin v medianem delu na eno žlezno cevko. Na podlagi prejšnjih študij (Lešer in sod., 2008) smo ugotovili, da ni bistvenih razlik med cevkami iste živali, zato smo pri vsaki živali analizirali le po eno cevko. Ostale cevke prebavne žleze smo uporabili v drugih analizah.

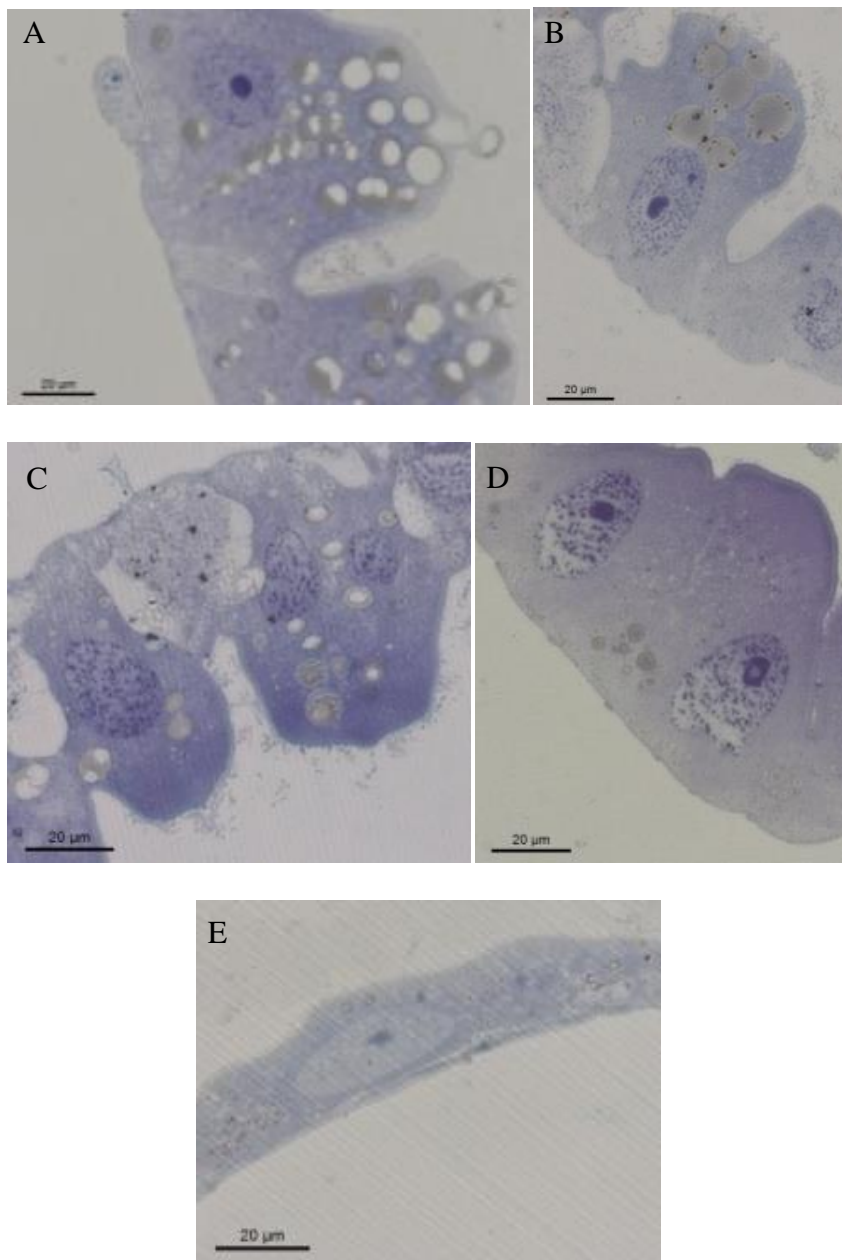
Debelino epitelijskega sloja smo določali na histoloških preparatih z uporabo svetlobnega mikroskopa Axioimager.Z1 light microscope (Zeiss) na podlagi oblike in velikosti celic B. Določili smo 5 razredov glede na debelino in obliko celic B (Jemec in sod., 2012): (5) velike kupulaste celice B (> 90 μm), (4) velike kupulaste celice B s posameznimi piramidnimi ali rahlo sploščenimi celicami B (80 μm), (3) celice B piramidne oblike ali rahlo sploščene (60 μm), (2) ploščate celice B s posameznimi celicami piramidne oblike ali

rahlo sploščene celice B (50 μm), (1) ploščate celice B (< 40 μm) (slika 6(A)–(E)). Prav tako smo določili 5 razredov za različno količino lipidov v celicah: (5) zelo veliko, (4) veliko, (3) srednje, (2) malo, (1) zelo malo (slika 7(A)–(E)).



Slika 6. Debelina epitelija celic prebavnih žlez; (A) velike kupulaste celice B (> 90 μm) predstavljajo 5. razred, (B) velike kupulaste celice B s posameznimi piramidnimi ali rahlo sploščenimi celicami B (80 μm) 4. razred, (C) piramidne oblike ali rahlo sploščene celice B (60 μm) 3. razred, (D) ploščate celice B s posameznimi celicami piramidne oblike ali rahlo sploščene celice B (50 μm) 2. razred, (E) ploščate celice B (< 40 μm) 1. Razred

Figure 6. Epithelial thickness of digestive gland cells; (A) large dome-shaped B cells (> 90 μm) of class 5, (B) large dome-shaped B cells with several pyramidal-shaped or slightly flat B cells (80 μm) of class 4, (C) pyramidal-shaped B cells or slightly flat B cells (60 μm) of class 3, (D) flat B cells with some pyramidal-shaped B cells or slightly flat B cells (50 μm) of class 2, (E) flat B cells (< 40 μm) of class 1



Slika 7. Količina lipidnih kapelj v celicah B prebavne žleze pri *P. scaber*; (A) zelo veliko lipidnih kapelj predstavlja 5. razred, (B) veliko lipidnih kapelj predstavlja 4. razred, (C) srednje veliko lipidnih kapelj predstavlja 3. razred, (D) malo lipidnih kapelj predstavlja 2. razred, (E) zelo malo lipidnih kapelj predstavlja 1. razred

Figure 7. Abundance of lipid droplets in the B cells of the *P. scaber* digestive gland tube was classified as (A) very high in class 5, (B) high in class 4, (C) moderate in class 3, (D) low in class 2, (E) sparse lipid droplets in class 1

2.7. VREDNOTENJE FIZIOLOŠKEGA STANJA ORGANIZMA *P. scaber*

Na podlagi debeline epitelija in količine lipidnih kapelj v celicah B prebavnih žlez smo živali razdelili na tri različne skupine: NS – živali, ki niso bile pod stresom, SS – živali, ki so bile pod srednjim stresom, in S – živali, ki so bile pod stresom (Jemec in sod., 2012). Živali, ki niso bile pod stresom, so imele debelino epitelija ocenjeno s 4 ali 5, količino lipidnih kapelj pa s 3, 4 ali 5; živali pod srednjim stresom so imele debelino epitelija ocenjeno s 3, 4 ali 5, količino lipidnih kapelj pa z 1 ali 2 oziroma debelino epitelija 3 in količino lipidnih kapelj 3, 4 ali 5; živali pod stresom so imele debelino epitelija ocenjeno z 1 ali 2, količino lipidnih kapelj pa z 1–5.

2.8 VREDNOTENJE ULTRASTRUKTURE EPITELIJA PREBAVNIH ŽLEZ

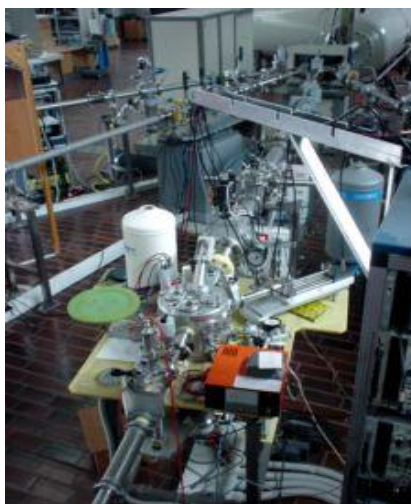
Ultrastrukturne karakteristike celic prebavnih žlez pri *P. scaber* smo vrednotili v medianem delu prebavne žleze. S svetlobnim mikroskopom smo pregledali po 6 poltankih rezin na eno žlezno cevko posamezne živali, z elektronskim mikroskopom TEM pa smo pregledali po 1 ali 2 ultratanki rezini, in sicer smo analizirali ultrastrukturne značilnosti ter pregledali v povprečju 10 celic B in 10 celic S na posamezni žlezni cevki *P. scaber*. Značilnosti v celicah prebavnih žlez živali, ki so se prehranjevale z različnimi nanodelci ali $ZnCl_2$, smo primerjali z značilnostmi v celicah živali iz kontrolnih skupin (opazovali smo predvsem mikrovile, GER, lamelarna telesa, citoplazmo, mitohondrije, jedrni ovoj in jedro ter prisotnost elektronsko gostih depozitov na plazmalemi in v veziklih). Značilnosti v celicah smo vrednotili z naslednjimi ocenami: – značilnosti nismo opazili, + značilnost smo opazili redko, ++ značilnost smo opazili pogosto, +++ značilnost smo opazili skoraj vedno.

2.9 PRIPRAVA VZORCEV ZA ANALIZO ELEMENTOV

2.9.1 Priprava prebavnih žlez za analizo z mikro-PIXE (metoda protonsko vzbujenih rentgenskih žarkov)

Za analizo z mikro-PIXE smo prebavne žleze po izolaciji iz živali hitro zmrznili s tekočim dušikom ($-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) v posebnem mediju (Jung Tissue Freezing Medium, Leica). Vzorce smo nato razrezali pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ s kriomikrotomom (Leica CM3050 cryotome, Bensheim, Nemčija) na $60\text{ }\mu\text{m}$ debele rezine. Rezine smo dali v ohlajene aluminijeve nosilce in jih zmrznjene prenesli v liofilizer (alpha 2-4 Christ freeze dryer), kjer smo jih zmrznjene sušili

24 ur pri 30 °C in tlaku 0,4 mbar. Suhe rezine prebavnih žlez smo dali na prozorno folijo (pioloform) med dva aluminijasta nosilčka. Analize in meritve teh vzorcev smo opravili na Mikroanalitskem centru Instituta Jožef Stefan v Ljubljani z inštrumentom PIXE.



Slika 8. Inštrument PIXE (vir: http://www.rcp.ijs.si/mic/our_work/applications/environment/pixe-method.jpg)

V našem primeru smo za mikro-PIXE analizo uporabili par detektorjev x-žarkov, ki sta zaznala energijo žarkov od 1 keV do 40 keV. Germanijev detektor x-žarkov, nameščen na 135° glede na smer žarka, je zaznal x-žarke energije med 4 keV in 40 keV ter Ag K α in K β linije pri 22,10 keV in 24,99 keV (površina 95 mm²; berilijevo okno, 25 μ m debelo; poliimidski absorber, 100 μ m debel). Nizke energije x-žarkov med 0,8 keV in 4 keV je zaznal Si(Li) detektor (površina 10 mm²) pri 125° glede na žarek. Meritve in ostale podrobnosti glede kvantifikacije elementov v vzorcu so bile opisane v člankih (Vogel-Mikuš in sod., 2007, 2008, 2008a).

2.9.2 Priprava prebavnih žlez za analizo s TEM/EDX (energijsko disperzivno rentgensko spektroskopijo)

V poskusu z nano-Ag smo nekaj prebavnih žlez živali analizirali z metodo TEM/EDX. Pripravili smo jih tako kot za TEM (glej oddelek 2.5.1, Priprava prebavnih žlez za presevno elektronsko mikroskopijo) razrezali z diamantnim nožem in ultratanke rezine postavili na mrežico, prevlečeno z ogljikovo folijo („copper grids coated with holey carbon“), ter jih nato pregledali na presevnem elektronskem mikroskopu na Institutu Jožef

Stefan v Ljubljani (200 keV Jeol 2010F z EDX analizo – Oxford instruments ISIS 300 EDXS).

2.9.3 Priprava živali *P. scaber* za analizo z AAS (atomska absorpcijsko spektroskopijo)

Po 4-tedenskem poskusu z nano-ZnO in ZnCl₂ smo živali prestavili v druge petrijevke s čistimi/netretiranimi listi. Po 24 urah smo cele živali prestavili v epice in jih dali v zmrzovalnik. Pred analizo smo živali liofilizirali, jih dali v eksikator za najmanj 24 ur in jih nato še stehali. Težo vzorcev smo pozneje uporabili za nadaljnje izračune. Celotno vsebino epic smo prenesli v steklene epruvete in dodali po 1 ml 75 % HNO₃ in 60 % HClO₄ v razmerju 7 : 1. Epruvete smo postavili v grelni blok in naredili razklop po naslednji shemi:

- a) 30 min pri 40 °C,
- b) 30 min pri 65 °C,
- c) 60 min pri 85 °C (dokler se tekočina ne zbistri),
- d) 60 min pri 105 °C,
- e) 60 min pri 125 °C,
- f) 60 min pri 160 °C (dokler se tekočina ne razbarva),
- g) do suhosti (tj. čez noč do naslednjega dne) pri 185 °C.

Naslednji dan smo epruvete v primeru pojava kondenza sušili še 2–3 ure. Suhe in hladne epruvete z razklopljenimi vzorci smo postavili na stojalo, jih zaščitili s plastično folijo in jih do analize hranili v laboratoriju pri sobni temperaturi.

Analizo živali smo izvedli z atomskim absorpcijskim spektrometrom tipa Perkin-Elmer AAnalyst100 in programsko opremo AAWinLab 3.0 za Windows NT Workstation 4.0 (Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo). Za umerjanje aparata smo uporabili standarde z Zn²⁺ ioni v koncentracijah 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 0,75 mg/L in 1 mg/L. Pri meritvah smo pripravili tudi po 4 „prazne“ vzorce. Če je bila koncentracija posameznega vzorca previsoka, da bi omogočala analizo znotraj linearnega območja, smo vzorec redčili z 0,2 % HNO₃ do primerno nizke koncentracije. Redčitve smo upoštevali pri nadaljnjih izračunih

2.10 STATISTIČNA OBDELAVA REZULTATOV

Rezultate naših poskusov smo analizirali s standardnimi statističnimi metodami. Statistične razlike med skupinami v posameznem poskusu smo določali s t-testom in Mann-Whitney *U*-testom. Izračune smo naredili s statističnim programom Statgraphics Plus 4.0 za Windows. Statistično značilne razlike med kontrolo poskusa in izpostavljenimi skupinami smo kategorizirali glede na signifikantnost razlik ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,005$). Grafe smo narisali s programom OriginPro 8. Pri grafih prehranjevanja in vsebnosti cinka v telesu predstavljajo simboli v škatlah („box ploti“) naslednje: škatla predstavlja 50 % vseh meritev, brki predstavljajo minimalne in maksimalne meritve, prazen kvadratak povprečje, vodoravna črtica pa mediano. Pri ostalih grafih (ocena debeline epitelija in količine lipidov v celicah B ter ocena fiziološkega stanja živali) smo uporabili odstotek živali v različnih razredih in skupinah (5 različnih razredov glede na debelino epitelija prebavnih žlez, 5 različnih razredov glede na količino lipidnih kapelj v celicah B prebavnih žlez in 3 različne skupine glede na fiziološko stanje živali *P. scaber*).

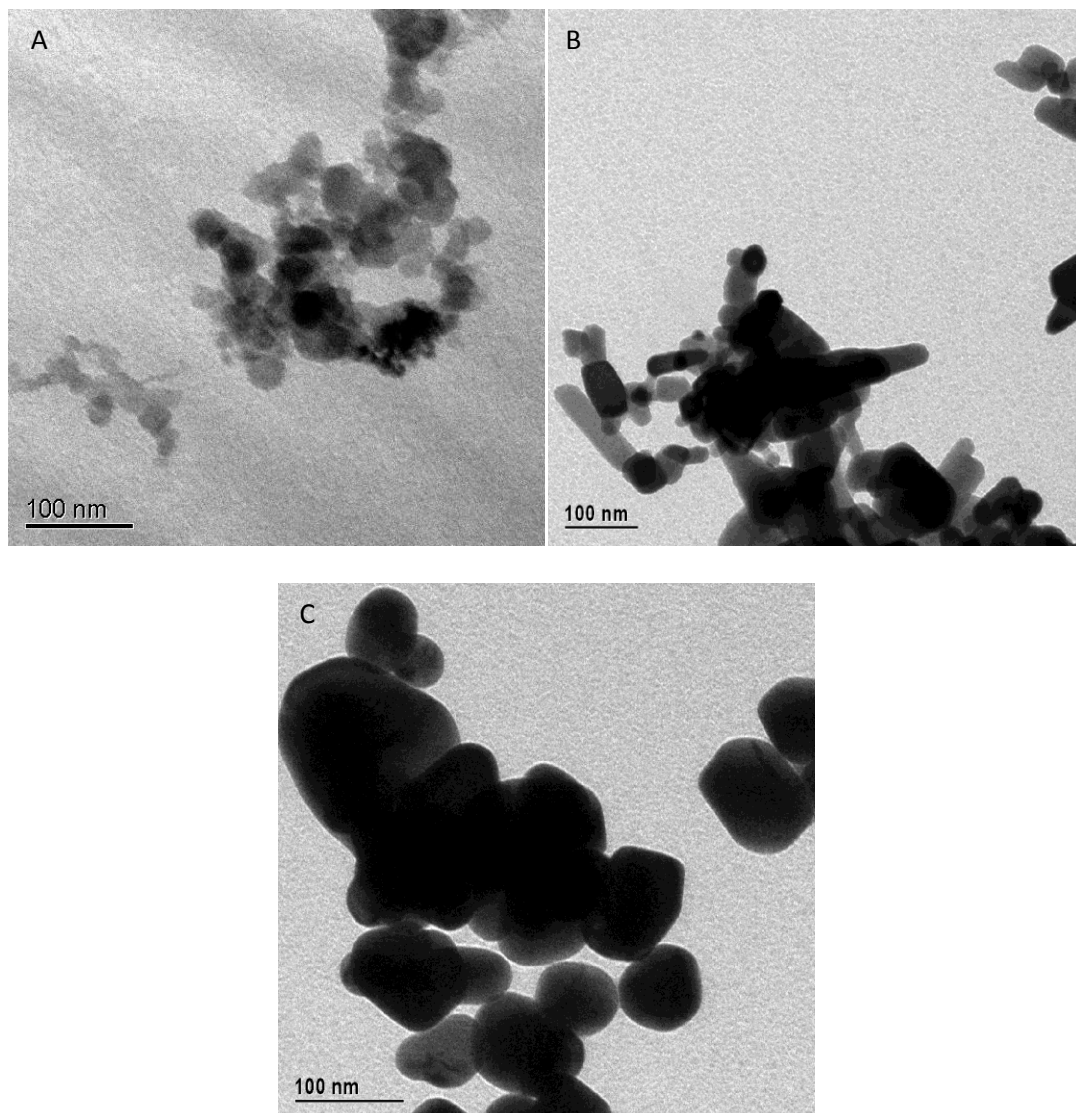
3. REZULTATI

3.1 ZNAČILNOSTI NANODELCEV UPORABLJENIH V POSKUSIH

Nano-TiO₂ smo pregledali z metodo DLS ter ugotovili velikost agregatov nanodelcev med 750 in 950 nm. Z metodo BET smo merili specifično površino nano-TiO₂, ki je bila 145 m²/g, kar predstavlja primarno velikost 15 nm. Velikost in površina nano-TiO₂, ki sta bili ugotovljeni z metodama DLS in BET, se ujemata s podatki, ki smo jih dobili od proizvajalca ob nakupu teh nanodelcev. Metoda XRD je potrdila anatasno kristalno strukturo nano-TiO₂. Z meritvami nano-TiO₂ na mikroskopu TEM smo ugotovili, da so posamezni nanodelci veliki med 10 in 20 nm (slika A) (Valant in sod., 2009).

Nano-ZnO smo pregledali z metodo DLS in ugotovili velikost agregatov nanodelcev 610 nm. Ocena površine nanodelcev z metodo BET je bila 12 m²/g, kar pomeni, da so primarni delci veliki 85 nm. Z meritvami na mikroskopih TEM in SEM smo ugotovili, da so delci nano-ZnO večji od velikosti, ki so jo navedli proizvajalci (do 100 nm). Posamezni delci so bili večji od 100 nm (slika B) (Pipan Tkalec in sod., 2010).

Nano-Ag smo pregledali z mikroskopoma TEM in SEM in ugotovili, da so nanodelci kroglaste oblike ter da je njihova velikost med 30 in 200 nm (slika C). Z uporabo metode XRD in TEM/EDX smo potrdili prisotnost srebra. Prisotno je bilo tudi žveplo, ki naj bi preprečilo agregacijo srebra, in baker, ki je bil prisoten zaradi bakrene mrežice, na kateri smo pregledovali nanodelce. Meritve nano-Ag z metodo DLS niso bile mogoče zaradi prevelikih agregatov.



Slika 9. Mikrografije agregatov nanodelcev, izdelane s presevno elektronsko mikroskopijo (A) nano-TiO₂, (B) nano-ZnO, (C) nano-Ag

Figure 9. Transmission electron micrograph of aggregates of (A) nano-TiO₂, (B) nano-ZnO and (C) nano-Ag

Preglednica 2. Povzetek značilnosti nanodelcev, ki smo jih ugotovili z uporabo elektronske mikroskopije (TEM, TEM/EDX, SEM), metod DLS, BET in XRD. Opisane so tudi informacije o nanodelcih, ki smo jih dobili pri proizvajalcu

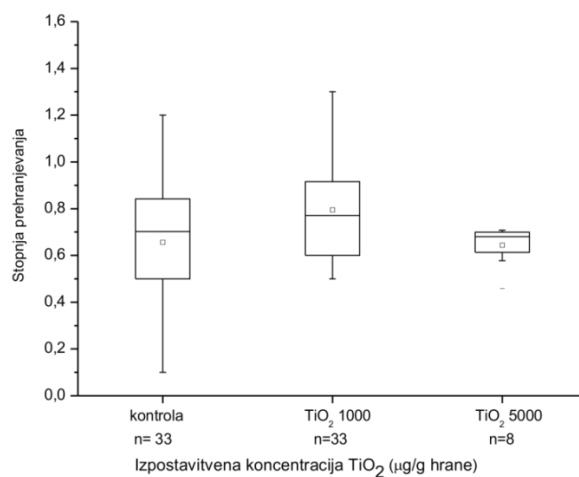
Table 2. Summarised characteristics of nanoparticles which were confirmed using electron microscopy (TEM, TEM/EDX, SEM), DLS, BET and XRD methods, as well as supplier info

| | Nano-TiO₂ | Nano ZnO | Nano-Ag |
|--|--|--|--|
| Informacije proizvajalca (Sigma-Aldrich) | Nanoprah, anatazna kristalna struktura, velikost delca <25 nm, specifična površina 200-220 m ² /g | Nanoprah <100 nm, specifična površina 15-25 m ² /g | Nanoprah, čistost 99.5%, velikost delca <100 nm, specifična površina 5.0 m ² /g |
| SEM (prah) | 10-20 nm | 10-200 nm | 30-200 nm |
| TEM (disperzija nanodelcev v destilirani vodi) Velikost posameznega delca v agregatih Oblika posameznega delca Opis agregatov TEM/EDX (disperzija nanodelcev v destilirani vodi) | 10-20 nm Okrogli in rahlo razpotegnjeni Gosti agregati - | 10-200 nm Kroglasti do eliptični Gosti agregati - | 30-200 nm Okrogli Gosti agregati Ag, S (preprečevalo agregacijo) |
| DLS (disperzija nanodelcev v destilirani vodi) Velikost agregatov | 750-950 nm | 614 nm | Meritve niso bile možne zaradi prevelikih agregatov |
| BET (disperzija nanodelcev v destilirani vodi) Velikost delca (nm) Specifična površina (m ² /g) | 10 nm 145 m ² /g | 84,9 nm 12,39 ± 0,0270 m ² /g | - |
| XRD (disperzija nanodelcev v destilirani vodi) | Anatazna kristalna struktura | - | + |

- analiza ni bila narejena, + analiza je bila narejena

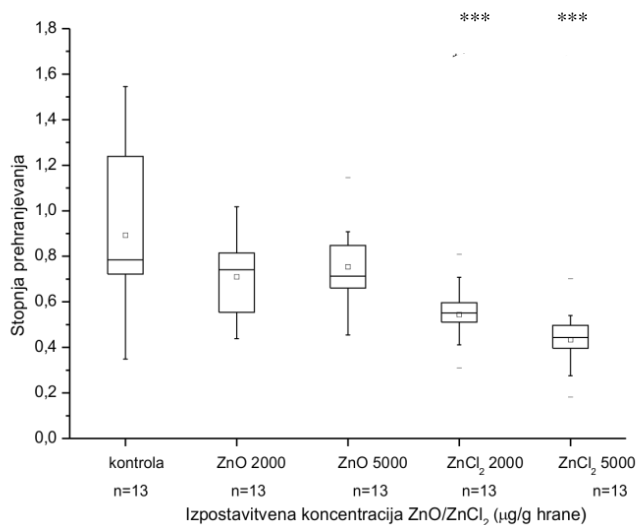
3.2 VPLIV NANODELCEV NA PREHRANJEVANJE, SPREMEMBE MASE IN PREŽIVETJE ORGANIZMA

Po 14 dnevih prehranjevanja s hrano, ki so ji bili dodani različni agregati nanodelcev nano-TiO₂ (1 000, 3 000 in 5 000 µg/g hrane), nano-ZnO (2 000 in 5 000 µg/g hrane) in nano-Ag (1 000 in 5 000 µg/g hrane) nismo ugotovili statistično značilnih razlik v masi in preživetju med živalmi kontrole in živalmi, ki so uživale hrano z dodanimi nanodelci. Prav tako nismo opazili razlik v prehranjevanju z nanodelci tudi pri najvišji koncentraciji (slike 10, 11 in 12). Pri ZnCl₂ smo opazili zmanjšanje prehranjevanja živali pri obeh preskušanih koncentracijah (2 000 in 5 000 µg/g hrane).



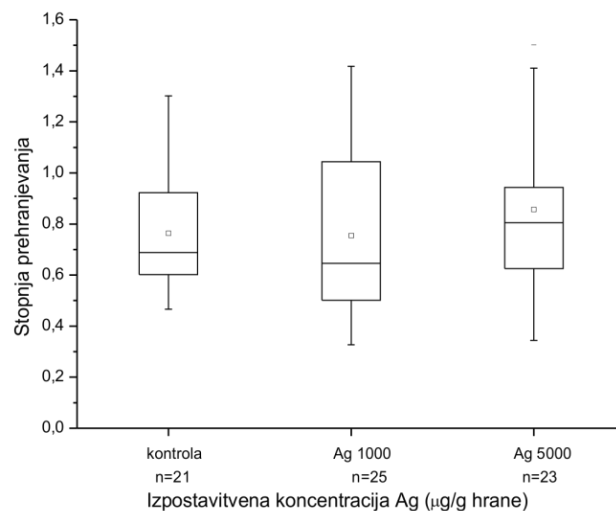
Slika 10. Stopnja prehranjevanja *P. scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nano-TiO₂ koncentracije 1 000 in 5 000 µg/g suhe mase lista. Na x-osi so označene izpostavitvene koncentracije nano-TiO₂, n – število živali v skupini

Figure 10. Feeding rate of *P. scaber* after 14 days of feeding with leaves treated with nano-TiO₂ in concentrations of 1,000 and 5,000 µg/g of food. On x-axis are exposures to nano-TiO₂, n – number of animals in the group



Slika 11. Stopnja prehranjevanja *P. scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nano-ZnO in ZnCl₂ koncentracij 2 000 in 5 000 µg/g suhe mase lista. Na x-osi so označene izpostavitvene koncentracije nano-ZnO in ZnCl₂, n – število živali v skupini. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo so označene z zvezdicami (t-test; ***p < 0,005)

Figure 11. Feeding rate of *P. scaber* after 14 days of feeding with leaves treated with nano-ZnO and ZnCl₂ in concentrations of 2,000 and 5,000 µg/g of food. On x-axis are exposures to nano-ZnO and ZnCl₂, n – number of animals in the group. Statistical differences between exposed animals and animals from the control group are assigned asterisks (t-test; ***p < 0.005)



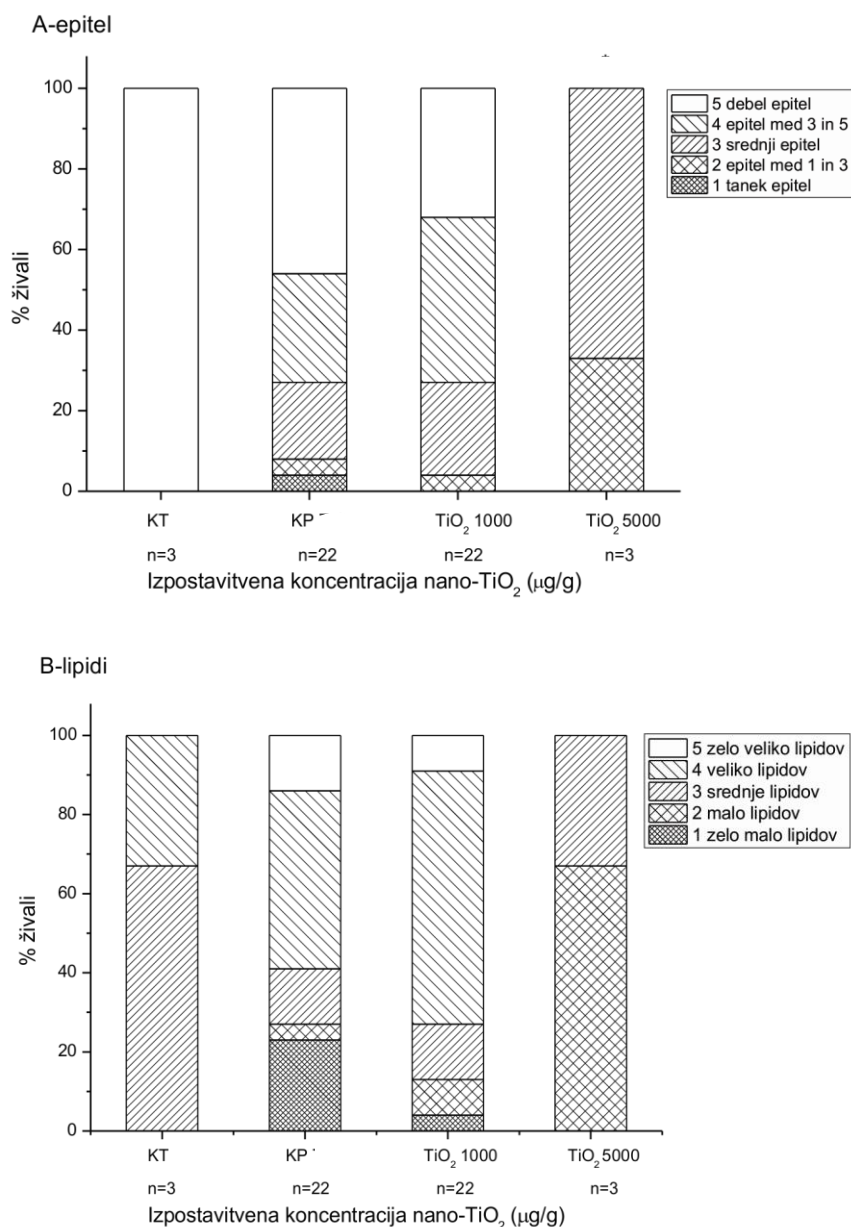
Slika 12. Stopnja prehranjevanja *P. scaber* po 14 dneh hranjenja z listi leske, tretiranimi z nano-Ag koncentracij 1 000 in 5 000 µg/g suhe mase lista. Na x-osi so označene izpostavitvene koncentracije nano-Ag, n – število živali v skupini

Figure 12. Feeding rate of *P. scaber* after 14 days of feeding with leaves treated with nano-Ag in concentrations of 1,000 and 5,000 µg/g of food. On x-axis are exposures to nano-Ag, n – number of animals in the group

3.3 VPLIV NANODELCEV NA HISTOLOŠKE ZNAČILNOSTI CELIC PREBAVNIH ŽLEZ

3.3.1 Histološke značilnosti celic prebavnih žlez pri živalih iz terarija in poskusa z nano-TiO₂

Primerjali smo histološke značilnosti celic prebavnih žlez živali iz terarija in poskusa, kjer so bile živali izpostavljene hrani z nano-TiO₂ (1 000 in 5 000 µg/g hrane). Živali iz terarija so imele velike kupulaste celice B in srednje veliko lipidnih kapelj. Pri živalih, ki so bile izpostavljene nano-TiO₂, smo glede na živali iz terarija in živali iz kontrole poskusa ugotovili stanjšanje epitelija in tudi nekoliko manj lipidnih kapelj (slika 13(A), (B)).

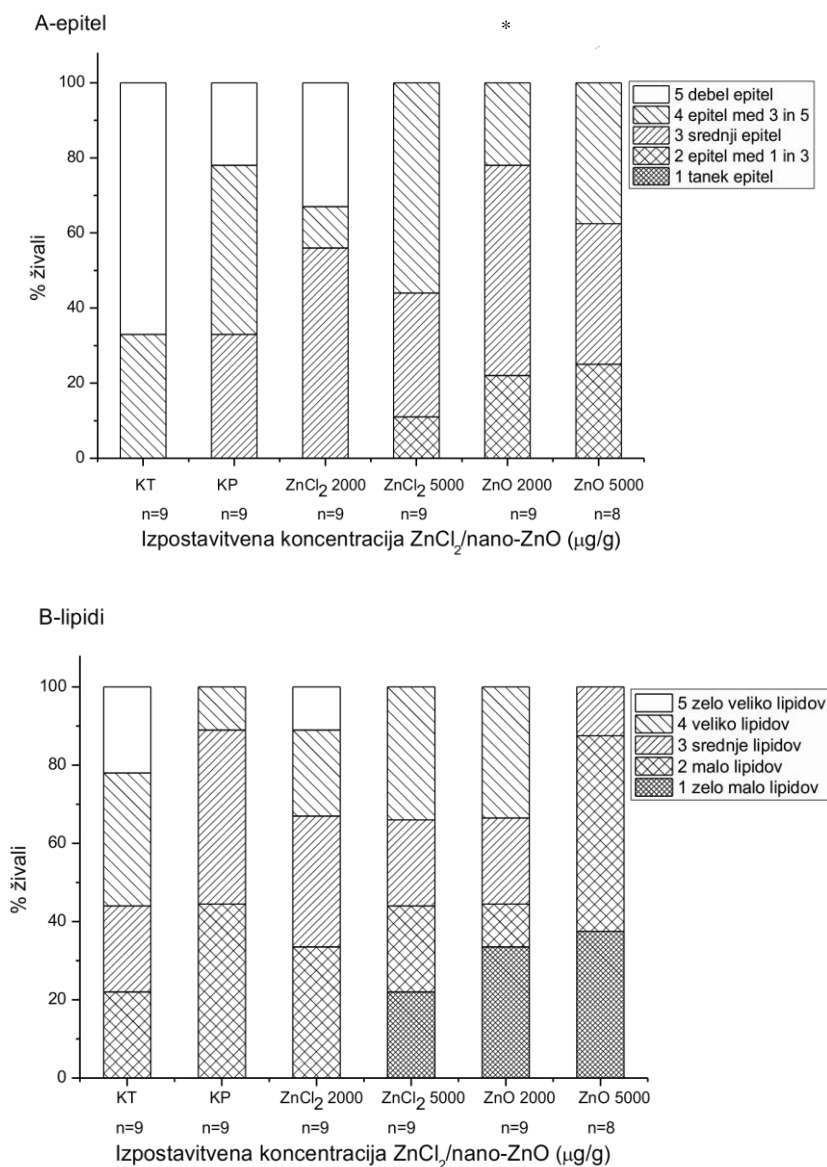


Slika 13. (A) Odstotek živali v različnih skupinah z različno debelino epitelija (glede na obliko in velikost celic B smo epitelij razdelili na pet razredov, tj. od ploščatih celic (1) do velikih, kupulastih celic B (5)). (B) Odstotek živali v različnih skupinah z različno količino lipidnih kapelj v celicah B prebavne žleze pri *P. scaber*, ki so bili izpostavljeni nano-TiO₂. Količino lipidnih kapelj smo ocenili od zelo malo (1) do zelo veliko (5). Na x-osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola, 1 000 in 5 000 μg nano-TiO₂/g hrane); n – število živali v skupini

Figure 13. (A) Percentage of animals with different epithelial thickness of the digestive gland cells determined according to different shapes and sizes of epithelial B cells from totally flat B cells (1) to large, dome-shaped B cells (5). (B) Percentage of animals in each group with different abundance of lipid droplets in the B cells of the digestive gland in the terrestrial isopod *P. scaber* after dietary exposure to nano-TiO₂. This was classified from sparse (1) to very high (5). Points on the x-axis represent exposure concentrations (animals from the terrarium, control group, 1,000 and 5,000 μg nano-TiO₂/g of food); n – number of animals in each group

3.3.2 Histološke značilnosti celic prebavnih žlez pri živalih iz terarija in poskusa z nano-ZnO ali ZnCl₂

Primerjali smo histološke značilnosti celic prebavnih žlez živali iz terarija in poskusa, v okviru katerega so bile živali izpostavljene hrani z nano-ZnO ali ZnCl₂ (1 000 in 5 000 µg/g hrane). Živali iz terarija so imele velike kupulaste celice B in srednje veliko lipidnih kapelj. Pri živalih, izpostavljenih hrani z nano-ZnO, smo glede na živali iz terarija in živali iz kontrole poskusa ugotovili stanjšanje epitelijskega ter tudi nekoliko manj lipidnih kapelj. Opažene histološke spremembe so bile odvisne od koncentracije, pri čemer so bile največje pri najvišji koncentraciji nano-ZnO (5 000 µg/g hrane). Pri živalih iz skupin, hranjenih s hrano z nano-ZnO, smo glede na živali iz skupin, hranjenih s hrano z ZnCl₂, opazili tanjši epitelij in manj lipidnih kapelj (slika 14(A) in (B)).

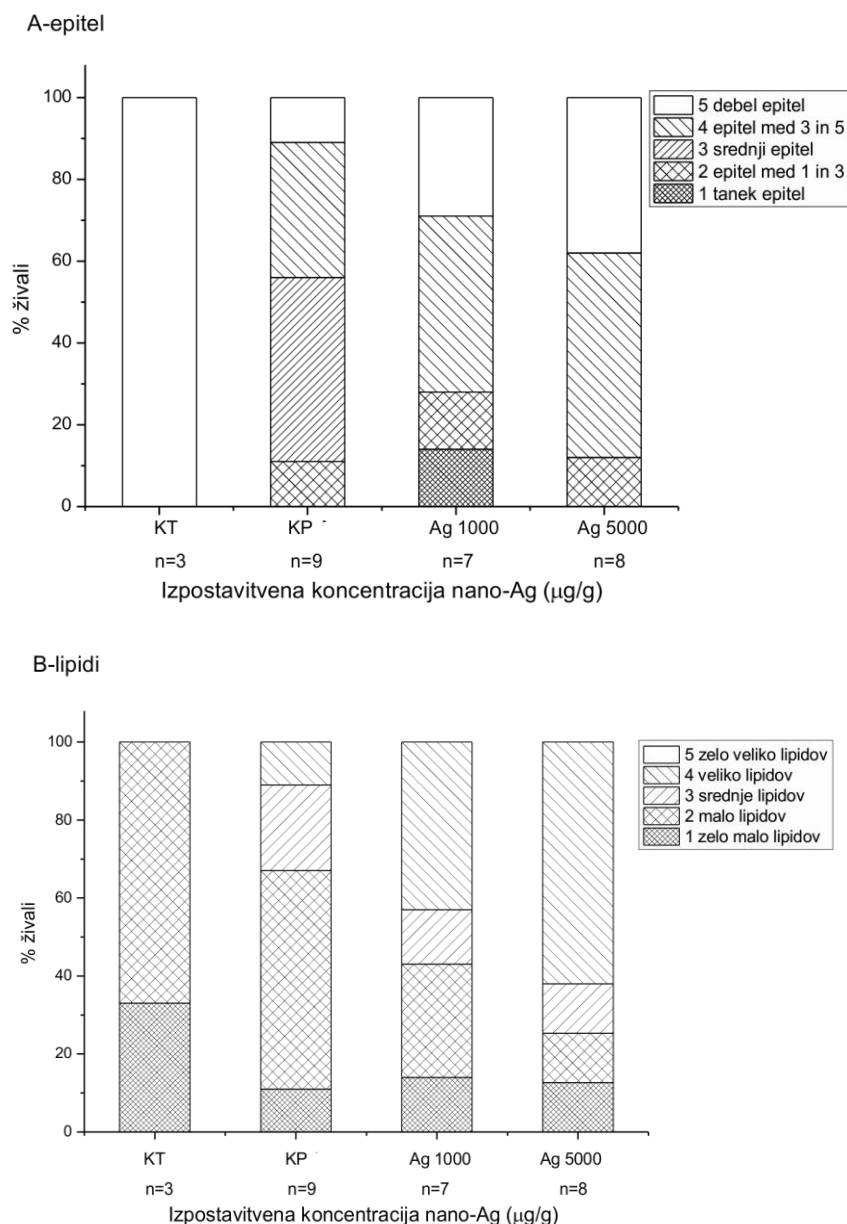


Slika 14. (A) Odstotek živali v različnih skupinah z različno debelino epitelija (glede na obliko in velikost celic B smo epitelij razdelili na pet razredov, tj. od ploščatih celic (1) do velikih kupulastih celic B (5)). (B) Odstotek živali v različnih skupinah z različno količino lipidnih kapelj v celicah B prebavne žleze pri *P. scaber*, ki so bili izpostavljeni nano-ZnO in ZnCl₂. Količino lipidnih kapelj smo ocenili od zelo malo (1) do zelo veliko (5). Na x-osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola, 2 000 in 5 000 μg nano-ZnO ali ZnCl₂/g hrane); n – število živali v skupini. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo poskusa so označene z zvezdicami (t-test; *p < 0,05)

Figure 14. (A) Percentage of animals with different epithelial thickness of the digestive gland cells determined according to different shapes and sizes of epithelial B cells from totally flat B cells (1) to large, dome-shaped B cells (5). (B) Percentage of animals in each group with different abundance of lipid droplets in the B cells of the digestive gland in the terrestrial isopod *P. scaber* after dietary exposure to nano-ZnO and ZnCl₂. This was classified from sparse (1) to very high (5). Points on the x-axis represent exposure concentrations (animals from the terrarium, control group, 2,000 and 5,000 μg nano-ZnO or ZnCl₂/g food); n – number of animals in each group. Statistical differences between exposed and control from experiment animals are asterisks assign (t-test; *p < 0.05)

3.3.3 Histološke značilnosti celic prebavnih žlez pri živalih iz terarija in poskusa z nano-Ag

Primerjali smo histološke značilnosti celic prebavnih žlez živali iz terarija in poskusa, v okviru katerega so bile živali izpostavljene hrani z nano-Ag (1 000 in 5 000 µg/g hrane). Živali iz terarija so imele velike kupulaste celice B in malo oziroma zelo malo lipidnih kapelj. V nasprotju s pričakovanji smo v poskusih z nano-Ag ob naraščanju koncentracije nano-Ag opazili naraščanje odstotka živali z velikimi kupulastimi celicami B (ocena 5 in 4). Prav tako smo v teh poskusih pri živalih, ki so bile hranjene s hrano z nano-Ag, opazili v celicah prebavnih žlez večjo količino lipidnih kapelj v primerjavi s celicami živali iz kontrole in živali iz terarija (slika 15(A) in (B)).

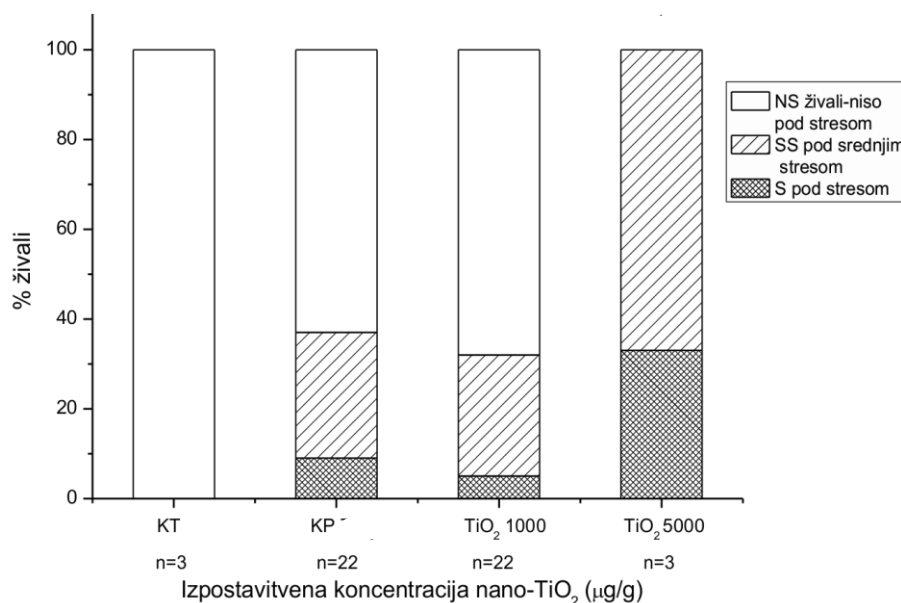


Slika 15. (A) Odstotek živali v različnih skupinah z različno debelino epitelija (glede na obliko in velikost celic B smo epitelij razdelili na pet razredov, tj. od ploščatih celic (1) do velikih kupulastih celic B (5)). (B) Odstotek živali v različnih skupinah z različno količino lipidnih kapelj v celicah B prebavne žleze pri *P. scaber*, ki so bili izpostavljeni nano-Ag. Količino lipidnih kapelj smo ocenili od zelo malo (1) do zelo veliko (5). Na x-osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola, 1 000 in 5 000 μg nano-Ag/g hrane); n – število živali v skupini

Figure 15. (A) Percentage of animals with different epithelial thickness of the digestive gland cells determined according to different shapes and sizes of epithelial B cells from totally flat B cells (1) to large, dome-shaped B cells (5). (B) Percentage of animals in each group with different abundance of lipid droplets in the B cells of the digestive gland in the terrestrial isopod *P. scaber* after dietary exposure to nano-Ag. This was classified from sparse (1) to very high (5). Points on the x-axis represent exposure concentrations (animals from the terrarium, control group, 1,000 and 5,000 μg nano-Ag/g of food); n – number of animals in each group

3.4 VPLIV NANODELCEV NA FIZIOLOŠKO STANJE ŽIVALI

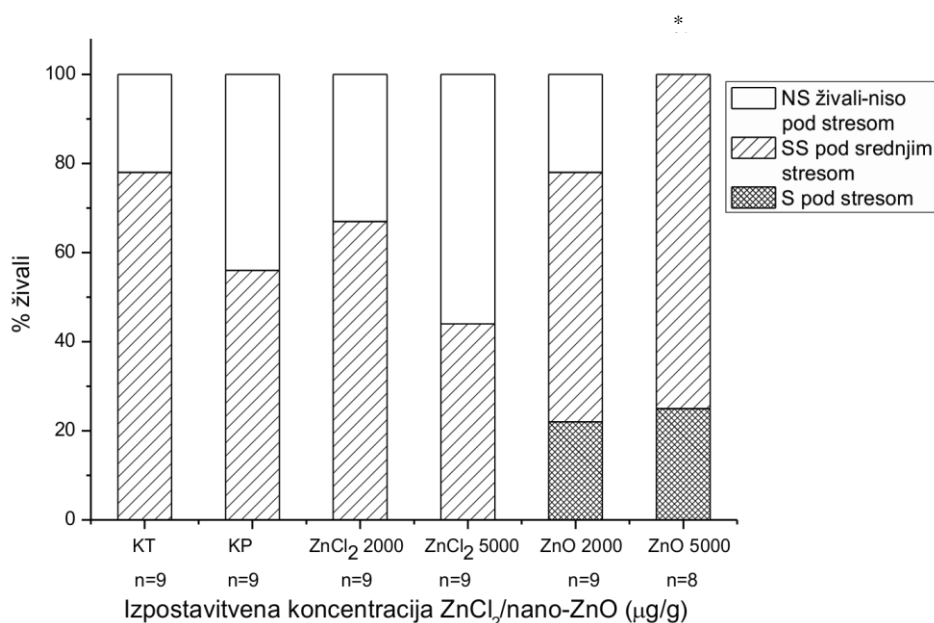
Na podlagi debeline epitelija in količine lipidnih kapelj v celicah B prebavnih žlez smo določili fiziološko stanje posamezne živali (Jemec in sod., 2012). Vse živali iz terarija pri poskusih z nano-TiO₂ so bile ocenjene kot živali, ki niso bile pod stresom. Živali, ki so bile izpostavljene koncentraciji 1 000 µg nano-TiO₂/g hrane, se niso razlikovale od živali iz kontrole poskusa (obe skupini sta imeli določen odstotek živali (40 %) pod stresom). Živali, ki so bile izpostavljene najvišji koncentraciji nano-TiO₂ (5 000 µg/g hrane), pa so bile vse ocenjene kot živali pod stresom (slika 16).



Slika 16. Odstotek živali v 14-dnevnih poskusih z nano-TiO₂ z različnim fiziološkim stanjem, ocenjenim glede na debelino epitelija in količino lipidnih kapelj v celicah B (NS – živali, ki niso pod stresom, SS – živali pod srednjim stresom, S – živali pod stresom). Na x-osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola iz poskusa, 1 000 in 5 000 µg nano-TiO₂/g hrane); n – število živali v skupini

Figure 16. Percentage of animals fed with nano-TiO₂ for 14 days with physiological condition determined according to different epithelial thickness and abundance of lipid droplets in B cells (NS – non-stressed, SS – moderately stressed, S – severely stressed). Points on the x-axis represent exposure concentrations (animals from the terrarium, control group, 1,000 and 5,000 µg nano-TiO₂/g of food); n – number of animals in each group

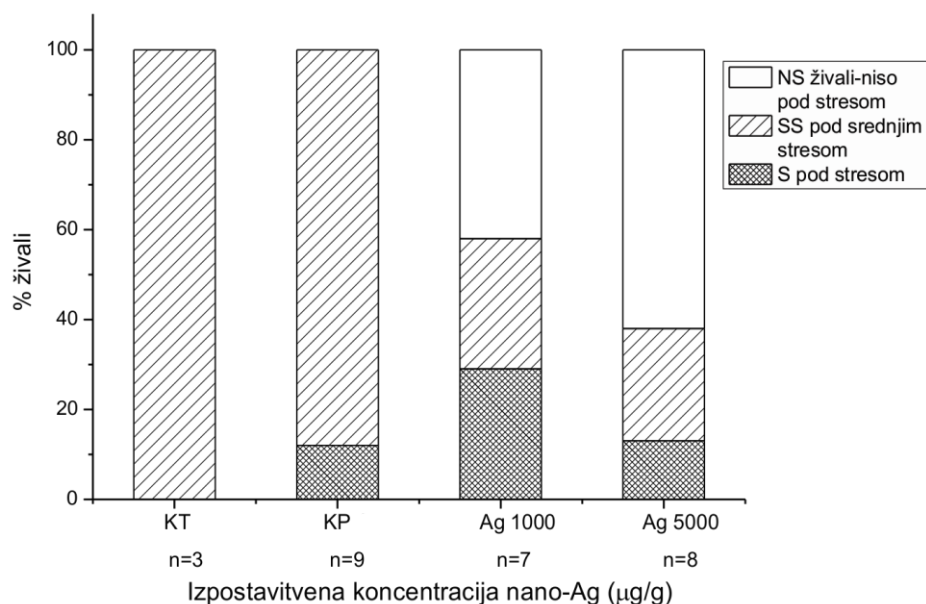
V poskusih z nano-ZnO in ZnCl₂ so bile živali iz terarija, kontrole iz poskusa in živali, ki so bile izpostavljene ZnCl₂, v podobnem fiziološkem stanju. V teh skupinah so bile živali, ki niso bile pod stresom ali pa so bile pod srednjim stresom. Opazili nismo nobene živali, ki bi bila pod stresom. Živali, ki so bile pod stresom, smo opazili le v skupinah, kjer so bile živali izpostavljene hrani z nanodelci (2 000 in 5 000 µg nano-ZnO/g hrane). Odgovor je bil v primeru nanodelcev odvisen od koncentracije (slika 17).



Slika 17. Odstotek živali v 14-dnevnih poskusih z nano-ZnO in ZnCl₂ z različnim fiziološkim stanjem, ocenjenim glede na debelino epitelija in količino lipidnih kapelj v celicah B (NS – živali, ki niso pod stresom, SS – živali pod srednjim stresom, S – živali pod stresom). Na x-osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola iz poskusa, 2 000 in 5 000 µg nano-ZnO/g hrane, 2 000 in 5 000 µg ZnCl₂/g hrane); n – število živali v skupini. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo so označene z zvezdicami (t-test, *p < 0,05)

Figure 17. Percentage of animals fed with nano-ZnO and ZnCl₂ for 14 days with physiological condition determined according to different epithelial thickness and abundance of lipid droplets in B cells (NS – non-stressed, SS – moderately stressed, S – severely stressed). Points on the x-axis represent exposure concentrations (animals from the terrarium, control group, 2,000 and 5,000 µg nano-ZnO/g of food, 2,000 and 5,000 µg ZnCl₂/g of food); n – number of animals in each group. Statistical differences between exposed and control from experiment animals are asterisks assigned (t-test, *p < 0,05)

Vse živali iz terarija pri poskusih z nano-Ag so bile ocenjene kot živali pod srednjim stresom. Prav tako je bila večina živali iz kontrole poskusa ocenjena kot živali pod srednjim stresom. V tej skupini smo opazili tudi živali, ki so bile pod stresom. V nasprotju s pričakovanji smo v skupinah, ki so bile izpostavljene nano-Ag, opazili živali, ki niso bile pod stresom. Skupini živali, ki so bile izpostavljene koncentracijam nano-Ag (1 000 $\mu\text{g/g}$ hrane in 5 000 $\mu\text{g/g}$ hrane), sta vsebovali 40 % in 60 % živali, ki niso bile pod stresom (slika 18).



Slika 18. Odstotek živali v 14-dnevnih poskusih z nano-Ag z različnim fiziološkim stanjem, ocenjenim glede na debelino epitelija in količino lipidnih kapelj v celicah B (NS – živali, ki niso pod stresom, SS – živali pod srednjim stresom, S – živali pod stresom). Na x-osi so različne skupine (živali iz terarija, kontrola iz poskusa, 1 000 in 5 000 μg nano-Ag/g hrane); n – število živali v skupini

Figure 16. Percentage of animals fed with nano-Ag for 14 days with physiological condition determined according to different epithelial thickness and abundance of lipid droplets in B cells (NS – non-stressed, SS – moderately stressed, S – severely stressed). Points on the x-axis represent exposure concentrations (animals from the terrarium, control group, 1,000 and 5,000 μg nano-Ag/g of food); n – number of animals in each group

3.5 VPLIV NANODELCEV NA ULTRASTRUKTURNE ZNAČILNOSTI V CELICAH PREBAVNIH ŽLEZ

3.5.1 Ultrastrukturne značilnosti v celicah prebavnih žlez pri živalih iz terarijev in pri živalih iz kontrole poskusa

Pri *P. scaber* smo ugotavljali ultrastrukturne značilnosti v celicah B in celicah S v medianem delu prebavnih žlez. Živali iz terarijev, vzete pred začetkom vsakega poskusa, in tudi večina živali iz kontrole poskusov so imele večinoma debel epitelij z večjo količino lipidov v celicah B prebavnih žlez (slika 19). V celicah teh živali smo ultrastrukturne značilnosti opazili redko. Celice B prebavnih žlez so imele številne lipidne kaplje, kratke in dolge cisterne zrnatega endoplazemskega retikla (GER), cisterne golgijevega aparata (GA), večinoma ovalne in nekaj dolgih mitohondrijev, nekaj lamelarnih teles in malo elektronsko gostih depozitov (EGD), ki so se pojavljali na mikrovilih in v veziklih. V celicah S smo opazili cisterne GER, GA, ovalne mitohondrije, lamelarna telesa, nekaj elektronsko gostih depozitov in pogosto tudi granule. Celice B in S so imele jedra z enakomerno razporejenim evkromatinom in heterokromatinom, jedrni ovoj je bil večinoma okrogel. Nekatere celice B so imele po dve jedri (sliki 20, 21, preglednici 3, 4).

V celicah B in S prebavnih žlez živali, ki smo jih vzeli iz terarija pred poskusom z nano-Ag, in tudi v celicah živali iz kontrole poskusa z nano-Ag smo opazili nekaj ultrastrukturnih značilnosti, ki so se pojavljale pogosto. Opazili smo predvsem manj lipidnih kapelj, gosto citoplazmo, številna lamelarna telesa, spremembe v obliki GER, več dolgih mitohondrijev in bolj naguban jedrni ovoj (slika 22, preglednici 3, 4).

Preglednica 3. Ultrastrukturne značilnosti in posebnosti na posameznih organelih v celici pri *P. scaber* po 14-dnevni izpostavitvi različnim nanodelcem ali ZnCl₂

Table 3. Ultrastructure characteristics of organelles in the cells of digestive gland of *P. scaber* after 14 days of exposure to different nanoparticles or ZnCl₂

| Organel | Normalna ultrastruktura | Manj izrazite ultrastrukturne spremembe zaradi izpostavljenosti nanodelcem (TiO ₂ , ZnO, Ag) in ZnCl ₂ . Učinki, kjer celica s kompenzacijskimi mehanizmi prepreči kvarno delovanje. | Bolj izrazite ultrastrukturne spremembe zaradi izpostavljenosti nanodelcem (TiO ₂ , ZnO, Ag) in ZnCl ₂ . Razpad organelov v celici - opazili smo ga le pri živalih s povsem ploščatim epitelijem prebavnih žlez (kvaren učinek). |
|----------------------------|--|---|---|
| Endoplazemski retikel | Dolge cisterne z ribosomi (GER), paralelno urejene. V nekaterih celicah smo opazili tudi pojav veziklov. | V obliki veziklov in krajših cistern. | Pogoste pore v membranah, pojav mielinskih struktur. |
| Lamelarna telesa | Normalne oblike, bila so prisotna v celicah. | Normalne oblike, njihovo število je bilo v celicah povečano glede na celice živali iz kontrole. | Nepravilnih oblik, razpad. |
| Mikrovili | Normalne oblike, dolžine, občasno smo opazili tudi redukcijo. | Pogosto smo opazili posebnosti v obliki (redukcijo ali vezikularizacijo mikrovilov). | Pore v membranah, celice povsem brez mikrovilov. |
| Mitohondriji | Okrogle oblike, občasno smo opazili tudi dolge in razvejane. | Pogosto smo opazili dolge in razvejane. Poškodb nismo opazili. | Pore v membranah, razpad in redukcija krist. |
| Jedro | Jedrni ovoj okrogle oblike, občasno smo opazili rahlo naguban jedrni ovoj. Enakomerno razporejen heterokromatin. | Pogosto smo opazili bolj naguban jedrni ovoj. Enakomerno razporejen heterokromatin. | Mrežasto jedro – razpad. |
| Elektronsko gosti depoziti | EGD na mikrovilih in v veziklih. | EGD na mikrovilih, v veziklih, v mitohondrijih in ob celičnih stikih. Glede na živali iz kontrole je bilo EGD v celicah več. | EGD na razpadlih mikrovilih in v citoplazmi. |

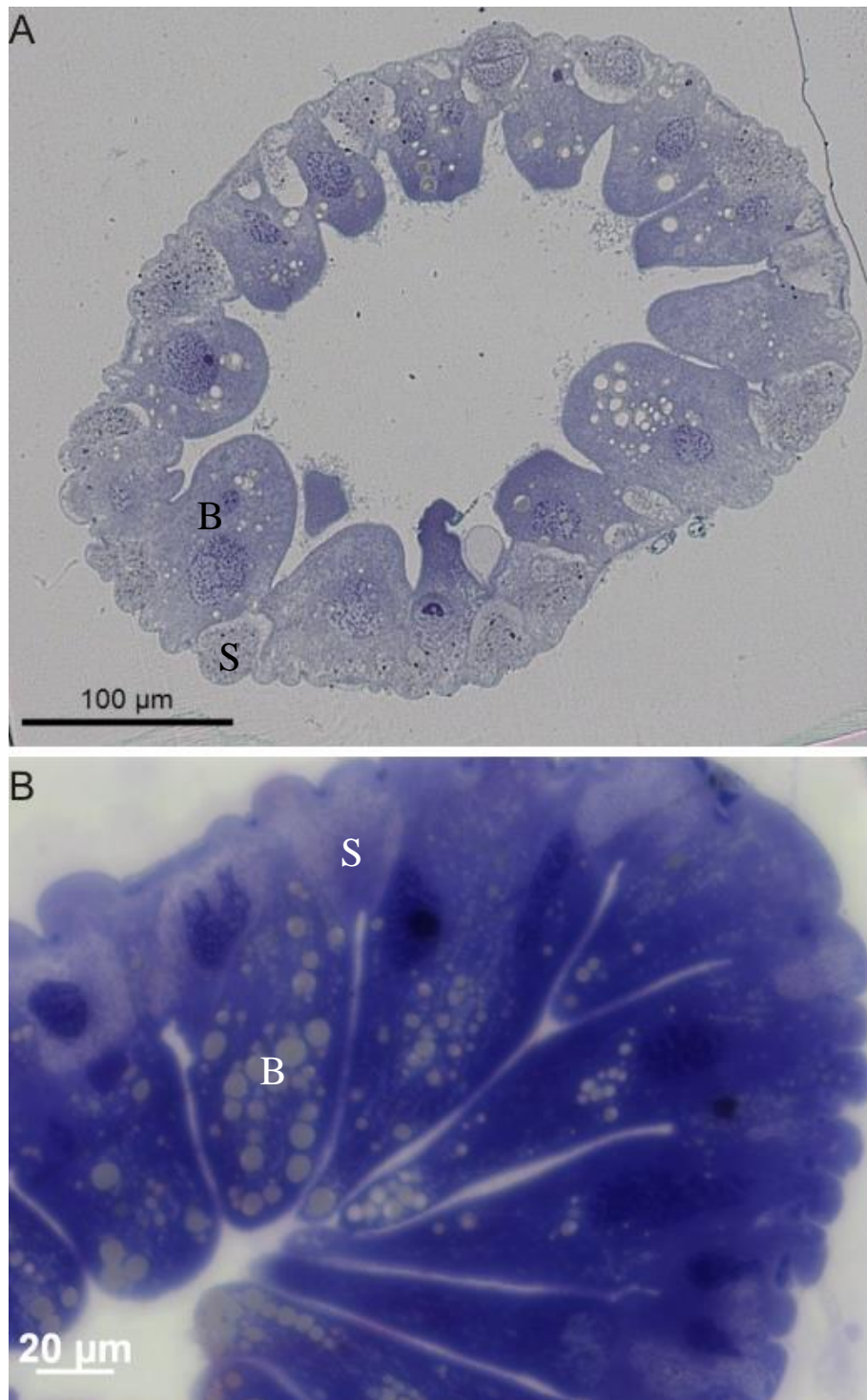
Občasno-ultrastrukturno značilnost smo opazili pri manj kot 25% opazovanih celic. Pogosto- ultrastrukturno značilnost smo opazili pri več kot 75% opazovanih celic

Preglednica 4. Pojavljanje ultrastrukturnih značilnosti v celicah prebavnih žlez pri *P. scaber* po 14-dnevni izpostavitvi različnim nanodelcem ali ZnCl₂

Table 4. Frequency of ultrastructure characteristics in the cells of the digestive gland of *P. scaber* after 14 days of exposure to different nanoparticles or ZnCl₂

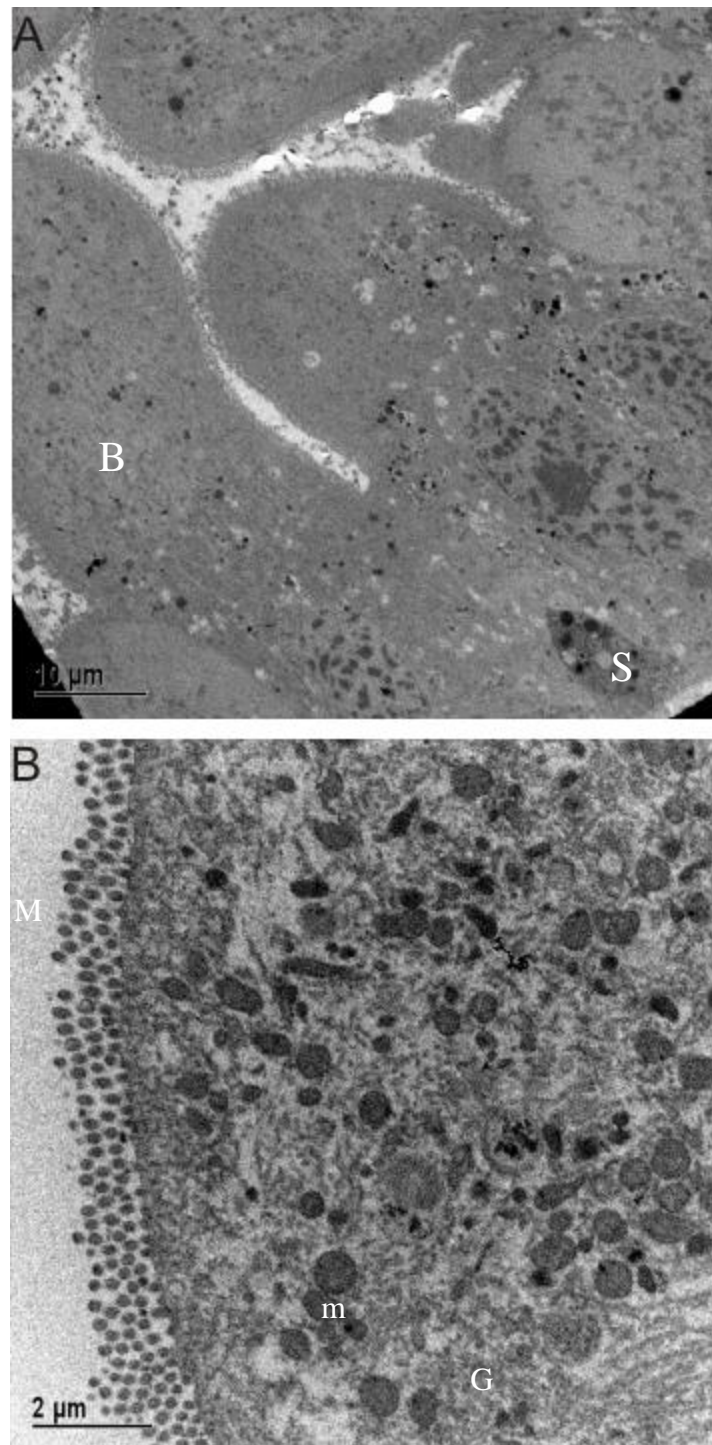
| Ultra- strukturna značilnost | Nano-TiO ₂ | | | | Nano-ZnO | | | | ZnCl ₂ | | | | Nano-Ag | | | |
|------------------------------------|------------------------|------------------------|---------------|---------------|-----------|-----------|---------------|---------------|-------------------|---------------|----------|----------|---------------|---------------|--|--|
| | KG TiO ₂ | KP TiO ₂ | 1 000 µg/g | 5 000 µg/g | KG ZnO | KP ZnO | 2 000 µg/g | 5 000 µg/g | 2 000 µg/g | 5 000 µg/g | KG Ag | KP Ag | 1 000 µg/g | 5 000 µg/g | | |
| Poškodbe na mikrovilnih | + | + | ++ | ++ | + | + | +++ | +++ | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ | | |
| Lamelarna telesa | + | + | +++ | +++ | + | + | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | | |
| Spremembe v obliki GER | + | + | +++ | +++ | + | + | +++ | +++ | ++ | ++ | + | ++ | +++ | +++ | | |
| Dolgi, razvejani mitohondriji | + | + | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ | ++ | + | + | ++ | +++ | +++ | | |
| Elektronsko bolj gosta citoplazma | + | + | ++ | ++ | + | + | ++ | ++ | + | ++ | + | +++ | +++ | +++ | | |
| Naguban jedrni ovoj | + | + | ++ | +++ | + | + | ++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | | |
| Elektronsko gosti depoziti | + | + | ++ | +++ | + | + | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | | |

+ spremembo smo opazili občasno (do 25% opazovanih celic), ++ spremembo smo opazili pogosto (med 25% in 75% opazovanih celic),
+++ spremembo smo opazili skoraj vedno (več kot 75% opazovanih celic), KG - kontrola gojišča, KP - kontrola poskusa



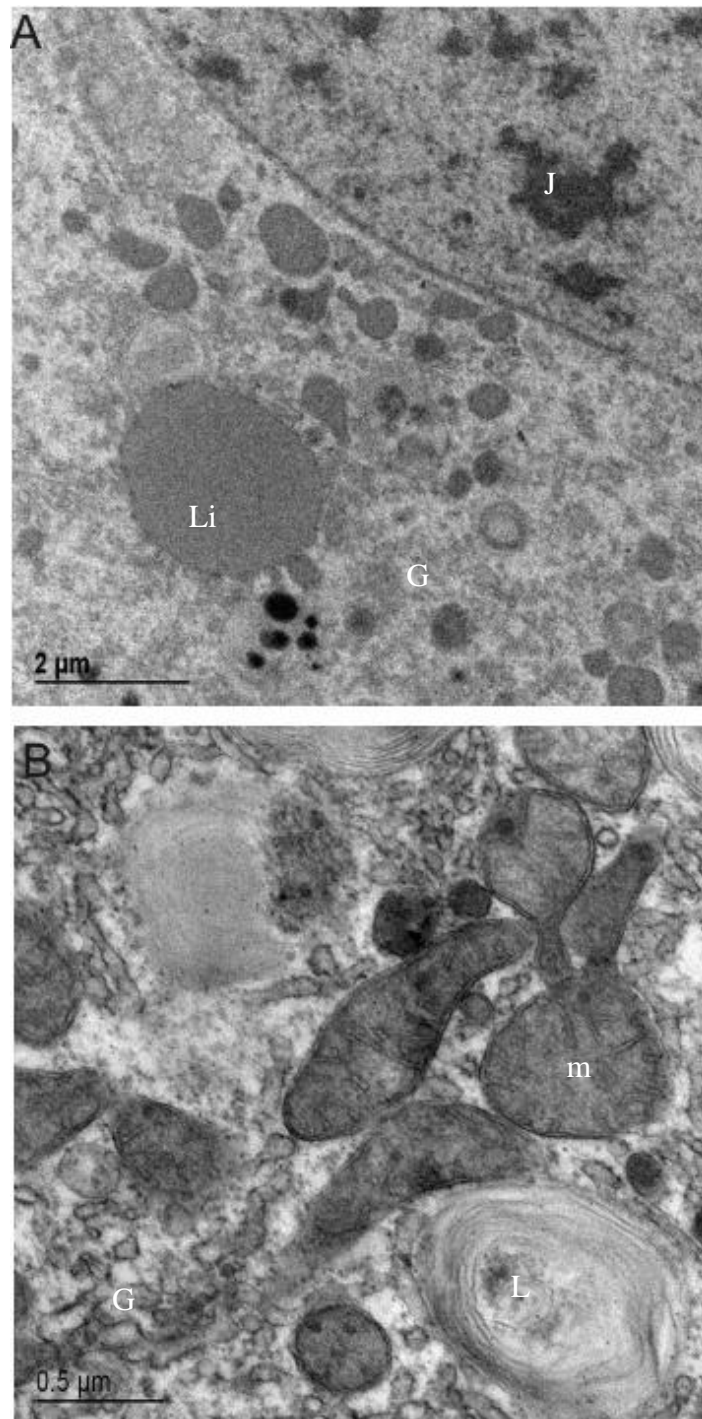
Slika 19. (A) Prečni prerez prebavne žleze s kupulastimi celicami B in s posameznimi piramidnimi celicami S in vmesnimi celicami S živali iz gojišča in kontrole poskusa (poskusi z nano-TiO₂, nano-ZnO in ZnCl₂). (B) Prečni prerez prebavne žleze, večja povečava

Figure 19. (A) Cross-section of the digestive gland with dome-shaped B cells and pyramidal-shaped cells and S cells from animals from the terrarium and the control group (experiments with nano-TiO₂, nano-ZnO and ZnCl₂). (B) Cross-section of the digestive gland, high magnification



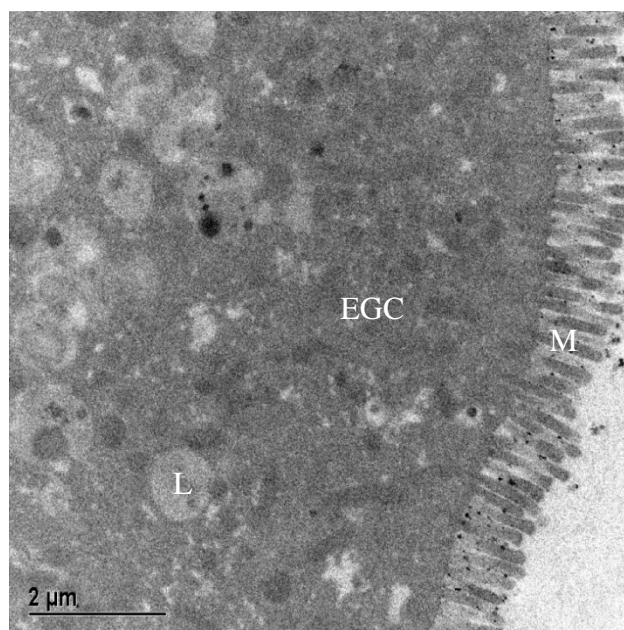
Slika 20. Ultrastruktura kupulastih celic s posameznimi piramidnimi celicami B prebavnih žlez živali iz terarija in kontrole poskusa (poskusi z nano-TiO₂, nano-ZnO in ZnCl₂). (A) Velike (B) in male celice (S). (B) Celica B z mikrovili (M), mitohondriji (m), GER (G)

Figure 20. Ultrastructure of dome-shaped and some pyramidal-shaped B cells of the digestive gland from animals from the terrarium and the control group (experiments with nano-TiO₂, nano-ZnO and ZnCl₂). (A) Large (B) and small cells (S). (B) B cell with microvilli (M), mitochondria (m), GER (G)



Slika 21. Ultrastruktura kupulastih celic B s posameznimi piramidnimi celicami prebavnih žlez živali iz terarija in kontrole poskusa (poskusi z nano-TiO₂, nano-ZnO in ZnCl₂). (A) Celica B, del jedra (J), lipidne kaplje (Li), GER (G). (B) Večja povečava celice B, mitohondriji (m), lamelarna telesa (L), GER (G)

Figure 21. Ultrastructure of dome-shaped and some pyramidal-shaped B cells of the digestive gland from animals from the terrarium and the control group (experiments with nano-TiO₂, nano-ZnO and ZnCl₂). (A) B cell, nucleus (J), lipid droplets (Li), GER (G). (B) Higher magnification of the B cell, mitochondria (m), lamellar bodies (L), GER (G)



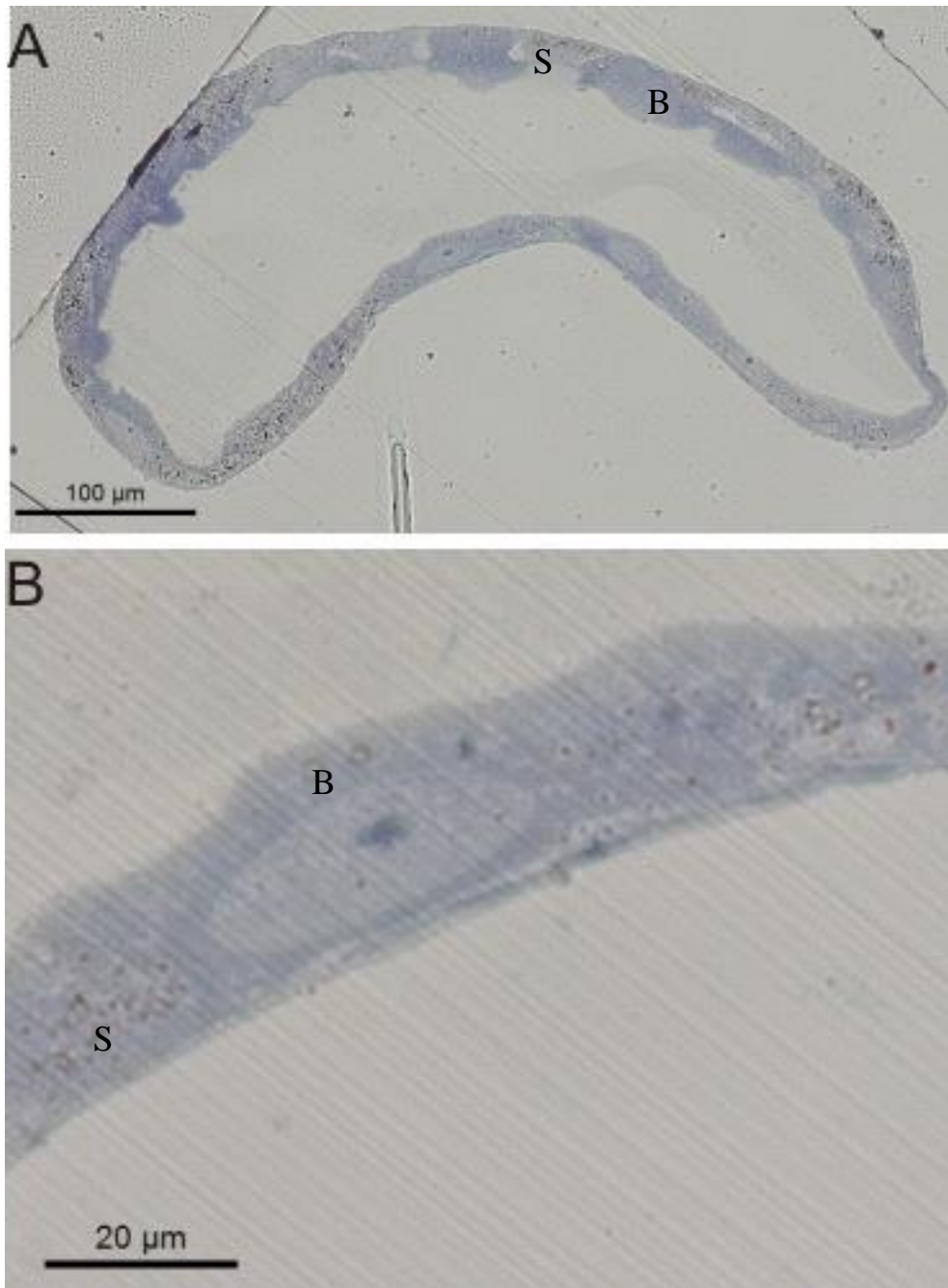
Slika 22. Ultrastruktura celice B prebavnih žlez živali iz kontrole poskusa z nano-Ag, mikrovili (M), elektronsko gosta citoplazma (EGC), lamelarna telesa (L)

Figure 22. Ultrastructure of the B cell digestive gland cells of animals from the control group with nano-Ag, microvillus (M), electron dense cytoplasm (EGC), lamellar bodies (L)

3.5.2 Ultrastrukturne značilnosti v celicah prebavnih žlez pri živalih iz poskusa z nano-TiO₂

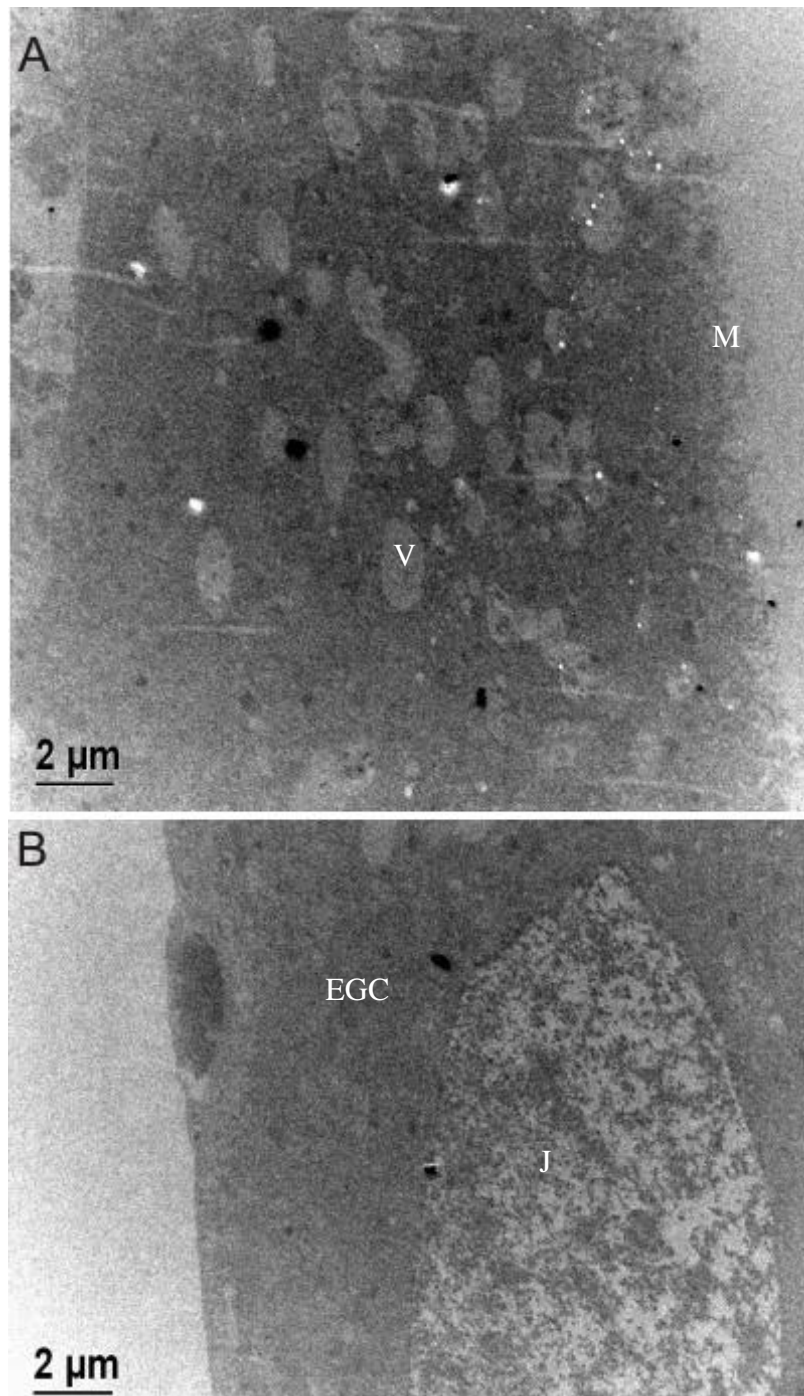
Pri živalih iz poskusa z nano-TiO₂ smo ugotavljali ultrastrukturne značilnosti v celicah B in celicah S v medianem delu prebavnih žlez. Celice živali iz poskusa z nano-TiO₂ smo primerjali s celicami živali, vzetih iz terarija pred poskusom z nano-TiO₂, in s celicami živali iz kontrole poskusa z nano-TiO₂. V primerjavi s celicami kontrolnih skupin so imele celice pri živalih, izpostavljenih nano-TiO₂, številne ultrastrukturne značilnosti, ki smo jih opazili pogosto ali vedno. Med živalmi, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam nano-TiO₂ (1 000 in 5 000 μg/g), v ultrastrukturi celic prebavnih žlez nismo opazili razlik. Pri dveh od šestih živali, ki so bile izpostavljene nano-TiO₂, smo opazili povsem sploščen epitelij in razpadle celice. Citoplazma teh celic je bila elektronsko gosta s številnimi avtofagnimi vakuolami z razpadlimi organeli, v celicah smo opazili tudi mrežasta jedra (sliki 23, 24). Pri drugih živalih so bile celice B piramidne oblike ali rahlo sploščene, celice S pa cilindrične in rahlo sploščene (slika 25(A)). V vseh celicah smo pogosto opazili poškodbe mikrovilov, dolge in razvejane mitohondrije ter elektronsko gosto citoplazmo.

Skoraj vedno smo v celicah opazili številna lamelarna telesa, GER v obliki veziklov in razširjenih cistern ter bolj naguban jedrni ovoj (sliki 25(B), 26, preglednici 3, 4).



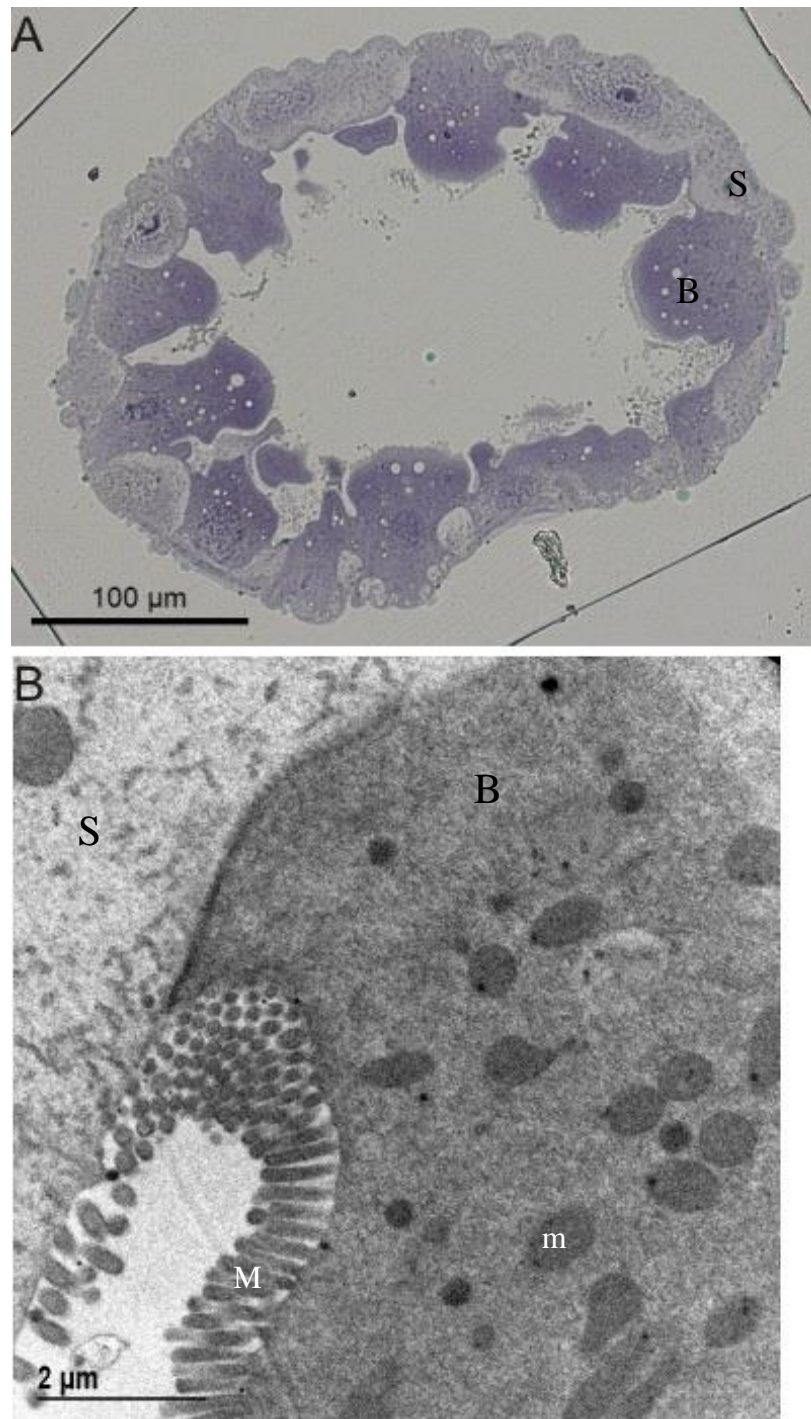
Slika 23. Epitelij iz ploščatih celic B in celic S prebavnih žlez živali, hranjene s hrano z nano-TiO₂ (1 000 µg/g)

Figure 23. Epithelium of totally flat B and S cells of the digestive gland of an animal that was feeding with food with nano-TiO₂ (1,000 µg/g)



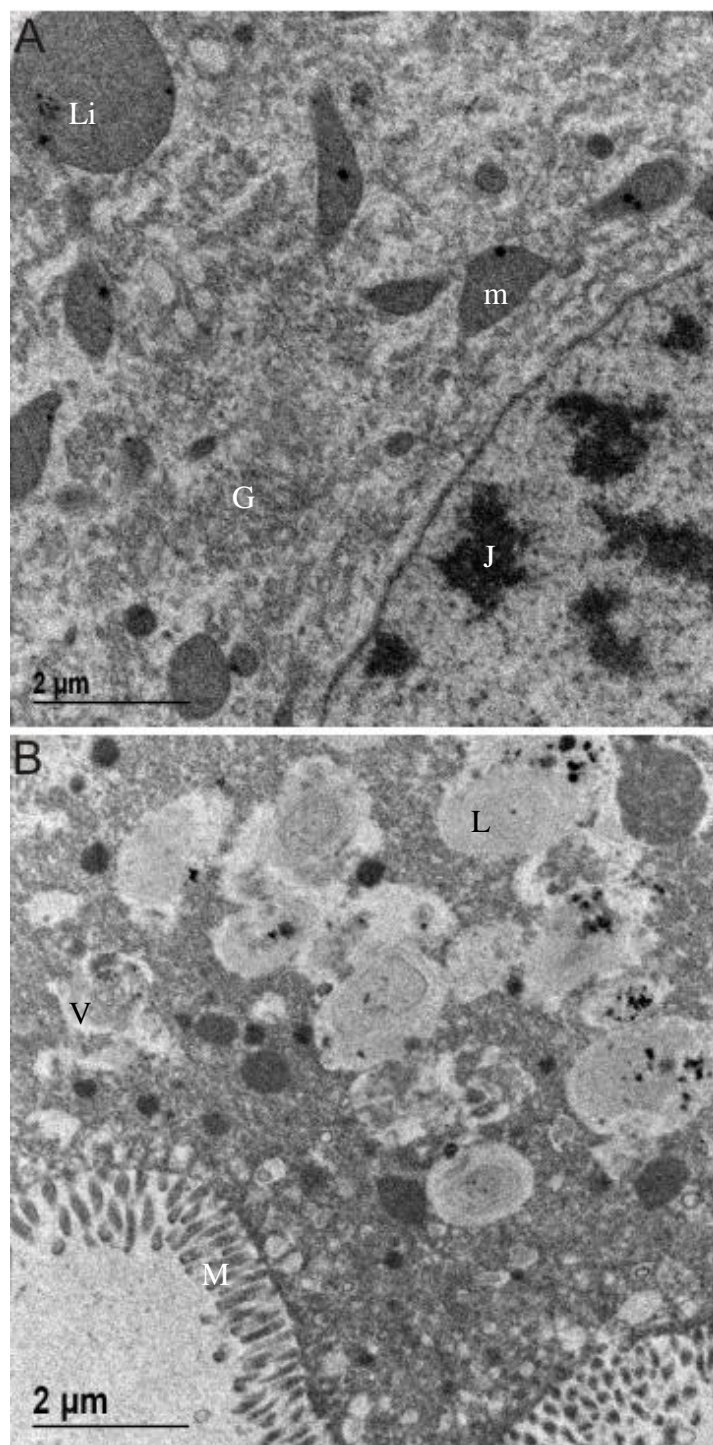
Slika 24. Ultrastruktura ploščate celice B prebavnih žlez živali, hranjene z nano-TiO₂ (1 000 µg/g). (A) Spremenjena oblika mikrovilov (M), avtofagne vakuole (V). (B) mrežasto jedro (J). Elektronsko gosta citoplazma (EGC)

Figure 24. Ultrastructure of flat B cells of the digestive gland of an animal that was feeding with food with nano-TiO₂ (1,000 µg/g). (A) Changes in shape of microvilli (M), autophagic vacuoles (V). (B) nucleus (J). Electron dense cytoplasm (EGC)



Slika 25. (A) Epitelij iz piramidnih ali rahlo sploščenih celic B in celic S prebavnih žlez živali, hranjene z nano-TiO₂ (1 000 μg/g). (B) Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic prebavne žleze živali, hranjene z nano-TiO₂. Temna celica B (B) z mikrovili (M) in mitohondriji (m), svetlejša celica S (S)

Figure 25. (A) Epithelium of pyramidal-shaped and slightly flat B cells and S cells of the digestive gland of an animal that was feeding with food with nano-TiO₂ (1,000 μg/g). (B) Ultrastructure of pyramidal-shaped B cells and slightly flat cells of the digestive gland. Dark B cell (B) with microvilli (M), mitochondria (m), lighter S cell (S)



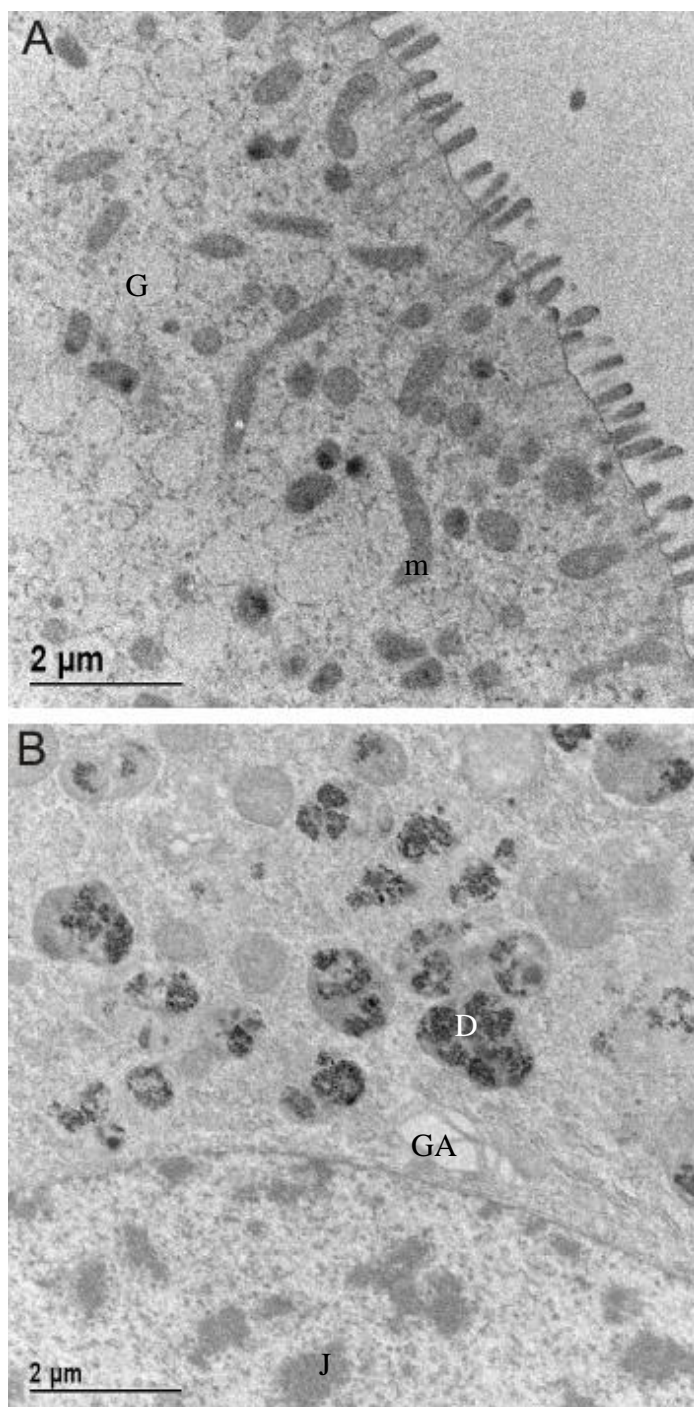
Slika 26. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic prebavnih žlez živali, hranjene z nano-TiO₂ (5 000 µg/g). (A) Velika celica B z GER (G), lipidno kapljico (Li) in mitohondriji (m) in jedrom (J). (B) Velika celica B z mikrovili (M), lamelnimi telesi (L) in avtofagnimi vakuolami (V)

Figure 26. Ultrastructure of pyramidal-shaped B cells and slightly flat cells of the digestive gland from an animal that was feeding with food with nano-TiO₂ (5,000 µg/g). (A) Large B cell with GER (G), lipid droplet (Li), mitochondria (m) and nucleus (J). (B) Large B cell with microvilli (M), lamellar bodies (L) and autophagic vacuoles (V)

3.5.3 Ultrastrukturne značilnosti v celicah prebavnih žlez pri živalih iz poskusa z nano-ZnO in ZnCl₂

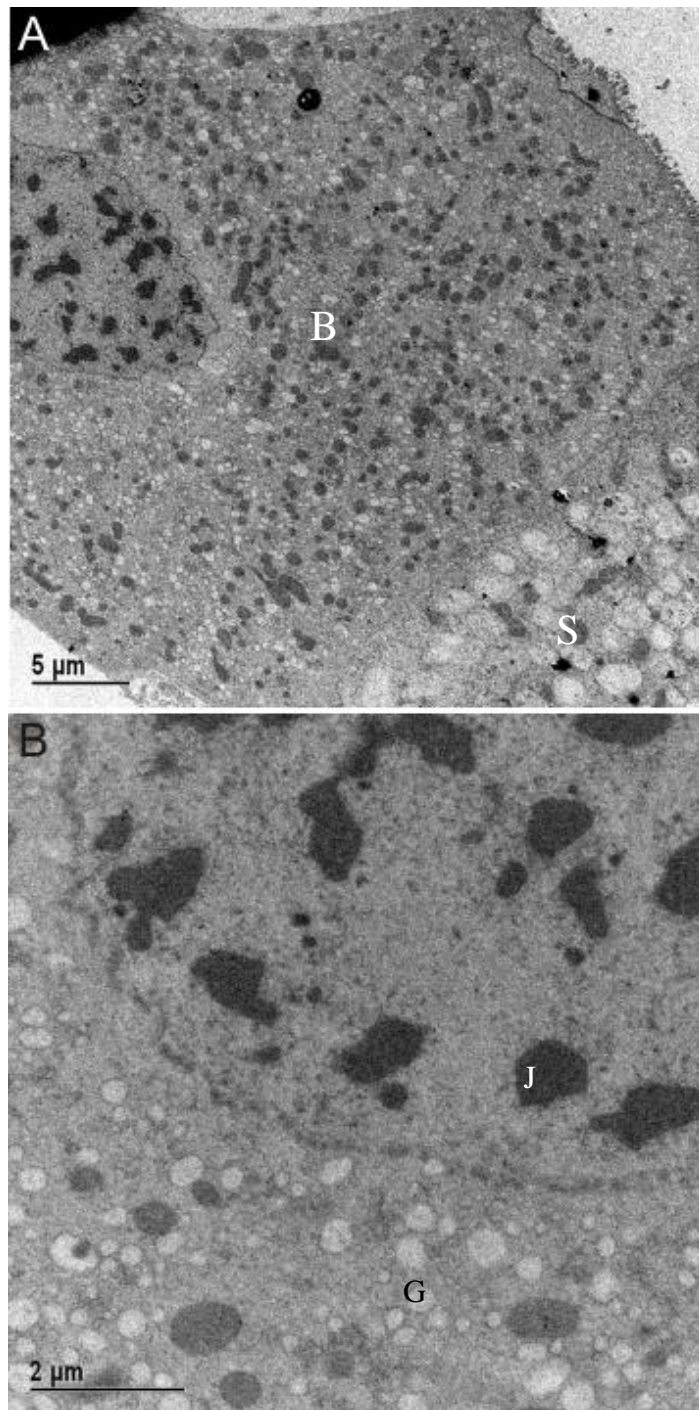
Pri živalih iz poskusa z nano-ZnO in ZnCl₂ smo ugotavljali ultrastrukturne značilnosti v celicah B in celicah S v medianem delu prebavnih žlez. Celice živali iz poskusa z nano-ZnO in ZnCl₂ smo primerjali s celicami živali, vzetih iz terarija pred poskusom z nano-ZnO in ZnCl₂, in s celicami živali iz kontrole poskusa z nano-ZnO. V primerjavi s temi celicami so imele celice pri živalih, izpostavljenih nano-ZnO ali ZnCl₂, številne ultrastrukturne značilnosti, ki smo jih opazili pogosto ali vedno. Pri živalih, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam nano-ZnO ali ZnCl₂ (2 000 in 5 000 µg/g), v ultrastrukturi celic prebavnih žlez nismo opazili razlik. Pri dveh od šestih živali, izpostavljenih nano-ZnO, smo opazili nizek epitelij in razpadle celice. Citoplazma v teh celicah je bila elektronsko gosta s številnimi avtofagnimi vakuolami z razpadlimi organeli, opazili pa smo tudi mrežasta jedra. Pri drugih živalih so bile celice B piramidne oblike ali rahlo sploščene, celice S pa cilindrične in rahlo sploščene. V vseh celicah smo pogosto opazili dolge in razvejane mitohondrije, elektronsko gosto citoplazmo ter EGD. Skoraj vedno smo v celicah opazili spremembe v obliki mikrovilov, številna lamelarna telesa, GER v obliki veziklov in razširjenih cistern ter bolj naguban jedrni ovoj (slike 27, 28, 29, 30, preglednici 3, 4).

Ob primerjavi celic živali, izpostavljenih nano-ZnO, in celic živali, izpostavljenih ZnCl₂, smo ugotovili razlike v ultrastrukturnih značilnostih celic. Pri celicah živali, ki so bile izpostavljene ZnCl₂, smo opazili manj ultrastrukturnih sprememb, in sicer je bil manj pogost GER v obliki veziklov in razširjenih cistern, poleg tega je bilo tudi manj celic z elektronsko gosto citoplazmo (sliki 29, 30, preglednici 3, 4).



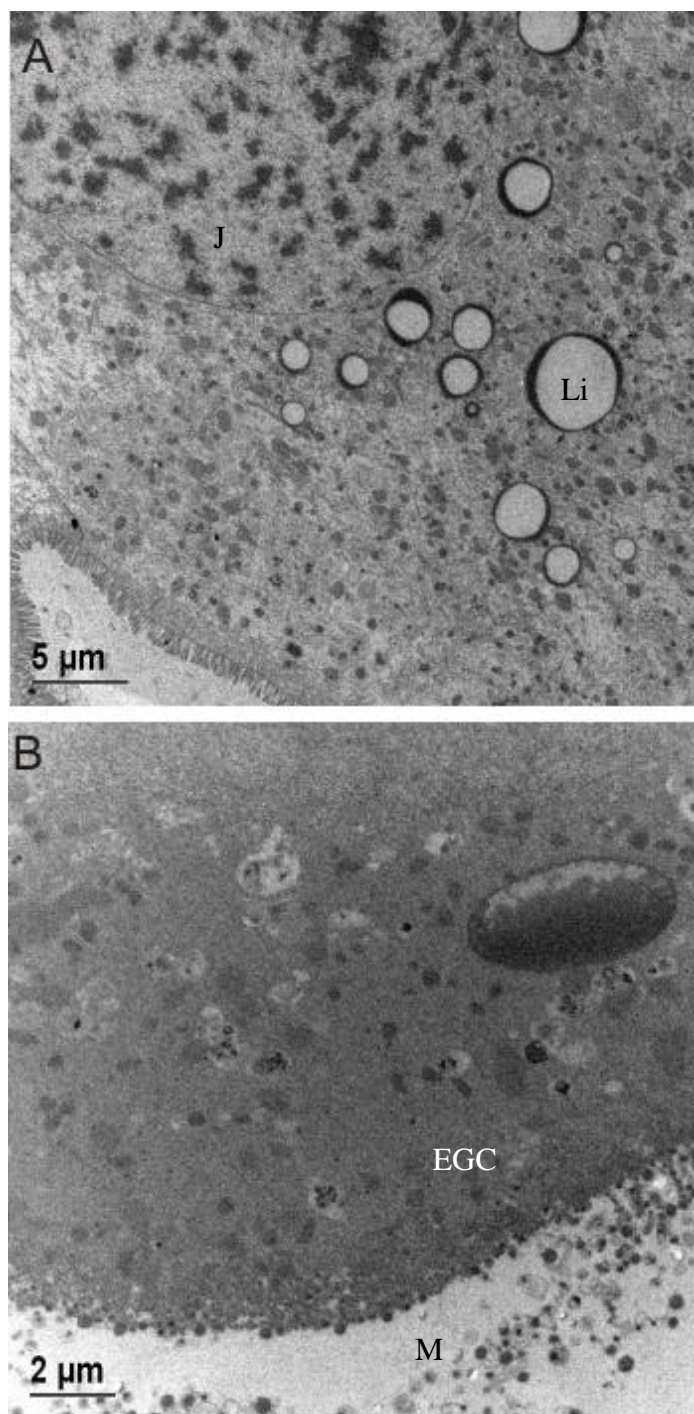
Slika 27. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic B prebavnih žlez živali, hranjenih z nano-ZnO. (A) Celica B, dolgi mitohondriji (m), vezikli GER (G) živali, hranjene z 2 000 µg nano-ZnO/g hrane. (B) Celica B, vezikli z EGD (D), diktiosomi (GA), del jedra (J) živali, hranjene s 5 000 µg nano-ZnO/g hrane

Figure 27. Ultrastructure of pyramidal-shaped and slightly flat B cells of the digestive gland from animals that were feeding with food with nano-ZnO. (A) B cell, long mitochondria (m), vesicles GER (G) of an animal that was feeding with 2,000 µg nano-ZnO/g of food. (B) B cell, vesicles with EGD (D), Golgi (GA), nucleus (J) of an animal that was feeding with 5,000 µg nano-ZnO/g of food



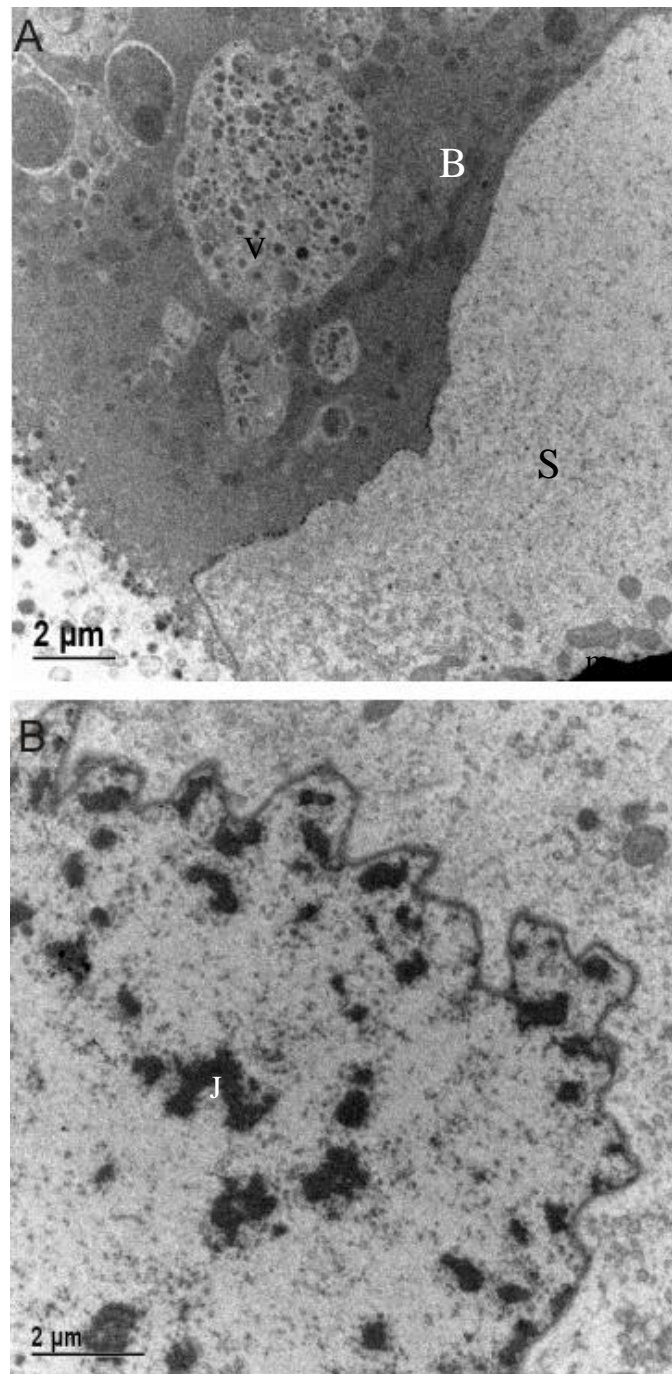
Slika 28. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic B in celic S prebavnih žlez živali, hranjene z nano-ZnO (5 000 µg/g). (A) Velika celica B (B) z vezikli, rahlo naguban jedrni ovoj, mala celica S (S) z GER v obliki veziklov (G). (B) večja povečava celice B, vezikli GER (G), del jedra (J)

Figure 28. Ultrastructure of pyramidal-shaped and slightly flat B cells and S cells of the digestive gland from an animal that was feeding with food with nano-ZnO (5,000 µg/g). (A) Large B cell (B) with vesicles (G), wrinkled nuclear envelope, small S cell (S) with vesicles GER (G). (B) High magnification of the B cell, vesicles GER (G), nucleus (J)



Slika 29. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic B prebavnih žlez živali hranjene z $ZnCl_2$ (2 000 $\mu g/g$). (A) Celica B z delno resorbiranimi lipidnimi kapljami (Li) in jedrom (J). (B) Celica B z reduciranimi mikrovili (M), delno resorbirana lipidna kaplja (Li), elektronsko gosto citoplazma (EGC)

Figure 29. Ultrastructure of pyramidal-shaped B cells and slightly flat cells of the digestive gland from an animal that was feeding with food with $ZnCl_2$ (2,000 $\mu g/g$). (A) B cell with partially resorbed lipid droplets (Li) and nucleus (J). (B) B cell with reduced microvilli (M), partially resorbed lipid droplet (Li), electron dense cytoplasm (EGC)

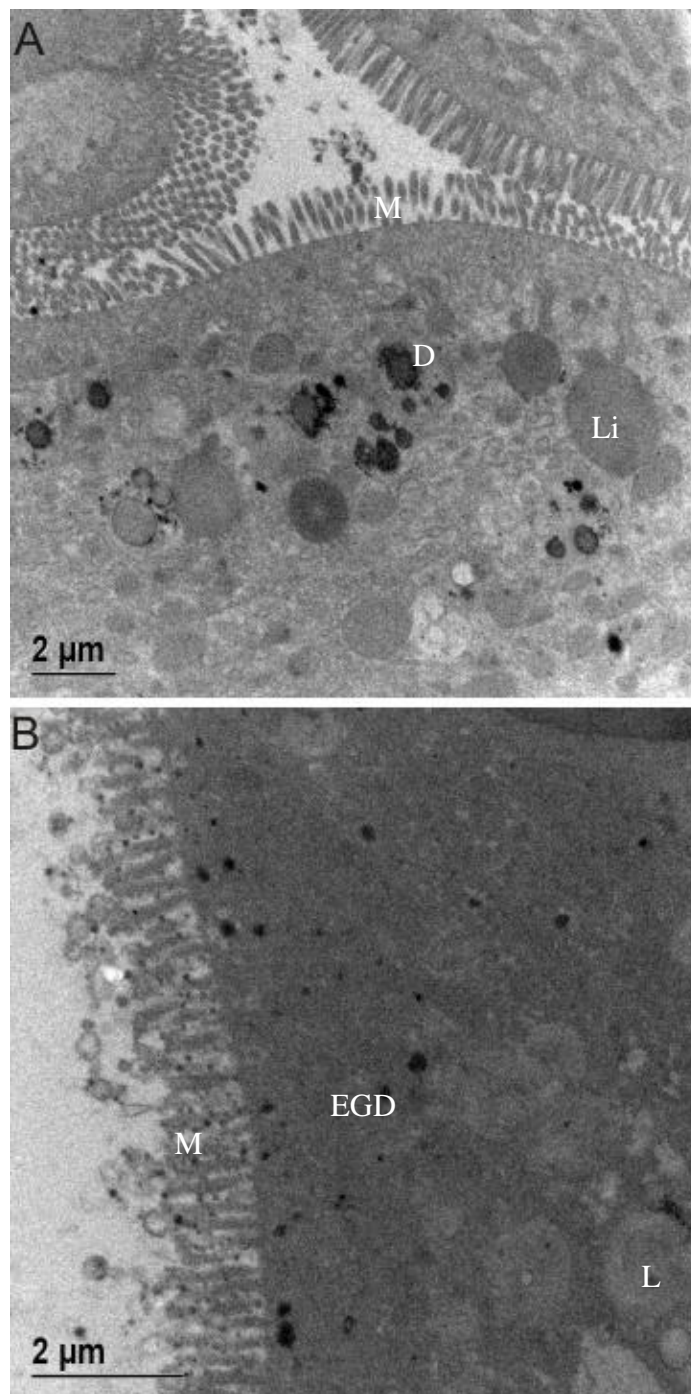


Slika 30. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic prebavnih žlez živali, hranjenih z $ZnCl_2$. (A) celica B (B) z velikimi vakuolami (V), celica S (S) s posameznimi mitohondriji (m) živali, hranjene z $2\,000\ \mu g\ ZnCl_2/g$ hrane. (B) Naguban jedrni ovoj v celici S (J) živali, hranjene s $5\,000\ \mu g\ ZnCl_2/g$ hrane

Figure 30. Ultrastructure of pyramidal-shaped B cells and slightly flat cells of the digestive gland from animals that were feeding with food with $ZnCl_2$. (A) B cell (B) with large vacuoles (V), S cell (S) with few mitochondria (m) of an animal that was feeding with $2,000\ \mu g\ ZnCl_2/g$ of food. (B) Wrinkled nuclear envelope in the S cell (J) of an animal that was feeding with $5,000\ \mu g\ ZnCl_2/g$ of food

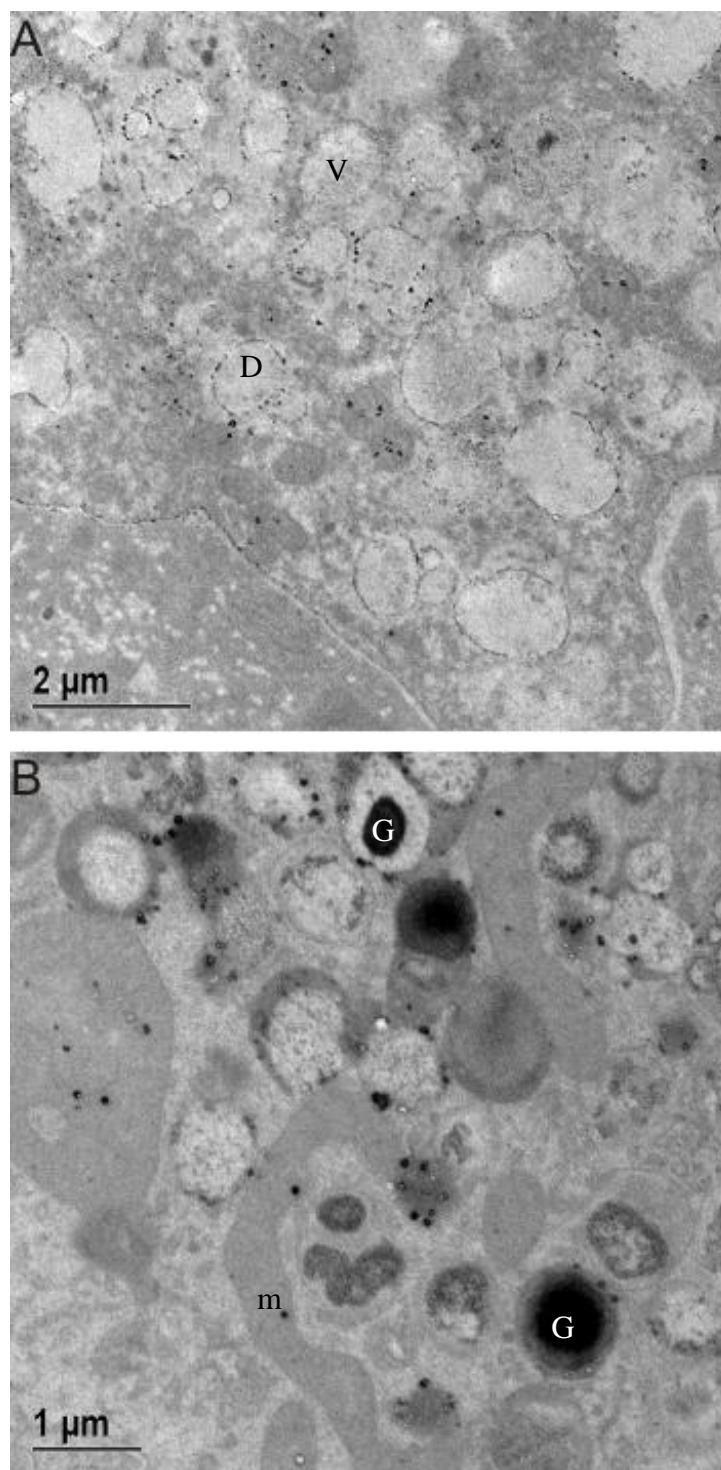
3.5.4 Ultrastrukturne značilnosti v celicah prebavnih žlez pri živalih iz poskusa z nano-Ag

Pri živalih iz poskusa z nano-Ag smo ugotavljali ultrastrukturne značilnosti v celicah B in celicah S v medianem delu prebavne žleze. Celice živali iz poskusa z nano-Ag smo primerjali s celicami živali, vzetih iz terarija pred poskusom z nano-Ag, in živali iz kontrole poskusa z nano-Ag. V primeru poskusa z nano-Ag so imele celice živali iz terarija in celice živali iz kontrole poskusa z nano-Ag številne ultrastrukturne posebnosti (spremembe v obliki mikrovilov, številna lamelarna telesa, GER v obliki veziklov in razširjenih cistern, dolge in razvejane mitohondrije, elektronsko gosto citoplazmo, bolj naguban jedrni ovoj ter EGD). V primerjavi s temi celicami so imele celice živali, izpostavljenih nano-Ag, izrazite ultrastrukturne značilnosti, ki smo jih v celicah opazili pogosto ali vedno. Pri živalih, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam nano-Ag (1 000 in 5 000 $\mu\text{g/g}$), v ultrastrukturi celic prebavne žleze nismo opazili razlik. Pri dveh od šestih živali smo opazili popolnoma sploščen epitelij in razpadle celice. Citoplazma teh celic je bila elektronsko gosta s številnimi avtofagnimi vakuolami z razpadlimi organeli, opazili pa smo tudi razpad jedra. Pri drugih živalih, hranjenih s hrano z nano-Ag, so bile celice B piramidne oblike ali rahlo sploščene, celice S pa cilindrične in rahlo sploščene. V vseh celicah prebavnih žlez smo pogosto opazili spremembe v obliki mikrovilov, skoraj vedno smo opazili dolge in razvejane mitohondrije, elektronsko gosto citoplazmo, številna lamelarna telesa, GER v obliki veziklov in razširjenih cistern ter bolj naguban jedrni ovoj (slike 31, 32, 33, preglednici 3, 4).



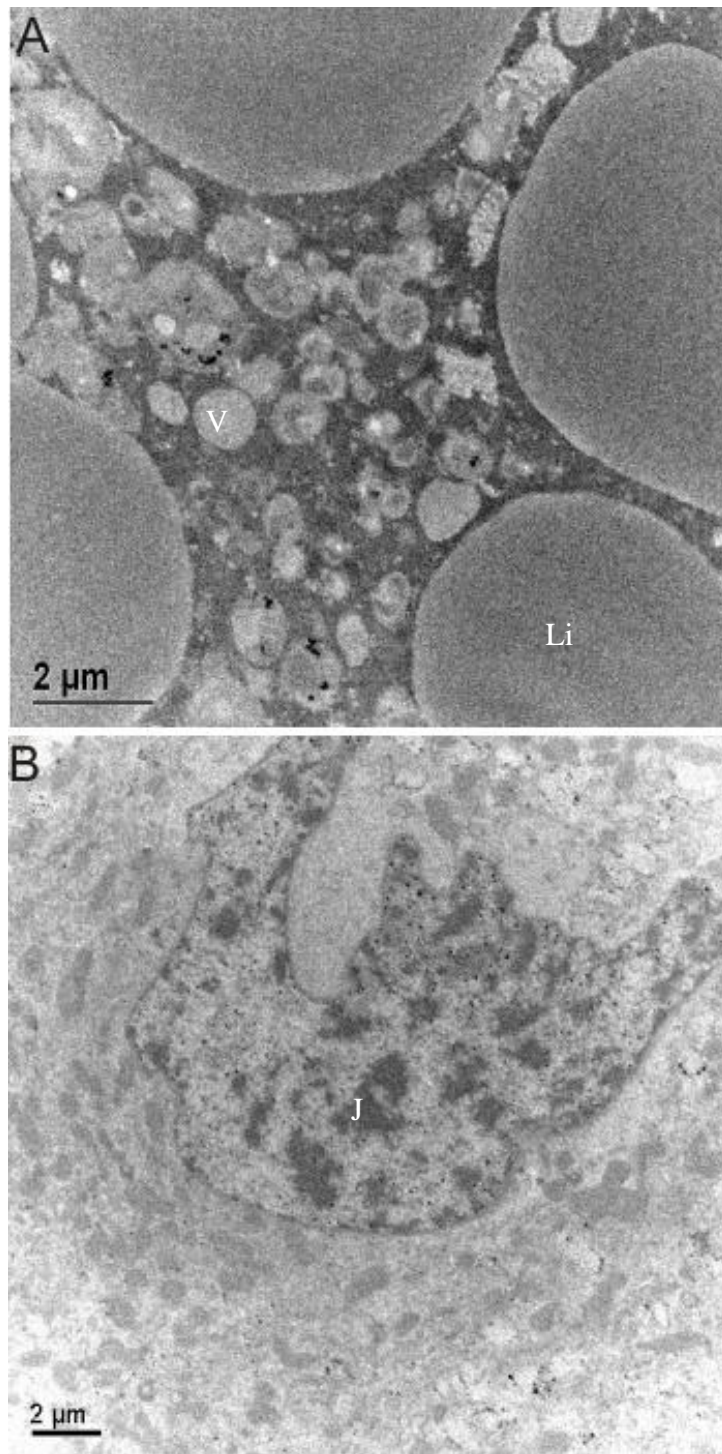
Slika 31. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic B prebavnih žlez živali, hranjene z nano-Ag (1 000 µg/g). (A) Celica B z mikrovili (M), vezikli z EDG (D), lipidna kaplja (Li). (B) Celica B, gosta vezikularizacija na konicah mikrovilov (M), EGD (D), lamelarna telesa (L)

Figure 31. Ultrastructure of pyramidal-shaped and slightly flat B cells of the digestive gland from an animals that was feeding with food with nano-Ag (1,000 µg/g). (A) B cell with microvilli (M), vesicles with EDG (D), lipid droplets (Li). (B) B cell, dense vesicularization at the end of microvilli (M), EGD (D), lamellar bodies (L)



Slika 32. Ultrastruktura cilindričnih celic S prebavnih žlez živali, hranjene z nano-Ag (1 000 µg/g). (A) Celica S z GER v obliki veziklov (V). (B) Celica S z granulami (G), dolgi kačasti mitohondriji (m)

Figure 32. Ultrastructure of cylindrical-shaped S cells of the digestive gland from an animal that was feeding with food with nano-Ag (1,000 µg/g). (A) S cell with GER in vesicles (V). (B) S cell with granules (G), long mitochondria (m)



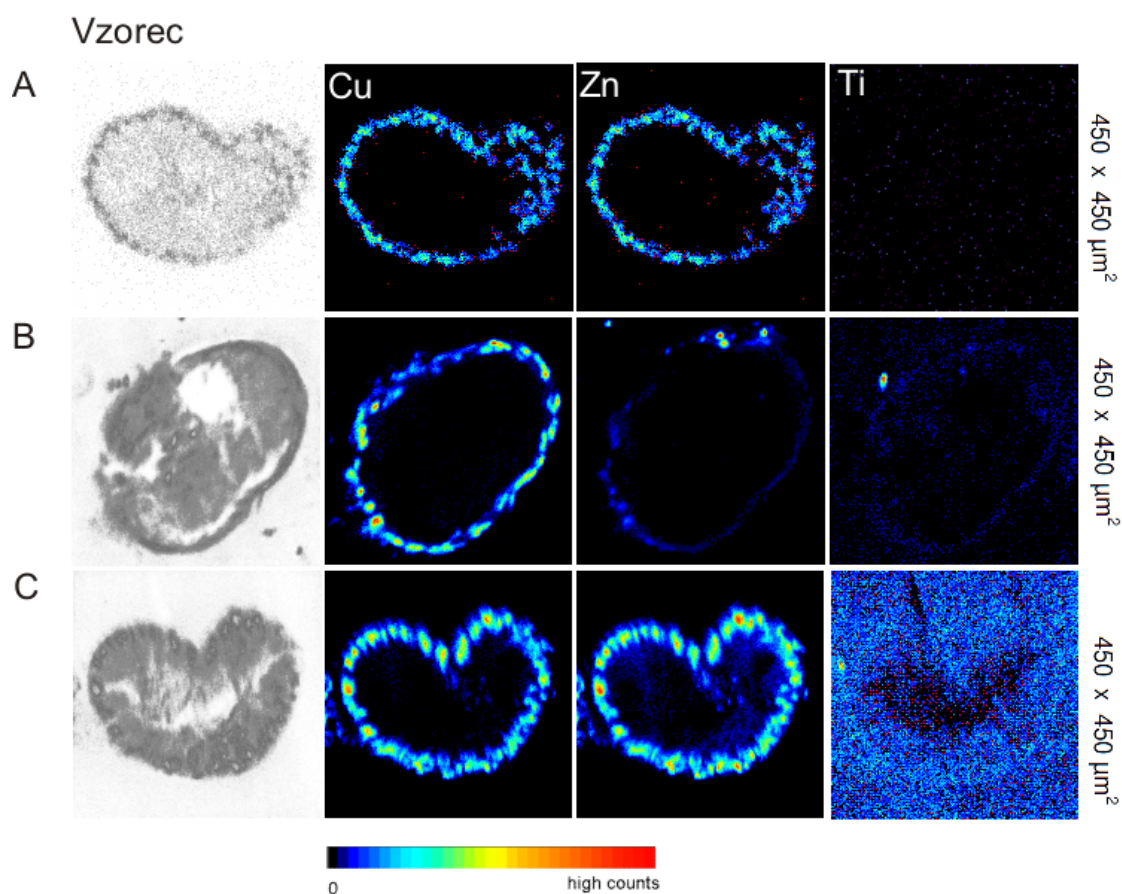
Slika 33. Ultrastruktura piramidnih ali rahlo sploščenih celic B prebavnih žlez živali, hranjene z nano-Ag (5 000 µg/g). (A) celica B z lipidnimi kapljami (Li), med njimi številne vakuole z EDG (V). (B) Naguban jedrni ovoj in jedro (J) v celici B

Figure 33. Ultrastructure of pyramidal-shaped B cells and slightly flat cells of the digestive gland from an animal that was feeding with food with nano-Ag (5,000 µg/g). (A) B cell with lipid droplets (Li), vacuoles (V). (B) Wrinkled nuclear envelope and nucleus (J) in B cell

3.6 ELEMENTI V ORGANIZMU ALI V CELICAH PREBAVNIH ŽLEZ PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM

3.6.1 Vsebnost nano-TiO₂ v celicah prebavnih žlez

Z mikro-PIXE analizo prebavnih žlez smo pri nekaterih živalih, ki so bile hranjene z najvišjo koncentracijo nano-TiO₂ (5 000 µg/g), ugotovili prisotnost majhne količine nanodelcev titana v celicah. Le-ta je bil razporejen enakomerno po celicah. V celicah prebavnih žlez kontrolnih živali ga nismo našli (slika 34).

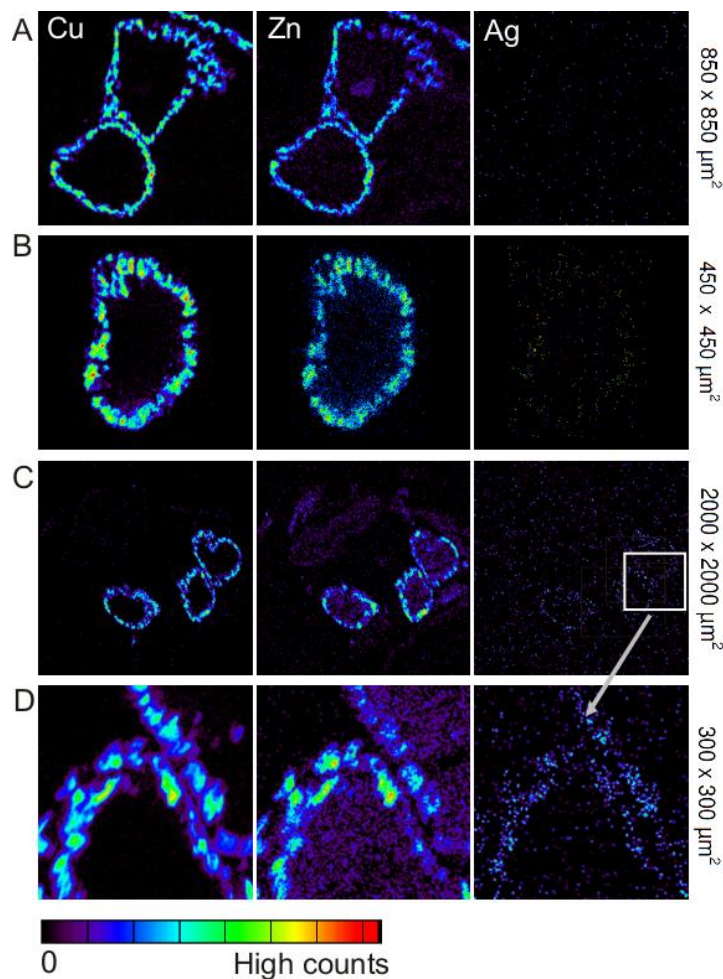


Slika 34. Elementna mapa mikro-PIXE Cu, Zn in Ti pri *P. scaber*: (A) prečni prerez prebavne žleze kontrolne živali; (B) prečni prerez prebavne žleze živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-TiO₂ (5 000 µg nano-TiO₂/g hrane); (C) prečni prerez prebavne žleze živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-TiO₂ (5 000 µg nano-TiO₂/g hrane)

Figure 34. Micro-PIXE qualitative elemental maps of Cu, Zn and Ti of *P. scaber*: (A) cross-section of a digestive gland of a control animal; (B) cross-section of a digestive gland of an animal exposed to food dosed with 5,000 µg nano-TiO₂/g of food; (C) cross-section of a digestive gland of an animal exposed to food dosed with 5,000 µg nano-TiO₂/g of food

3.6.2 Vsebnost srebrovih ionov v celicah prebavnih žlez

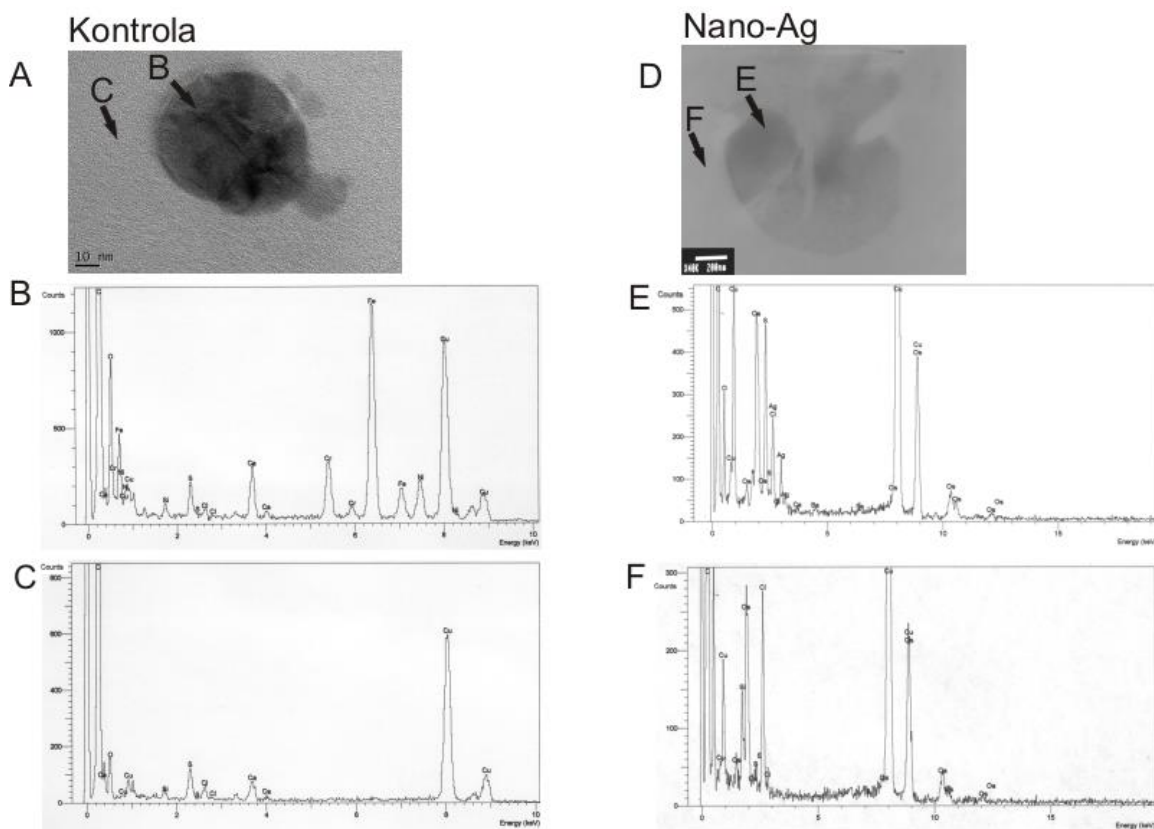
Z mikro-PIXE analizo smo ugotovili prisotnost srebrovih ionov v celicah prebavnih žlez živali, ki so bile hranjene s hrano z nano-Ag. Pri živalih iz kontrole jih v celicah nismo našli. Razporeditev srebrovih ionov v celicah prebavnih žlez se ujema z razporeditvijo bakra in cinka, ki se nahajata v malih celicah S. Iz tega sklepamo, da se nahajajo v celicah S (slika 35).



Slika 35. Elementna mapa mikro-PIXE Cu, Zn in Ag pri *P. scaber*: (A) prečni prerez prebavne žleze kontrolne živali; (B) prečni prerez prebavne žleze živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-Ag (1 000 μg nano-Ag/g hrane); (C) prečni prerez prebavne žleze živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-Ag (5 000 μg nano-Ag/g hrane); (D) prečni prerez prebavne žleze živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-Ag (5 000 μg nano-Ag/g hrane)

Figure 35. Micro-PIXE qualitative elemental maps of Cu, Zn and Ti of *P. scaber*: (A) cross-section of a digestive gland of a control animal; (B) cross-section of a digestive gland of an animal exposed to food dosed with 1,000 μg nano-Ag/g of food; (C) cross-section of a digestive gland of an animal exposed to food dosed with 5,000 μg nano-Ag/g of food; (D) cross-section of a digestive gland of an animal exposed to food dosed with 5,000 μg nano-Ag/g of food;

Enako območje, v kateri je bila ugotovljena prisotnost srebrovih ionov, smo pregledali tudi z analizo TEM/EDX. Srebrove ione smo našli v celicah S v bakrovih granulah (granule B), ki shranjujejo kovine (Hopkin in Martin, 1982), in sicer le v celicah živali, ki so bile hranjene z nano-Ag. Zunaj granul srebrovih ionov nismo našli, prav tako jih nismo našli nikjer v celicah prebavnih žlez kontrolnih živali. Razlik v videzu granul v celicah živali iz kontrole in v celicah živali, ki so bile izpostavljene hrani z nano-Ag, ni bilo (slika 36).



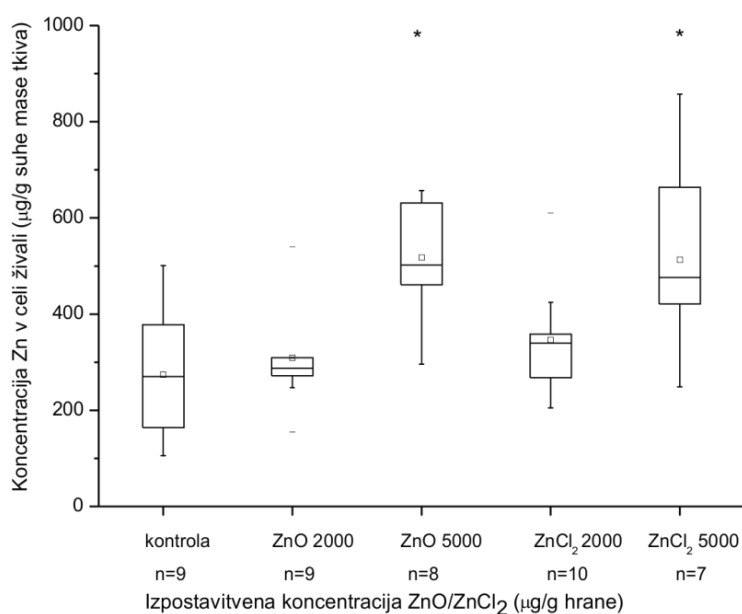
Slika 36. Granula v mali celici: TEM-EDX Ag. TEM mikrografija granule B. (A) granula v celici živali iz kontrole; (D) granula v celici živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-Ag (5 000 $\mu\text{g/g}$ hrane). B, C, D, F. EDX/TEM analiza, opravljena na granuli (B in E \rightarrow) ter v citoplazmi (C in F \rightarrow). Elementna mapa granula v celici kontrolne živali (B, C) in elementna mapa granula v celici živali, ki se je prehranjevala s hrano z nano-Ag (5 000 $\mu\text{g/g}$ hrane) (E, F)

Figure 36. A, D. TEM micrograph of B-type metal granules. (A) control animal, (D) animal fed with aggregates of nano-Ag dosed food (5,000 $\mu\text{g/g}$ food). B, C, D, F. EDX/TEM analyses were performed in granules (B and E \rightarrow) and outside in the cytoplasm (C and F \rightarrow). Elemental map of selected granule in the digestive gland S cell of a control animal (B, C) and animal fed with aggregates of nano-Ag dosed food (5,000 $\mu\text{g/g}$ of food) (E, F)

3.6.3 Vsebnost celokupnega cinka v organizmu

3.6.3.1 Celokupna vsebnost cinka v telesu

Po 28-dnevnem hranjenju organizma *P. scaber* s hrano z nano-ZnO ali ZnCl₂ pri nižji koncentraciji (2 000 µg/g) nismo ugotovili višje koncentracije celokupnega cinka v telesu v primerjavi s kontrolno skupino. Statistično značilno višjo koncentracijo celokupnega cinka v telesu v primerjavi s kontrolno skupino smo ugotovili le pri višji koncentraciji (5 000 µg nano-ZnO/g in 5 000 µg ZnCl₂/g). Koncentracija celokupnega cinka je bila značilno različna še med skupinama ZnO 2 000 µg/g in ZnO 5 000 µg/g ter tudi med ZnCl₂ 2 000 µg/g in ZnCl₂ 5 000 µg/g (slika 37).



Slika 37. Izračunana celokupna koncentracija Zn v celi živali *P. scaber* po 28-dnevnem hranjenju z nano-ZnO ali ZnCl₂ (koncentracij 2 000 in 5 000 µg/g). Na x-osi so označene izpostavitvene koncentracije nano-ZnO in ZnCl₂, n – število živali v skupini. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolo so označene z zvezdicami (t-test; *p < 0,05)

Figure 37. Concentration of Zn in total body of animals *P. scaber* after 28 days of feeding with food with nano-ZnO or ZnCl₂ (2,000 and 5,000 µg/g). On x-axis are exposures to nano-ZnO and ZnCl₂, n – number of animals in the group. Statistical differences between exposed and control animals are assigned asterisks (t-test; *p < 0.05)

4. RAZPRAVA IN SKLEPI

4.1 RAZPRAVA

V doktorski disertaciji smo preučevali vplive agregatov nanodelcev (TiO_2 , ZnO in Ag) in ZnCl_2 na modelnem organizmu *P. scaber* na (ultra) strukturne spremembe v celicah prebavnih žlez ter kopičenje kovin v prebavnih žlezah oziroma v organizmu. Po 14-dnevnem prehranjevanju s hrano, ki so ji bili dodani posamezni nanodelci, smo opazovali debelino epitelija, količino lipidnih kapelj ter predvsem ultrastrukturne značilnosti in spremembe celic prebavnih žlez. Na podlagi debeline epitelija in količine lipidnih kapelj v celicah B smo ocenili tudi fiziološko stanje živali. Ugotavljali smo akumulacijo Ti in Ag v celicah prebavnih žlez. Akumulacijo Zn (iz nano- ZnO in ZnCl_2) smo po 28 dnevih prehranjevanja ugotavljali v telesu cele živali. V času prehranjevalnih poskusov smo ugotavljali tudi spremembe v prehranjevanju, smrtnosti in spremembe mase živali.

Povzetek rezultatov naših poskusov z nanodelci in ZnCl_2 je predstavljen v preglednici 5. Vse parametre testiranih živali smo vedno primerjali s kontrolo poskusa. Preživetje živali in sprememba mase se v poskusih nista spremenila pri nobenem od testiranih nanodelcev. Prav tako se ni spremenilo prehranjevanje živali pri hranjenju s hrano z najvišjo koncentracijo nano-TiO, nano- ZnO ali nano-Ag. Pri ZnCl_2 , ki je bil dodan k hrani, je bila sprememba v prehranjevanju opazna že pri nižji koncentraciji 2 000 $\mu\text{g/g}$. Tanjši epitelij celic prebavnih žlez smo opazili le pri živalih, ki so bile hranjene s hrano z nano- ZnO (koncentracije 2 000 $\mu\text{g/g}$). Živali, ki so jedle hrano z nano-Ag, so imele debelejši epitelij prebavne žleze kot živali iz kontrole poskusa. Intenzivno resorpcijo lipidnih kapelj v celicah B prebavnih žlez smo opazili le pri živalih, ki so se prehranjevale s hrano z ZnCl_2 (koncentracije 5 000 $\mu\text{g/g}$). Proti pričakovanju pa smo pri živalih, ki so bile hranjene s hrano, ki ji je bil dodan nano-Ag, v celicah prebavnih žlez opazili več lipidnih kapelj v primerjavi s celicami živali iz kontrole. Fiziološko stanje živali se je spremenilo le pri živalih, ki so bile hranjene s hrano z nano- ZnO (koncentracije 5 000 $\mu\text{g/g}$). Ultrastruktura celic živali, ki so se hranile z nanodelci, je bila večinoma spremenjena v primerjavi s celicami živali iz kontrole poskusa, razen v primeru nano-Ag, kjer so bile kontrolne živali verjetno v fazi stresa.

Preglednica 5. Povzetek vseh rezultatov poskusov s *P. scaber*

Table 5. Summarised results of experiments with *P. scaber*

| | Nano-TiO₂ | Nano-ZnO | ZnCl₂ | Nano-Ag |
|---|-----------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------------|
| Koncentracije (µg/g hrane) | 1 000, 5 000 | 2 000, 5 000 | 2 000, 5 000 | 1 000, 5 000 |
| Trajanje poskusa | 14 dni | 14 dni (28 dni-AAS) | 14 dni | 14 dni |
| LOEC preživetje, sprememba teže (µg/g hrane) | > 5 000 | > 5 000 | > 5 000 | > 5 000 |
| LOEC prehranjevanje | > 5 000 | > 5 000 | 2000 | > 5 000 |
| LOEC debelina epitelija | > 5 000 | 2000 | > 5 000 | > 5 000 |
| LOEC količina lipidnih kapelj | > 5 000 | 5 000 | > 5 000 | > 5 000 |
| LOEC fiziološko stanje živali | > 5 000 | 5 000 | > 5 000 | > 5 000 |
| LOEC ultrastrukture celic prebavnih žlez | 1 000 | 2 000 | 2 000 | 1 000 |
| Akumulacija - mikro-PIXE | Prisotnost Ti (5 000µg/g) | | | Prisotnost Ag (1 000 µg/g) |
| - AAS | | Akumulacija Zn | Akumulacija Zn | |

LOEC – najnižja opažena koncentracija, ki je povzročila spremembo

4.1.1 Prehranjevanje, smrtnost in sprememba mase

V prehranjevalnih poskusih s posameznimi nanodelci ali raztopino ZnCl₂ se smrtnost živali ni povečala, prav tako se ni spremenila masa živali. Stopnja prehranjevanja živali se v poskusih, pri katerih smo hrani dodali povišane koncentracije različnih nanodelcev (nano-TiO₂, nano-ZnO in nano-Ag), ni spremenila niti pri najvišji testirani koncentraciji (5 000 µg nanodelcev/g). Pri ZnCl₂ se je stopnja prehranjevanja znižala že pri koncentraciji 2 000 µg/g.

V literaturi je bilo že večkrat opisano zmanjšanje stopnje prehranjevanja kopenskih rakov enakonožcev zaradi povišane koncentracije kovin v hrani. Upad prehranjevanja pri vrsti *P. scaber* je po 5 tednih povzročila koncentracija 1 070 in 1 950 μg cinka/g suhe mase hrane (Žnidaršič in sod., 2003) oziroma 2 000 μg cinka/g suhe mase hrane prav tako po 5 tednih (Drobne in Hopkin, 1995) in 5 400 $\mu\text{g}/\text{g}$ po 14 dnevih (Zidar in sod., 2003). Prav tako so upad prehranjevanja pri raku *P. scaber* zaradi prehranjevanja s hrano s kovinami v študijah ugotovili tudi Zidar in sod. (2005, 2009). V primeru ZnCl_2 se naši rezultati ujemajo z zgornjimi, v nasprotju s tem pa pri nano-ZnO ni prišlo do upada prehranjevanja niti pri najvišji koncentraciji (5 000 μg nano-ZnO/g suhe mase hrane). Prav tako ni prišlo do upada prehranjevanja pri drugih dveh testiranih nanodelcih (nano-TiO₂ ali nano-Ag). Naši rezultati glede nano-TiO₂ se ujemajo z rezultati študij na *P. scaber*, kjer po 14-dnevni izpostavitvi s 1 000 μg TiO₂/g ali 5 000 μg TiO₂/g ni prišlo do sprememb v prehranjevanju, masi in smrtnosti živali (Valant in sod., 2011; Novak in sod., 2012).

Uporabljene koncentracije (1 000, 2 000 in 5 000 μg posameznih nanodelcev/g) nanodelcev nimajo kvarnega delovanja na prehranjevanje, smrtnost in maso živali, saj se v 14-dnevnih prehranjevalnih poskusih s *P. scaber* ti parametri niso spremenili. Ker so to mere strupenosti (Williams in sod., 2000), lahko zaključimo, da le-ti nanodelci pod temi testiranimi pogoji niso strupeni.

4.1.2 Debelina epitelija in količina lipidnih kapelj v celicah prebavnih žlez

Živali, ki so se prehranjevale s hrano s koncentracijo nano-ZnO 2 000 $\mu\text{g}/\text{g}$, so imele nižji epitelij prebavnih žlez v primerjavi z epitelijem iz kontrole poskusa. Pri *P. scaber* je bilo opisano znižanje epitelija prebavne žleze pri živalih, ki so bile izpostavljene hrani z višjo vrednostjo Zn (s koncentracijami 5 000 in 10 000 μg Zn/g hrane) (Drobne in Štrus, 1996) in hrani z višjo vrednostjo Zn in Cd (1 070 in 1 950 μg Zn/g hrane, 52 in 300 μg Cd/g hrane) v 5-tedenskih prehranjevalnih poskusih (Žnidaršič in sod., 2003). Prav tako je bilo opisano znižanje epitelija prebavne žleze pri *P. scaber* po 14-dnevnem stradanju (Lešer in sod., 2008) in pri *Ligia italica* po 10-dnevnem stradanju (Štrus in sod., 1985). V naših poskusih so celice prebavnih žlez nekaterih živali (približno 20 % živali), ki so se prehranjevale s hrano z nanodelci ali ZnCl_2 , imele zelo znižan epitelij (vrednosti med 1–2). Celice teh živali so imele elektronsko gosto citoplazmo, jedro z mrežastim vzorcem kromatina in številne vakuole z razgrajenimi organeli, kar nakazuje nekrozo pri celicah. Glede na to, da so bile celice v medianem delu prebavnih žlez nekrotske in zelo spremenjene, ter tudi glede na merila iz Lešer in sod. (2008) (nizek epitelij in zmanjšanje

količine lipidnih kapelj predstavljajo živali pod stresom) tega ne moremo pripisati variabilnosti celic in živali, ampak so te spremembe najverjetneje nastale zaradi stresnih razmer, ki so nastale zaradi prehranjevanja živali s posameznimi nanodelci ali $ZnCl_2$.

V poskusih smo v celicah B prebavnih žlez pri 31 % živali, ki so bile hranjene s hrano z dodanimi nanodelci ali $ZnCl_2$, opazili zelo znižano količino lipidnih kapelj. Živali iz terarija so imele v celicah B prebavnih žlez večinoma veliko lipidnih kapelj (ocena 5 ali 4, izjemoma 3). Zmanjšanje ali popolna odsotnost lipidnih kapelj je bila opisana v celicah prebavnih žlez pri *P. scaber* po 14-dnevnem stradanju (Lešer in sod., 2008) in v celicah pri živalih, ki so 5 tednov jedle hrano z višjo koncentracijo cinka ali kadmija (Žnidaršič in sod., 2003). Podatki iz literature opisujejo zmanjšanje količine lipidnih kapelj zaradi stradanja ali izpostavljenosti kovinam, pesticidom kot posledica odgovora na stresne razmere, in navajajo, da so lipidi v celicah prebavnih žlez glavni vir energije med stradanjem (Lešer in sod., 2008). Glede na to, da se je količina lipidov v celicah prebavnih žlez zelo zmanjšala pri skoraj eni tretjini živali, ki so bile izpostavljene nanodelcem ali $ZnCl_2$, se je to zgodilo zaradi prehranjevanja živali s posameznimi nanodelci ali $ZnCl_2$.

4.1.3 Sprememba fiziološkega stanja živali

Pri vsaki živali smo opisali tudi fiziološko stanje na podlagi ocene debeline epitelija in ocene količine lipidnih kapelj v celicah B prebavne žleze (Jemec in sod., 2012). Vitalnost živali se je poslabšala pri živalih, ki so bile izpostavljene hrani z nano- TiO_2 (koncentracije 5 000 $\mu g/g$), in tudi pri tistih, ki so bile izpostavljene hrani z nano- ZnO (koncentracije 2 000 ali 5 000 $\mu g/g$). Pri poskusih z nano- Ag smo v nasprotju s pričakovanji v skupinah živali, ki so jedle hrano z nano- Ag (koncentracije 2 000 ali 5 000 $\mu g/g$), v primerjavi z živalmi iz terarija in kontrole poskusov opazili več živali, ki niso bile pod stresom. Različni dejavniki (npr. kovine, dodane hrani, stradanje) vplivajo na debelino epitelija in količino lipidnih kapelj v celicah prebavnih žlez pri *P. scaber*, in sicer se ob tem epitelij stanjša, količina lipidnih kapelj pa zmanjša (Kohler in sod., 1996; Žnidaršič in sod., 2003; Lešer in sod., 2008). Glede na naše rezultate in podatke iz literature (merila Lešer in sod., 2008; Jemec in sod., 2012) lahko zaključimo, da nano- TiO_2 in nano- ZnO zmanjšujeta vitalnost živali (v primeru nano- TiO_2 smo imeli približno 50 % živali pod stresom, v primeru nano- ZnO pa kar 90 %).

4.1.4 Ultrastrukturne značilnosti celic prebavnih žlez

Mikroskopska analiza celic prebavnih žlez živali iz terarija, kontrole poskusov in živali, ki so bile izpostavljene različnim nanodelcem, dodanim k hrani, nam je razkrila številne razlike v ultrastrukturi celic med skupinami živali (preglednica 4). Glavne razlike med celicami živali iz kontrole gojišča in med celicami živali, hranjenimi z nanodelci, so bile GER v obliki veziklov in razširjenih cistern, v količini lamelarnih teles, v količini elektronsko gostih depozitov, spremembe v obliki mikrovilov, mitohondrijev in v obliki jedrnega ovoja ter tudi razlike v elektronski gostoti citoplazme. Naši rezultati se ujemajo z rezultati študij o vplivu različnih nanodelcev, izvedenih na ravni celic in organizmov, pri katerih tudi poročajo o strukturnih značilnostih v celicah oziroma organelih (Li in sod., 2003; Liu in sod., 2003; Qi in sod., 2005; Han in sod., 2006; Pei in sod., 2007; Wang in sod., 2008; Taylor in sod., 2009; De Berardis in sod., 2010; Di Giorgio in sod., 2011; Kim in sod., 2011; Sun in sod., 2011; Wang in sod., 2012). Nekateri avtorji pa v ultrastrukturi celic po izpostavitvi nanodelcem TiO_2 , ZnO in Ag niso opazili razlik (Fisichella in sod., 2012; Kocbek in sod., 2010; Kim in sod., 2011; Onischenko in sod., 2012).

V 14-dnevnih poskusih smo pri živalih, ki so bile izpostavljene nanodelcem, in pri živalih, ki so bile izpostavljene ZnCl_2 v celicah prebavnih žlez, opazili ultrastrukturne posebnosti, med njimi tudi GER v obliki veziklov in razširjenih cistern. Wang in sod. (2012) so ugotovili spremembe v strukturi GER v celičnih kulturah, ki so bile izpostavljene višjim koncentracijam nano-ogljika. Prav tako so ugotovili spremembe v strukturi GER po izpostavitvi rakastih celic nano-hidroksiapatitu (Pei in sod., 2007). Spremembe v strukturi GER so ugotovili tudi v nevronih hipokampusu miši, ki so bile izpostavljene nano- TiO_2 (Wang in sod., 2008). Izvedenih je bilo tudi nekaj študij glede izpostavitve živali težkim kovinam, ki poročajo tudi o vezikulaciji in razširjenih cisternah GER (Pawert in sod., 1996; Kohler in sod., 1996; Wu in sod., 2009; Hodl in sod., 2010; Shu in sod., 2012; Longo in sod., 2013). Nekaj študij je bilo izvedenih tudi na *P. scaber*. Žnidaršič in sod. (2003) so opazili GER v obliki veziklov v celicah prebavnih žlez pri živalih, izpostavljenih hrani z višjo koncentracijo cinka ali kadmija, in sicer so to spremembo pripisali stresu zaradi izpostavljenosti višjim koncentracijam kovin. Tarnawska in sod. (2007) so prav tako opazili GER v obliki veziklov in razširjenih cistern v celicah prebavnih žlez pri *P. scaber*, ki so bili izpostavljeni niklju. Iz literature (Ghadially, 1997) je znano, da je glavna naloga GER sinteza, modifikacija in transport membranskih beljakovin ter tudi beljakovin lizosomsko-endosomskega sistema. Spremembe v GER v jetrnih celicah lahko nastanejo zaradi stradanja in različnih patoloških stanj. GER v obliki veziklov in razširjenih cistern je

lahko posledica vdora vode v celico, ki se zgodi zaradi različnih vplivov. Drugi vzrok za nastanek teh cistern je lahko shranjevanje sekrecijskih produktov. Sanco-Martinez in sod. (2012) so ugotovili, da poškodbe in spremembe ER lahko vodijo v akumulacijo in sintezo neustreznih beljakovin ali porušenje kalcijeve homeostaze, kar vodi v ER stres. ER stres lahko nastane kot posledica različnih motenj v celici (pomanjkanje glukoze, spremembe v koncentraciji kalcija, redoks stanje v lumnu ER), ki pa lahko nastanejo zaradi različnih vplivov. Pawert in sod. (1996), Kohler in sod. (1996) in Triebkorn in sod. (1996) so ugotavljali vpliv kovin (Pb, Zn, Cd) na celice pri različnih nevretenčarjih. Ugotovili so, da se GER na spremembe v celici zelo hitro odzove s spremembo v strukturi GER (v obliki veziklov in krajših cistern), kar razlagajo kot reakcijo na kovine.

Arrelano in sod. (1999), Thophon in sod. (2003), Giari in sod. (2007, 2008), Wu in sod. (2009), Heinlaan in sod. (2011), Shu in sod. (2012) razlagajo pojav GER v obliki veziklov pri živalih, ki so bile izpostavljene kovinam, in sicer da vezikulacija GER nastane zaradi kovin, ki inhibirajo ionske kanalčke (predvsem Na^+/K^+) v membranah celic in s tem vplivajo na ionsko ravnovesje v celici. Zierold in sod. (2000) ter Dailianis in Kaloyianni (2004) so pojav GER v obliki veziklov zaradi kovin dokazali tudi z meritvami vsebnosti Na^+ , K^+ in Ca^{++} v celicah ter tudi pretoka Na^+ skozi celice. Zierold in sod. (2000) so merili vsebnost Na^+ , K^+ , Ca^{++} v hepatocitah po izpostavitvi različnim kovinam (Pb, Au, Tl in Hg). Ugotovili so, da so kovine v celici povzročile povečanje Na^+ in Ca^{++} ter zmanjšanje K^+ . Dailianis in Kaloyianni (2004) sta prav tako ugotovila povečanje pretoka Na^+ v prebavnih celicah pri školjkah *Mytilus galloprovincialis*, ki so bile izpostavljene kadmiju. Ugotovljeno je bilo tudi povišanje vrednosti pH v teh celicah.

Podobno glede Na^+ se kaže tudi v naših rezultatih, vendar pa imamo podatke le za eno žival iz kontrole in eno žival, ki se je prehranjevala s hrano z dodanim nano-Ag (vrednosti Na, izmerjenega z mikro-PIXE v predelu celic prebavnih žlez: pri živali iz kontrole Na – 16749 ppm, pri živali iz skupine 5 000 $\mu\text{g/g}$ nano-Ag Na – 33051 ppm). Glede na ta podatek in na podlagi literature lahko sklepamo, da delci in kovine vplivajo na kanalčke na membranah ter s tem na ionsko ravnovesje v celici. GER v obliki veziklov v celicah živali, ki so se prehranjevale s hrano z nanodelci ali ZnCl_2 , razlagamo kot možen vpliv kovin ali nanodelcev na celični ravni.

V poskusih smo pri živalih, ki so bile izpostavljene nanodelcem, in pri živalih, ki so bile izpostavljene ZnCl_2 , opazili večjo količino lamelarnih teles. Le-te smo opazili tudi pri živalih kontrole iz terarijev in tudi iz kontrole poskusa, vendar jih je bilo manj. Lamelarne

strukture najdemo v normalnih celicah (epiteliju pljuč, celicah prebavnega sistema, celicah jezika, nosnem epiteliju, mukoznih celicah želodca ...) ter tudi v celicah, ki so bile izpostavljene različnim stresnim in patološkim razmeram. Njihova funkcija je predvsem izdelava surfaktantov in skladiščenje lipidnih membran (Schmitz in Muller, 1991). Drobne in sod. (2008) so opazovali lamelarne strukture v celicah prebavnih žlez in ugotovili, da se spreminja pogostost pojavljanja in ultrastruktura lamelarnih teles med različnimi živalmi *P. scaber*. Lamelarnim strukturam so skupne koncentrične lamele. Prav tako so lamelarne strukture opazili v celicah bronhialnega epitelija in v celicah makrofagov, ki so bile izpostavljene višjim koncentracijam nanodelcev iz onesnaženega zraka (Li in sod., 2003). Kohler in sod. (1996) so v celicah prebavne žleze *P. scaber* po hranjenju s hrano z višjo koncentracijo kadmija, cinka ali svinca opazili več lamelarnih struktur. Povečanje količine lamelarnih struktur razlagajo kot akumulacijo membran zaradi povečane redukcije organelov in razpada membran. Prav tako so jih opazili v celicah prebavnih žlez po hranjenju z nikljem (Tarnawska in sod., 2007). Glede na rezultate iz literature razlagamo povečano število lamelarnih teles na dva načina. Prvič, kot posledico akumulacije membran zaradi razpada, preoblikovanja organelov in nastajanja drugih organelov (Pawert in sod., 1996; Kohler in sod., 1996), drugič pa zaradi večje potrebe po proizvodnji surfaktantov (Schmitz in Muller, 1991; Raymond in sod., 2008). V celicah živali, ki so bile izpostavljene hrani z nanodelci ali $ZnCl_2$, smo opazili povečanje števila lamelarnih struktur, kar razlagamo kot možen vpliv nanodelcev (TiO_2 , ZnO in Ag) ali $ZnCl_2$ na celični ravni.

V naši študiji smo v celicah prebavnih žlez živali, ki so bile izpostavljene enemu od izbranih nanodelcev (nano- TiO_2 , nano- ZnO in nano- Ag) ali $ZnCl_2$, glede na živali iz kontrole poskusa opazili več dolgih in razvejanih mitohondrijev, nismo pa opazili poškodb mitohondrijev. V literaturi je opisan vpliv nanodelcev in tudi kovin na različne spremembe v mitohondrijih. Ugotovili so vpliv nanodelcev na spremembe v strukturi (poškodbe na kristah in njihovo izginjanje), v velikosti in številu mitohondrijev v celičnih kulturah (Wang in sod., 2012; Li in sod., 2003; Han in sod., 2006; De Berardis in sod., 2010; Sun in sod., 2011). Povečane mitohondrije so opazili tudi v nevronih hipokampusa in v celicah olfaktornega bulbosa, kjer so bile miši izpostavljene višjim koncentracijam nano- TiO_2 (Wang in sod., 2008). Hu in sod. (2010) so po izpostavitvi deževnika *E. foetida* nanodelcem TiO_2 in ZnO ugotovili strukturne spremembe v mitohondrijih (deorganizacijo in redukcijo krist). Prav tako so Žnidaršič in sod. (2003) opazili dolge in razvejane mitohondrije v celicah prebavnih žlez pri *P. scaber*, ki so bili izpostavljeni višjim

koncentracijam cinka ali kadmija. To ultrastrukturno spremembo mitohondrijev razlagajo kot posledico izpostavitve živali težkim kovinam. Dinley in sod. (2002) in Al Nasser (2000) so prav tako opazili spremembo v strukturi mitohondrijev v celicah možganov ter celicah jeter zaradi povišane koncentracije cinka ali kadmija. Longo in sod. (2013) so opazili spremembe v obliki mitohondrijev in redukcijo krist v celicah prebavnih žlez pri raku *Ligia italica* zaradi težkih kovin. Oblika mitohondrijev je lahko variabilna, in sicer od okroglih do podolgovatih, izjemoma pa se pojavljajo tudi razvejani in zelo dolgi mitohondriji (Perkins in sod., 2000). V naših poskusih z nanodelci so se pojavili dolgi in razvejani mitohondriji v celicah živali, ki so bile izpostavljene hrani z nanodelci. V teh celicah je bila povečana površina zunanje membrane mitohondrijev; ta je zelo propustna in skozi njo prehajajo nukleotidi, ioni in različni metabolni produkti, predvsem piruvat in maščobne kisline. Zaključimo lahko, da so dolgi in razvejani mitohondriji, ki smo jih opazili v celicah prebavnih žlez, pri *P. scaber*, izpostavljenih različnim nanodelcem ali $ZnCl_2$, nastali kot posledica prehranjevanja živali z nanodelci ali $ZnCl_2$.

V poskusih smo v celicah prebavnih žlez pri živalih, ki so bile izpostavljene posameznim nanodelcem ali $ZnCl_2$, v primerjavi s kontrolo poskusa opazili več sprememb v obliki mikrovilov. Spremembe v obliki mikrovilov so opazili tudi v celičnih kulturah, ki so bile izpostavljene povišanim koncentracijam nanodelcev hitozana ali nano-apatita (Qi in sod., 2005; Han in sod., 2006). Heinlaan in sod. (2011) prav tako opisujejo spremembe v obliki mikrovilov v celicah srednjega črevesa pri vrsti *D. magna* po izpostavitvi nano-Cu. Sprememba naj bi nastala zaradi osmoregulacijskega stresa, ki je nastal zaradi izpostavitve povišanim koncentracijam nano-Cu. Krajše mikrovile in spremembe v obliki so prav tako opazili v celicah prebavnih žlez pri *P. scaber*, ki so bili izpostavljeni hrani z višjo koncentracijo kadmija, svinca ali cinka (Kohler in sod., 1996). Tudi Longo in sod. (2013) ter Wu in sod. (2009) so opazili spremembe v obliki mikrovilov v celicah prebavnih žlez in srednjega črevesa zaradi kovin. V naših poskusih smo pri živalih, izpostavljenih nanodelcem ali $ZnCl_2$, v celicah prebavnih žlez opazili več sprememb v obliki mikrovilov. Glavna funkcija mikrovilov je povečanje površine celic. Razpad mikrovilov v celicah prebavnih žlez je zmanjšal predvsem apikalno površino celic, kar pa je povzročilo zmanjšanje privzema hranil. Na podlagi naših rezultatov in podatkov iz literature je razpad mikrovilov nastal kot posledica prehranjevanja živali z nanodelci ali $ZnCl_2$.

V celicah živali, ki so bile 14 dni izpostavljene posameznim nanodelcem ali $ZnCl_2$, smo opazili bolj naguban jedrni ovoj. Spremembe v obliki jedrnega ovoja so opazili v celičnih kulturah, ki so bile izpostavljene nano-ogljiku (Wang in sod., 2012; Di Giorgio in sod., 2011), nano-Ag (Kim in sod., 2011) in tudi nano-apatitu (Han in sod., 2006). Spremembe v obliki jedrnega ovoja so opazili tudi v nevronih hipokampusa, kadar so bile miši izpostavljene nano- TiO_2 (Wang in sod., 2008), elektronsko bolj gosto jedro pa pri celicah, ki so bile izpostavljene nano-Ag (Kim in sod., 2011), nano-apatitu (Han in sod., 2006), nano-hidroksiapatitu (Liu in sod., 2003; Pei in sod., 2007) in nano- ZnO (De Berardis in sod., 2010). Naguban jedrni ovoj je značilen pri starejših celicah, lahko pa se pojavi tudi kot posledica večje metabolne aktivnosti (Ghadially, 1997). V naših poskusih je bil jedrni ovoj bolj naguban v celicah, ki so bile izpostavljene posameznim nanodelcem ali $ZnCl_2$. Na podlagi podatkov iz literature (Ghadially, 1997) in naših poskusov lahko zaključimo, da bolj naguban jedrni ovoj kaže na posledico spremenjenih razmer v celicah prebavnih žlez in večje metabolne aktivnosti teh celic zaradi prehranjevanja živali s hrano z nanodelci ali $ZnCl_2$.

Ob primerjavi celic živali iz kontrole poskusa in živali, ki so bile 14 dni izpostavljene posameznim nanodelcem ali $ZnCl_2$, smo opazili v celicah izpostavljenih živali elektronsko bolj gosto citoplazmo. Prav tako so v celicah prebavnih žlez pri *P. scaber* po izpostavitvi kadmiju, železu ali cinku Kohler in sod. (1996) opazili bolj gosto citoplazmo. Longo in sod. (2013) so opazili bolj gosto citoplazmo v celicah B prebavnih žlez pri raku *Ligia italica* zaradi težkih kovin. Ghadially (1997) opisuje temne celice kot mrtve oziroma umirajoče zaradi celične dehidracije, ki je posledica različnih patoloških stanj. Žnidaršič in sod. (2003) opisujejo elektronsko gosto citoplazmo kot rezultat stresnih faktorjev (cinka ali kadmija). Na podlagi naših rezultatov in podatkov iz literature lahko zaključimo, da je bila elektronsko bolj gosta citoplazma v celicah živali, izpostavljenih posameznim nanodelcem ali $ZnCl_2$, najverjetneje posledica prehranjevanja živali s hrano s posameznimi nanodelci ali $ZnCl_2$.

Pri živalih, ki so bile izpostavljene posameznim nanodelcem, in pri živalih, ki so bile izpostavljene $ZnCl_2$, smo opazili več drobnih elektronsko gostih depozitov ob plazmalemi in v veziklih. Le-te smo opazili tudi pri živalih iz kontrole iz terarijev in tudi iz kontrole poskusa, vendar pa jih je bilo manj in pojavljali so se le v nekaterih celicah. Prav tako so jih opazili pri celičnih kulturah (endotelijske celice), ki so bile izpostavljene višjim

koncentracijam nano-Au (Taylor in sod., 2009). Elektronsko goste depozite so opisali tudi Kohler in sod. (1996); le-ti so se pojavili v celicah prebavne žleze po izpostavitvi hrani z višjo koncentracijo kadmija, svinca ali cinka. Večjo pogostost elektronsko gostih depozitov so prav tako opazili v celicah prebavnih žlez pri rakih *L. italica*, ki so bili nabrani na območju, onesnaženem s kovinami. Z analizo elektronsko gostega materiala so Hopkin in sod. (1989) ugotovili prisotnost kalcija, fosforja, cinka in svinca. Glede na naše rezultate in podatke iz literature lahko sklepamo, da je bilo več elektronsko gostih depozitov v celicah živali, ki so bile izpostavljene posameznim nanodelcem ali $ZnCl_2$, posledica prehranjevanja živali s hrano s posameznimi nanodelci ali $ZnCl_2$.

Na podlagi naših rezultatov in podatkov iz literature lahko zaključimo, da ultrastrukturne značilnosti v GER in mikrovilih kažejo na osmotski stres v celicah, nekatere značilnosti (v mitohondrijih, jedrnem ovoju in količini elektronsko gostih depozitov) pa na spremembo metabolne aktivnosti v celicah živali, ki so se prehranjevale s hrano z nanodelci ali $ZnCl_2$. Povečano količino lamelarnih struktur razlagamo kot posledico akumulacije membran zaradi razpada, preoblikovanja organelov in nastajanja drugih organelov ali kot večjo potrebo po proizvodnji surfaktantov. Elektronsko gosto citoplazmo mnogi avtorji opisujejo kot znak apoptoze v celicah, vendar pa to značilnost v našem primeru težko pripišemo apoptozi. Glede na ostale spremembe v celicah, ki kažejo na osmotski stres oziroma spremenjeno metabolno aktivnost, tudi ta znak nakazuje osmotski stres oziroma spremenjeno metabolno aktivnost zaradi prehranjevanja živali s hrano z nanodelci ali $ZnCl_2$. Vse te ultrastrukturne značilnosti in spremembe v celicah glede na celice kontrole so nastale zaradi prehranjevanja s hrano z nanodelci ali $ZnCl_2$ ter kažejo na možen vpliv nanodelcev in kovin na celični ravni. Posamezni nanodelci so na ultrastrukturno celic prebavnih žlez vplivali podobno; ultrastrukturne značilnosti v celicah so se pojavljale skoraj vedno. V primeru $ZnCl_2$ so bile značilnosti v ultrastrukturi teh celic manj pogoste. Najbolj izraziti značilnosti v celicah pri živalih, ki so se prehranjevale s hrano z nanodelci, sta bili pogostost lamelarnih teles in spremembe v strukturi GER, pri $ZnCl_2$ pa sta bili ti dve značilnosti manj pogosti, zato jih razlagamo kot vpliv nanodelcev. Glede na to, da je bil učinek nanodelcev na ultrastrukturne spremembe, debelino epitelija in količino lipidnih kapelj večji kot v primeru $ZnCl_2$, lahko sklepamo, da na celice niso delovali le ioni kovin, ampak tudi nanodelci (preglednica 6).

Preglednica 6. Rezultati poskusov z nanodelci ali ZnCl₂ pri *P. scaber*

Table 6. Results of experiments with nanoparticles or bZnCl₂ on *P. scaber*

| | Nanodelci (nano-TiO ₂ , nano-ZnO, nano-Ag) | ZnCl ₂ |
|--|--|-----------------------------|
| Prehranjevanje | ni sprememb | Zmanjšalo (LOEC 2 000 µg/g) |
| Teža | ni sprememb | ni sprememb |
| smrtnost | ni sprememb | ni sprememb |
| Epitelij (ocena 1,2) | Znižan (20%) | Znižan (10%) |
| Lipidi (ocena 1,2) | Zmanjšana količina (80%) | Zmanjšana količina (60%) |
| Fizološko stanje (živali pod stresom in pod srednjim stresom) | Živali pod stresom (65%) | Živali pod stresom (60%) |
| Ultrastrukturne spremembe | | |
| GER (v obliki veziklov) | Vedno (+++) | Ponekod (++) |
| Lamelarna telesa (večja pogostost) | Vedno (+++) | Ponekod (++) |
| Mitohondriji (dolgi) | Ponekod (++) | Izjemoma (+) |
| Mikrovili (spremembe) | Ponekod (++) | Ponekod (++) |
| Nagubana jedrni ovoj | Ponekod (++) | Ponekod (++) |
| Elektronsko bolj gosta citoplazma | Ponekod (++) | Izjemoma (+) |
| Elektronsko gosti depoziti | Ponekod (++) | Ponekod (++) |

4.1.4.1 Vpliv priprave tkiva na ultrastrukturne spremembe v celicah prebavnih žlez

Pogosto so lahko nekatere ultrastrukturne spremembe (nepravilno oblikovana membrana, elektronsko bolj gosta citoplazma) v celicah lahko posledica priprave tkiva oziroma neustrezne fiksacije (Ghadially, 1997), vendar pa smo v naših posameznih poskusih tkiva prebavnih žlez pripravljali vedno na enak način. Ob prebavnih žlezah živali, ki so se prehranjevale s hrano z nanodelci, smo istočasno pripravili tudi prebavne žleze kontrole in žleze kontrole gojišča. Ultrastrukturne spremembe so se pojavljale tudi v celicah prebavnih žlez kontrole in celicah prebavne žleze kontrole gojišča, vendar smo jih opazili redko. Ultrastrukturne spremembe so se pojavljale v celicah prebavnih žlez, ob teh pa smo opazovali tudi celice, v katerih se te spremembe niso pojavljale. Zaključimo lahko, da ultrastrukturne spremembe v celicah prebavnih žlez živali iz naših poskusov niso bile posledica priprave tkiva.

4.1.5 Vsebnost nanodelcev oziroma kovin v celicah prebavnih žlez in organizmu

V 14-dnevnih poskusih s posameznimi nanodelci (nano-TiO₂, nano-ZnO in nano-Ag) ali ZnCl₂ smo z metodo mikro-PIXE ugotovili prisotnost titana le v nekaterih celicah prebavnih žlez živali, ki so se prehranjevale s hrano z najvišjo koncentracijo nano-TiO₂. Prav tako smo z metodo mikro-PIXE ugotovili prisotnost srebra v celicah prebavnih žlez že pri živalih, ki so se prehranjevale s hrano z nižjo koncentracijo nano-Ag. Z metodo AAS smo ugotovili prisotnost cinka v organizmu *P. scaber* pri živalih, ki so se prehranjevale s hrano z nano-ZnO ali ZnCl₂.

Po 14-dnevem hranjenju s hrano, ki je vsebovala najvišjo koncentracijo nano-TiO₂ (5 000 µg/g), smo z uporabo metode mikro-PIXE v celicah prebavne žleze ugotovili prisotnost titana v sledih le pri živalih, ki so imele destabilizirano membrano (Novak in sod., 2012). Tudi drugi avtorji poročajo o prisotnosti TiO₂, vendar ga niso našli v tkivih ali celicah. Po izpostavitvi organizma *E. fetida* nano-TiO₂ so z metodo ICP-AES ugotovili prisotnost celokupnega titana le v celi živali. Potrebna bi bila še analiza tkiv, da bi ugotovili, ali se je absorbiral tudi v tkiva (Hu in sod., 2010). Prav tako so ga odkrili tudi v drugi študiji, in sicer le v organizmu *E. fetida* z ICP-AES (Bigorgne in sod., 2011). Zhu in sod. (2010) so z uporabo ICP-OES ugotovili prisotnost titana le v celih organizmih *D. magna*. Za razliko od navedenih študij so v drugih študijah ugotavljali prisotnost tudi v tkivih oziroma celicah, vendar ga v tkivih ni bilo. Lapied in sod. (2011) so po izpostavitvi deževnika *L. terrestris* ugotavljali prisotnost nano-TiO₂. Z metodo µXRF so ugotovili prisotnost v lumnu črevesa, v tkivu pa ga niso našli, pri čemer je bil ugotovljeni nano-TiO₂ najverjetneje posledica preostanka le-tega v črevesu. V drugi študiji prav tako niso našli nanodelcev titana v celicah. V morskem mnogoščetincu *A. marina* so z uporabo CARS in TEM mikroskopije ugotovili, da so prisotni le agregati okrog mikrovilov (Galloway in sod., 2010). V študiji Bacchetta in sod. (2011) so s TEM in ESI ugotovili prisotnost nano-TiO₂ tudi v celicah črevesa pri embrijih žab *X. laevis*. Te črevesne celice so bile zaradi nano-TiO₂ močno poškodovane, pri čemer so te poškodbe najverjetneje tako kot v naših poskusih z nano-TiO₂ omogočile vstop nanodelcev TiO₂. Tudi v drugi študiji so z ICP-MS opazili majhno prisotnost celokupnega titana v tkivih, in sicer v ledvicah, minimalno v jetrih in krvi pri šarenkah *O. mykiss*, ki so jim intravenozno injicirali nano-TiO₂. V možganih, škregah in vranici ga niso našli (Scown in sod., 2009). Jonston in sod. (2010) so z mikroskopijo CARS po izpostavitvi nano-TiO₂ iz vode ugotovili prisotnost nano-TiO₂ v celicah škrge šarenk *O. mykiss*.

Naši rezultati in tudi rezultati iz literature (Bacchetta in sod., 2011; Novak in sod., 2012) kažejo, da je za prisotnost nanodelcev TiO₂ v celicah prebavne žleze potrebna določena koncentracija nanodelcev in hkrati tudi destabilizacija membrane oziroma poškodovane celice, kar omogoča vstop nanodelcem. V našem primeru so bili prisotni le nanodelci, ioni pa se od TiO₂ najverjetneje niso odtapljali. Nano-TiO₂ pri organizmu *P. scaber* po 14-dnevnem prehranjevanju ni povzročil sprememb v preživetju, masi in prehranjevanju živali niti pri najvišji koncentraciji. Ugotovili smo stanjšanje debeline epitelija v celicah prebavnih žlez in nenormalno fiziološko stanje (živali pod stresom) pri živalih, ki so bile hranjene s hrano z najvišjo koncentracijo nano-TiO₂ (5 000 µg/g). V količini lipidnih kapelj v celicah B smo pri živalih, ki so se prehranjevale s hrano z nano-TiO₂, opazili nekoliko manj lipidnih kapelj, vendar ni bilo statistične razlike v primerjavi s kontrolo poskusa. S TEM smo pri živalih, ki so bile hranjene s hrano z nano-TiO₂ obeh koncentracij, v celicah prebavnih žlez našli več ultrastrukturnih sprememb kot pri kontroli poskusa.

Po 28-dnevnem poskusu, v katerem so bile živali *P. scaber* hranjene z nano-ZnO ali ZnCl₂ koncentracij 2 000 ali 5 000 µg/g, smo z uporabo metode AAS ugotovili, da skupine, hranjene z nižjo koncentracijo cinka (2 000 µg/g), v telesu niso vsebovale več celokupnega cinka v primerjavi s kontrolno skupino. Skupine, hranjene z višjo koncentracijo (5 000 µg/g), so vsebovale več cinka v telesu v primerjavi s kontrolno skupino.

Bioakumulacija cinka je bila v našem poskusu neodvisna od vira cinka. Ni bilo razlik med bioakumulacijo cinka iz nano-ZnO in ZnCl₂. Najverjetnejši razlog za to je, da je prišlo do odtapljanja cinkovih ionov od nano-ZnO. Franklin in sod. (2007) so ugotovili, da pride do 19 % odtapljanja cinkovih ionov od nanodelcev ZnO. Odtapljanje je bilo tudi v našem poskusu precej veliko, saj ni bilo razlik v akumulaciji med različnima viroma cinka.

Akumulacijo celokupnega cinka so ugotovili tudi v študijah na *E. fetida*, *L. stagnalis* z ICP-AES in ICP-MS (Hu in sod., 2010; Croteau in sod., 2011b), vendar so ugotavljali prisotnost le v celem organizmu, zato ne vemo, ali je prehajal tudi v tkiva oziroma v celici. V študiji Hooper in sod. (2011) so s SEM in EDX ugotovili prisotnost agregatov nanodelcev ZnO v integumentu po izpostavitvi *E. veneta* nano-ZnO.

V naših poskusih smo ugotavljali akumulacijo celokupnega cinka v celi živali. V študiji Romih (2011) je bilo z uporabo metode AAS po 14-dnevni izpostavitvi *P. scaber* ZnO (koncentracije 1 500 in 4 000 µg/g) in ZnCl₂ (koncentracije 1 000 in 2 500 µg/g) ugotovljeno, da se večina cinka nahaja v prebavnih žlezah. Glede na to, da ni bilo večjih

razlik v koncentraciji celokupnega cinka med živalmi, ki so se prehranjevale s hrano z nano-ZnO in ZnCl₂, se sklepa, da se cinkovi ioni odtapljajo tudi od nano-ZnO. Glede na naše rezultate sklepamo, da vpliv nano-ZnO najverjetneje ni odvisen samo od odtopljenih ionov, saj je med nano-ZnO in ZnCl₂ prišlo do razlik v prehranjevanju živali, in sicer je prišlo v primeru ZnCl₂ do upada prehranjevanja, pri nano-ZnO pa ne. Različen vpliv smo opazili tudi v epiteliju in lipidih v celicah prebavnih žlez ter tudi v ultrastrukturi celic prebavnih žlez, kjer je imel nano-ZnO večji vpliv. Vse to nakazuje na drugačno delovanje nano-ZnO od ZnCl₂ in verjetnost, da na celice prebavnih žlez ne delujejo samo ioni, ampak tudi nanodelci. V naših poskusih smo merili celokupno vsebnost cinka v organizmu in ne vemo, ali so bili poleg odtopljenih cinkovih ionov od nano-ZnO prisotni tudi nanodelci ZnO.

V primeru izpostavitve nano-Ag smo ugotavljali, ali se poleg odtopljenih srebrovih ionov od nano-Ag akumulirajo nanodelci Ag. V poskusih z nano-Ag so bile živali *P. scaber* hranjene s hrano, ki je vsebovala različno koncentracijo nano-Ag (1 000 µg ali 5 000 µg/g hrane). Po 14 dnevih smo z metodo mikro-PIXE ugotovili prisotnost srebra v malih celicah prebavnih žlez pri živalih, ki so se hranile s hrano z višjo koncentracijo nano-Ag. Z uporabo EDX/TEM smo ugotovili, da se srebrovi ioni nahajajo v granulah B v celicah S prebavnih žlez. Primarna funkcija teh granul je, da shranjujejo kovine in jih s tem razstrupljajo; ta mehanizem je zlasti pomemben, kadar so živali izpostavljene kovinam v povišani koncentraciji (Hopkin, 1989). Ugotovili smo, da se srebro pojavlja skupaj z bakrom, zato lahko sklepamo, da so v celico vstopili srebrovi ioni in ne delci. V drugih delih celic prebavnih žlez srebra ali nanodelcev srebra nismo našli. Če bi v celico vstopili delci, bi se po vsej verjetnosti nahajali po celotni celici in ne samo v granulah oziroma bi bil mehanizem celične razporeditve drugačen. Nano-Ag pri *P. scaber* ni povzročil sprememb v preživetju, masi in prehranjevanju živali niti pri najvišji koncentraciji. Ugotovili smo spremembe v debelini epitelija in količini lipidov, in sicer se je ob srebru debelina epitelija povečala glede na kontrolo poskusa, prav tako pa smo našli večjo količino lipidov glede na kontrolo poskusa. S koncentracijo se je povečevalo število živali, ki niso bile pod stresom (ocena na podlagi debeline epitelija in količine lipidnih kapelj v celicah B prebavnih žlez). Kljub temu smo v celicah prebavnih žlez živali, hranjenih s hrano z nano-Ag, našli večjo pogostost ultrastrukturnih značilnosti kot pri kontroli poskusa nano-Ag.

Prisotnost srebra po izpostavitvi živali nanodelcem so potrdili tudi v drugih študijah. V organizmih *N. diversicolor*, *P. ulvae*, *E. fetida* in *D. magna* so z uporabo metod AAS in

ICP-MS ugotovili prisotnost celokupnega srebra v navedenih organizmih, in sicer se je leta povečeval s povečevanjem izpostavitvene koncentracije (Cong in sod., 2011; Khan in sod., 2012; Shoults-Wilson in sod., 2011a, 2011b; Courtis in sod., 2012; Zhao in sod., 2012a, 2012b; Resano in sod., 2013). Glede na to, da so analizirali vsebnost srebra na celotnem organizmu, ne vemo, ali je srebro prehajalo v tkiva oziroma celice živali. Scown in sod. (2010) so pri šarenkah *O. mykiss* z uporabo ICP-OES ugotovili prisotnost srebra tudi v tkivih, in sicer v tkivih škrg in jeter, v ledvicah pa ga niso našli. Farmen in sod. (2011) so pri vrsti *A. salmon* z ICP-MS prav tako ugotovili prisotnost srebra v tkivu škrg. V vseh navedenih študijah niso razlikovali med nanodelci in ioni srebra.

V študiji Croteau in sod. (2011b) so podobno kot mi v organizmu *L. stegnalis* z metodo ICP-MS odkrili srebrove ione. Prav tako so z enako metodo srebrove ione odkrili tudi McTeer in sod. (2013) v telesu vodnih bolh. Vendar pa bile v navedenih študijah izvedene analize na celih organizmih, zato ne vemo, ali so srebrovi ioni vstopili v celice. V drugih študijah so tako kot mi ugotovili, da se srebro nahaja tudi v celicah oziroma tkivih organizmov. V študiji Audinot in sod. (2012) pa so enako kot mi ugotovili, da se srebro nahaja tudi v celicah oziroma v tkivih organizmov. Pri vodnih bolhah z uporabo TEM in SIMS („secondary ion mass spectrometry imaging“) ugotovili prisotnost srebra v sledih tudi v tkivu črevesa, vendar niso imeli primerne metode, ki bi prisotnost srebra v tkivih potrdila in dokazala.

V nasprotju z našimi raziskavami, pri katerih smo v granulah v celicah S prebavnih žlez pri *P. scaber* našli le srebrove ione, so v naslednjih študijah našli tudi nanodelce. Lee in sod. (2007, 2012) so ugotavljali pot nanodelcev srebra pri embrijih (*D. rerio*) in ugotovili, da nanodelci pasivno prehajajo v embrije prek horionskih kanalov. V študiji Roh in sod. (2009) so po izpostavitvi glist *C. elegans* nano-Ag z mikroskopijo („light scattering dark field microscopy“) ugotovili prehajanje nanodelcev v telo, vendar pa ne vemo, ali so nanodelci vstopili tudi v tkiva. V študiji Garcia-Alonso in sod. (2011) so razlikovali med nanodelci in ioni srebra. Z uporabo TEM/EDX in subcelično frakcionacijo so pri vrsti *N. diversicolor*, ki so jo izpostavili nano-Ag, ugotovili, da se v celicah pojavljajo tako nanodelci kot tudi ioni srebra. Laban in sod. (2009) so v tkivih embrijev črnohlavca pisanca *P. promelas* s TEM ugotovili prisotnost nanodelcev srebra. Razlagajo, da naj bi nanodelci v notranjost embrijev vstopili prek por na membranah ali aktivno z endocitozo. Lopez-Serano in sod. (2013) so pri *D. rerio* s TEM/EDX ugotovili prisotnost nanodelcev srebra v celicah možganov. Z uporabo mikroskopije (citoviva, hiperspektralne analize) so ugotovili prisotnost nanodelcev srebra v tkivih živali *C. Elegans*, in sicer v celicah črevesa

(Meyer in sod., 2010). V študiji Kwok in sod. (2012) so pri *J. medaka* z enako mikroskopijo (citoviva/hiperspektralno analizo) ugotovili prisotnost nanodelcev srebra v tkivih škrig, možganih in jetrih. V nekaterih primerih nanodelci tako kot pri naših raziskavah niso prehajali v tkiva, ampak so ostali na površini ali v lumnu črevesa. Li in sod. (2013) so pri polžu *L. littorea* po izpostavitvi nanodelcem srebra v tkivih z uporabo ICP-MS ugotovili minimalno količino srebra, pri čemer razlagajo, da nanodelci ostanejo na površini. V drugi študiji so Kim in sod. (2012) ugotovili prisotnost nanodelcev srebra le vzdolž prebavnega sistema, po analizi s TEM/EDX pa so ugotovili, da nanodelci ne prehajajo v celice.

Srebrovi ioni se sproščajo od nanodelcev srebra; prisotnost srebra v celicah oziroma v organizmu še ni dokaz, da so nanodelci vstopili v celico. Za to so potrebne primerne metode, ki razlikujejo srebrove ione in nanodelce srebra. Z metodami AAS in ICP-MS ugotovimo le količino določenega elementa v tkivu ali celi živali, z EDX/TEM pa lahko ugotovimo elementno sestavo na ultrastrukturni ravni celice. V našem primeru smo našli srebro le v granulah B v celicah S prebavne žleze, pri čemer lahko na podlagi literature (Hopkin, 1989, 1990) zaključimo, da so v celico vstopili srebrovi ioni, odtopljeni od nano-Ag. Če bi v celico vstopili tudi srebrovi nanodelci, bi bili razporejeni po celotni celici. V naših poskusih so bili posamezni nanodelci redki in ti bi morda lahko vstopili v celice prebavnih žlez z endocitozo, vendar pa so se nanodelci pojavljali predvsem v agregatih, ki bi lahko v celico vstopili le, če bi bila membrana zelo poškodovana.

Na podlagi naših rezultatov in podatkov iz literature lahko zaključimo, da je akumulacija srebra v celicah prebavnih žlez koncentracijsko odvisna. V naši raziskavi je v primeru nano-Ag prišlo do odtapljanja srebrovih ionov iz nanodelcev, ki so se akumulirali v granulah B v celicah S prebavnih žlez. Na podlagi rezultatov mikro-PIXE in TEM/EDX lahko sklepamo, da nanodelci pri *P. scaber*, ki so se prehranjevali z nanodelci, najverjetneje niso prehajali prek membran v celice prebavnih žlez.

4.2 SKLEPI

Po 14-dnevnih poskusih, v okviru katerih so se živali *P. scaber* prehranjevale s hrano z različnimi nanodelci ali $ZnCl_2$, smo opazili naslednje:

1) Značilnosti v (ultra) strukturi celic prebavnih žlez živali, hranjenih z nanodelci (TiO_2 , ZnO in Ag) ali $ZnCl_2$, kažejo na možen vpliv na celični ravni.

Epitelij celic prebavnih žlez se je stanjšal, količina lipidnih kapelj v celicah B prebavnih žlez pa se je zmanjšala glede na celice živali iz terarija in kontrole poskusa, kadar so se živali prehranjevale s hrano z nano- ZnO . Živali z visokim epitelijem in veliko ali srednjo količino lipidnih kapelj smo uvrstili med živali, ki niso bile pod stresom, bile so vitalne. Teh živali je bilo največ v kontroli iz terarija in kontroli poskusa, najmanj pa v skupinah, ki so se prehranjevale z nano- ZnO . Živali s tankim epitelijem in majhno ali veliko količino lipidnih kapelj v celicah B prebavnih žlez smo uvrstili med živali, ki so bile pod stresom zaradi izpostavitve nanodelcem ali $ZnCl_2$. Glede na kontrolo in kontrolo poskusa je bilo v skupinah, ki so se prehranjevale s hrano z nano- ZnO , več živali pod stresom, kar kaže na spremenjeno fiziološko stanje zaradi učinka nanodelcev.

V ultrastrukturi celic smo opazili v celicah prebavnih žlez pri živalih, hranjenih s hrano z različnimi nanodelci ali $ZnCl_2$, večjo pogostost vezikulacije GER, lamelarnih struktur, dolgih in razvejanih mitohondrijev, sprememb v mikrovilih, nagubanega jedrnega ovoja, elektronsko goste citoplazme in EDG glede na celice živali iz terarija ter kontrole poskusa. Najbolj pogosti oziroma izraziti značilnosti v celicah B in S prebavne žleze pri živalih, ki so se prehranjevale s hrano z nanodelci, sta bili:

- GER v obliki veziklov in razširjenih cistern. Glede na podatke iz literature (Zierold in sod., 2000; Dailianis in Kaloyianni, 2004) in naše rezultate lahko zaključimo, da je bila spremenjena oblika GER povezana s spremembo ionskega pretoka predvsem Na^+ in tudi K^+ ter Ca^{++} v membrani celic. Kovine inhibirajo kanalčke v membranah in s tem vplivajo na ionsko ravnovesje v celicah. Ultrastrukturno spremembo razlagamo kot možen vpliv kovin in nanodelcev na celični ravni zaradi prehranjevanja z nanodelci ali $ZnCl_2$.
- Pogosta lamelarna telesa, ki so učinkovito skladišče lipidnih membran (Schmitz in Muller, 1991). Glede na literaturo in naše rezultate (povečanje količine lamelarnih struktur) lahko zaključimo, da se je ta značilnost pojavila kot posledica akumulacije membran zaradi razpada, preoblikovanja in nastajanja organelov ali pa kot posledica večje potrebe po proizvodnji surfaktantov. Ultrastrukturno značilnost razlagamo kot

možen vpliv kovin in nanodelcev na celični ravni zaradi prehranjevanja z nanodelci ali ZnCl₂.

V celicah B in S prebavnih žlez pri živalih, ki so se prehranjevale z nanodelci ali ZnCl₂, smo opazili še naslednje ultrastrukturne značilnosti:

- dolge in razvejane mitohondrije,
- spremembe v obliki mikrovilov,
- bolj naguban jedrni ovoj,
- elektronsko bolj gosto citoplazmo,
- elektronsko goste depozite.

Za vse te ultrastrukturne značilnosti in spremembe v celicah prebavnih žlez živali, ki so se prehranjevale z nanodelci ali ZnCl₂, sklepamo, da so nastale zaradi prehranjevanja s hrano z nanodelci ali ZnCl₂ ter kažejo na možen vpliv nanodelcev in kovin na celični ravni. Nanodelci (nano-TiO₂, nano-ZnO in nano-Ag) so na ultrastrukturo celic prebavnih žlez vplivali podobno. V primeru živali, ki so se prehranjevale s hrano z ZnCl₂, smo v celicah opazili manj pogosto pojavljanje ultrastrukturnih značilnosti. Razlike smo opazili predvsem v pogostosti lamelarnih teles in spremembah v strukturi GER, zato to razlagamo z dejstvom, da poleg ionov na ultrastrukturo vplivajo tudi nanodelci.

Z navedenimi sklepi lahko potrdimo naši hipotezi, da zaužiti nanodelci povzročajo spremembe v strukturi celic prebavnih žlez, ker pridejo ob zaužitju v neposreden stik z njimi. Potrdimo lahko tudi, da so spremembe v strukturi celic prebavnih žlez podobne tistim, ki nastanejo zaradi stresa ali stradanja, ter da so spremembe nastale ne le zaradi ionov, ampak tudi zaradi nanodelcev.

2) Prisotnost zaužitih nanodelcev ali ZnCl₂ v celicah prebavnih žlez in organizmu

- V celicah prebavnih žlez smo ugotovili majhno količino titana le pri živalih, ki so se prehranjevale s hrano z najvišjo koncentracijo (5 000 µg/g hrane). Ugotovili smo, da je pogoj za vstop le-tega v celice prebavnih žlez dovolj visoka koncentracija nano-TiO₂ in hkrati tudi poškodovana membrana celic.

- V primeru nano-Ag smo ugotovili, da prihaja do akumulacije srebrovih ionov v celicah S (pri obeh koncentracijah 1 000 in 5 000 $\mu\text{g/g}$ hrane). Z metodo mikro-PIXE smo ugotovili prisotnost le-teh v malih celicah prebavnih žlez pri živalih, ki so se hranile s hrano z nano-Ag. Z uporabo EDX/TEM smo ugotovili, da se srebrovi ioni nahajajo v granulah B v celicah S prebavne žleze. V primeru nano-Ag prihaja do odtapljanja srebrovih ionov od nano-Ag.
- V primeru nano-ZnO in ZnCl_2 smo z metodo AAS ugotovili prisotnost celokupnega cinka v organizmu. Do akumulacije je prišlo pri živalih, ki so se prehranjevale s hrano z višjo koncentracijo cinka (5 000 $\mu\text{g/g}$ hrane) ne glede na vir cinka. V primeru nano-ZnO prihaja do odtapljanja cinkovih ionov iz nano-ZnO.

S temi sklepi lahko potrdimo našo prvo hipotezo, tj. da zaužiti nanodelci prehajajo v celice prebavnih žlez v obliki nanodelcev in/ali ionov.

3) Zaužiti nanodelci niso vplivali na prehranjevanje, preživetje in tudi ne na maso živali v 14-dnevnih prehranjevalnih poskusih v koncentracijah 1 000, 2 000 in 5 000 μg posameznih nanodelcev/g, torej na njih nimajo kvarnega delovanja. Ker so to mere strupenosti, lahko zaključimo, da zadevni nanodelci pod temi testiranimi pogoji niso strupeni. Prehranjevanje s hrano z ZnCl_2 je vplivalo na prehranjevanje živali, in sicer se je zmanjšalo, vendar pa ni vplivalo na preživetje ali maso živali.

5. POVZETEK (SUMMARY)

5.1 POVZETEK

Nanodelci se v današnjem času vse bolj uporabljajo v izdelkih splošne rabe. Zaradi majhnosti se njihove lastnosti zelo razlikujejo od lastnosti, ki jih imajo večji delci enake kemijske sestave. Biološko reaktivnost nanodelcev določajo njihova velikost, oblika, kemijska sestava, odtapljanje in tudi lastnosti nanodelcev v suspenziji.

V doktorski disertaciji smo preučevali učinke najbolj uporabljanih nanodelcev (nano-TiO₂, nano-ZnO, nano-Ag) in ZnCl₂ na modelnem organizmu, tj. kopenskem raku enakonožcu *Porcellio scaber* (Isopoda; Crustacea). Naš namen je bil ugotoviti učinke nanodelcev na (ultra) strukturne značilnosti v celicah in ugotoviti prisotnost nanodelcev oziroma ionov v celicah prebavnih žlez ali v organizmu. Zanimale so nas tudi morebitne razlike med učinki različnih nanodelcev na (ultra) strukturne spremembe celic prebavnih žlez in razlike glede na prisotnost nanodelcev oziroma ionov v celicah prebavnih žlez ali v organizmu.

S svetlobnim in presevnim elektronskim mikroskopom smo opazili stanjšanje epitelija prebavnih žlez pri živalih, ki so bile 14 dni hranjene s hrano z nano-ZnO (koncentracije 2 000 µg/g). Pri živalih, hranjenih s hrano z ZnCl₂, tanjšega epitelija celic prebavnih žlez nismo opazili. Nekaj živali, ki so jedle hrano z dodanim nano-Ag, je imelo debelejši epitelij prebavnih žlez kot živali iz kontrole poskusa. Fiziološko stanje živali, ki smo ga opredelili na podlagi debeline epitelija in količine lipidnih kapelj v celicah B prebavnih žlez, je bilo slabo le pri živalih, ki so bile hranjene s hrano z nano-ZnO (koncentracije 5 000 µg/g). Živali s stanjšanim epitelijem in zmanjšano količino lipidnih kapelj smo uvrstili med živali, ki so bile pod stresom zaradi nanodelcev nano-ZnO.

V celicah prebavnih žlez živali, ki so bile hranjene s posameznimi nanodelci, smo opazili naslednje ultrastrukturne značilnosti: bolj pogosta lamelarna telesa, GER v obliki veziklov in razširjenih cistern, izrazitejše poškodbe na mikrovilih, bolj dolgi in razvejani mitohondriji, elektronsko bolj gosta citoplazma, bolj naguban jedrni ovoj in večja pogostost elektronsko gostih depozitov. Nekatere ultrastrukturne značilnosti v celicah kažejo na osmotski stres, druge pa na spremenjeno metabolno aktivnost zaradi prehranjevanja živali s hrano z nanodelci ali ZnCl₂. Ultrastrukturne značilnosti in spremembe v celicah glede na celice kontrole kažejo na možen vpliv nanodelcev in kovin na celični ravni. Med nanodelci srebra, cinka in titana ni bilo razlik glede vpliva na ultrastrukturne značilnosti v celicah prebavne žleze, prav tako nismo opazili razlik med različnimi koncentracijami nanodelcev. Opazili pa smo razliko med ZnCl₂ in nanodelci, in sicer je imel ZnCl₂ manjši vpliv na ultrastrukturne značilnosti v celicah prebavnih žlez

(pojavljale so se manj pogosto kot v primeru nanodelcev). Glede na to, da so bile značilnosti v ultrastrukturi in tudi spremembe v debelini epitelija in količini lipidnih kapelj v celicah prebavnih žlez pri živalih, ki so se prehranjevale s hrano z nanodelci, bolj izrazite, lahko sklepamo, da na ultrastrukturne značilnosti poleg ionov najverjetneje vplivajo tudi nanodelci.

V času prehranjevalnih poskusov smo ugotavljali tudi spremembe v prehranjevanju, preživetju živali in spremembi mase. Opazili smo le spremembo v prehranjevanju pri živalih, ki so bile hranjene s hrano z ZnCl_2 (koncentracije 2 000 in 5 000 $\mu\text{g/g}$), in sicer se je stopnja prehranjevanja znižala. Nanodelci niso povzročili sprememb v teh parametrih. Ker so to mere strupenosti, lahko zaključimo, da navedeni nanodelci pod zadevnimi testiranimi pogoji niso strupeni.

Po 14-dnevnih poskusih z nano- TiO_2 smo z metodo mikro-PIXE ugotovili prisotnost titana le v nekaterih celicah prebavnih žlez živali, ki so se prehranjevale s hrano z nano- TiO_2 , in sicer le pri najvišji koncentraciji 5 000 $\mu\text{g/g}$. Pogoja za vstop nano- TiO_2 v celice sta dovolj visoka koncentracija nano- TiO_2 in poškodovana membrana celice. Z mikro-PIXE metodo in tudi metodo EDX/TEM smo ugotovili prisotnost srebrovih ionov v celicah S prebavnih žlez že pri živalih, ki so se 14 dni prehranjevale s hrano z nižjo koncentracijo nano-Ag. Po 28-dnevnem prehranjevalnem poskusu s hrano z nano-ZnO ali ZnCl_2 smo z uporabo metode AAS ugotovili prisotnost celokupnega cinka v organizmu *P. scaber*. Do akumulacije le-tega je prišlo pri živalih, ki so se prehranjevale s hrano z višjo koncentracijo cinka (5 000 $\mu\text{g/g}$ hrane), in sicer ne glede na vir cinka (nano-ZnO ali ZnCl_2). Usoda nanodelcev v okolju in organizmih je odvisna predvsem od odtapljanja ionov iz nanodelcev. V primeru nano- TiO_2 najverjetneje ni prišlo do odtapljanja ionov, pri nano-ZnO in nano-Ag pa je prišlo.

5.2 SUMMARY

Nanoparticles are widely used in products. Due to their small size they differ from bigger particles (bulk materials) with an identical chemical structure. The biological reactivity of nanoparticles is dependent on their size, shape, chemical structure, dissolution as well as the nature of nanoparticles in the medium.

In the doctoral thesis we observed the influence of the most commonly used nanoparticles (nano-TiO₂, nano-ZnO, nano-Ag) and ZnCl₂ on the model organism, i.e. terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda; Crustacea). We strived to determine the effects of nanoparticles on (ultra) structural features of digestive gland cells and the presence of nanoparticles or ions in the digestive gland cells or in the entire organism.

Light and transmission electron microscopy revealed thinning of digestive epithelia in animals fed with nano-ZnO (concentrations 2,000 µg/g food) for 14 days. In the digestive glands of animals that were feeding with food with ZnCl₂ no epithelial thinning was observed. In the digestive glands of some animals that were feeding with food with nano-Ag we observed a thicker epithelium and more lipid droplets than in the control animals. The evaluation of the physiological condition was based on the thickness of epithelium and abundance of lipid droplets in the digestive glands. Animals that were feeding with food with nano-ZnO (concentrations 5,000 µg/g food) were all under stress.

In the digestive gland cells of animals that were feeding with food with nanoparticles we observed ultrastructural alterations: more lamellar bodies, vesiculation of endoplasmic reticulum in vesicles, alteration in microvilli, long and branched mitochondria, denser nucleus, irregular shaped nuclear envelope and more electron dense deposits. Alterations in the ultrastructure of cells occurred mostly due to the osmotic stress and changed metabolic activity. The ultrastructural alterations in cells suggest a possible effect of nanoparticles and metals on a cellular level. We did not observe various effects between nano-Ag, nano-ZnO and nano-TiO₂ on the ultrastructural alterations in the digestive glands and there were no differences between different concentrations as well. We observed a difference in effects of nanoparticles and ZnCl₂ on the ultrastructure. Alterations in the ultrastructure of digestive glands were less frequent in the case of ZnCl₂. The ultrastructural alterations, epithelial thickness and abundance of lipid droplets were prominent in animals fed with nanoparticles, so in addition to the effects of ions the effects of nanoparticles cannot be excluded as well.

During feeding experiments we also observed the feeding rate, survival and weight change of animals. The change in the feeding rate was observed only in animals that were feeding

with food with $ZnCl_2$. Nanoparticles did not cause any changes in those parameters. As these are parameters of toxicity rate, we can conclude that nanoparticles in our study under these testing conditions are not toxic.

After 14 days of feeding experiments a small amount of TiO_2 nanoparticles was observed with micro-PIXE in the digestive gland cells of some animals that were feeding with food with nano- TiO_2 at the highest concentration. We can conclude that nano- TiO_2 entered the cell if the animals were exposed to a sufficiently high concentration of nanoparticles and if the cell membrane was damaged. With micro-PIXE and TEM/EDX we discovered that in animals fed with nano-Ag for 14 days silver ions were present in small cells of digestive glands. In cases where the animals were feeding with food with nano-ZnO and $ZnCl_2$, we observed with AAS the same accumulation of zinc ions from different sources. Dissolution of ions was observed in nano-ZnO and nano-Ag but not in nano- TiO_2 .

6. VIRI

- Al-Nasser I.A. 2000. Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. *Journal of Toxicology-Clinical Toxicology*, 38, 4: 407-413
- Audinot J.N., Georgantzopoulou A., Piret J.P., Gutleb A.C., Dowsett D., Migeon H.N., Hoffmann L. 2013. Identification and localization of nanoparticles in tissues by mass spectrometry. *Surface and Interface Analysis*, 45: 230-233
- Auffan M., Rose J., Wiesner M.R., Bottero J.Y. 2009. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environmental Pollution*, 157: 1127–1133
- Bacchetta R., Santo N., Fascio U., Moschini E., Freddi S., Chirico G., Camatini M., Mantecca P. 2012. Nano-sized CuO, TiO₂ and ZnO affect *Xenopus laevis* development. *Nanotoxicology*, 6, 4: 1–18
- Borm P.J.A., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J., Krutmann J., Warheit D., Oberdorster E. 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology*, 11: 3
- Bigorgne E., Foucaud L., Lapied E., Labille J., Botta C., Sirguy C., Falla J., Rose J., Joner E.J., Rodius F., Nahmani J. 2011. Ecotoxicological assessment of TiO₂ byproducts on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 159, 10: 2698-2705
- Chen P., Dai H., Han Y., Yin M., Li S. 2008. Effect of Hydroxyapatite Nanoparticles on K562 Cells in vitro. *Journal of Wuhan University of Technology-Material. Science*, 2: 222-224
- Cong Y., Banta G.T., Selck H., Berhanu D., Valsami-Jones E., Forbes V.E. 2011. Toxic effects and bioaccumulation of nano-, micron- and ionic-Ag in the polychaete, *Nereis diversicolor*. *Aquatic Toxicology*, 105, 3-4: 403-411
- Coutris C., Hertel-Aas T., Lapied E., Joner E.J., Oughton D.H. 2012. Bioavailability of cobalt and silver nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. *Nanotoxicology*, 6: 186-195
- Croteau M.-N., Dybowska A.D., Luoma S.N., Valsami-Jones E. 2011a. A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. *Nanotoxicology*, 5, 1: 79–90
- Croteau M.N., Misra S.K., Luoma S.N., Valsami-Jones E. 2011b. Silver Bioaccumulation Dynamics in a Freshwater Invertebrate after Aqueous and Dietary Exposures to Nanosized and Ionic Ag. *Environmental Science and Technology*, 45, 15: 6600-6607
- De Berardis B., Civitelli G., Condello M., Lista P., Pozzi R., Arancia G., Meschini S. 2010. Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 246: 116-127
- Di Giorgio M.L., Di Bucchianico S., Ragnelli A.M., Aimola P., Santucci S., Poma A. 2011. Effects of single and multi walled carbon nanotubes on macrophages: Cyto and genotoxicity and electron microscopy. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 722: 20-31
- Dineley K.E., Richards L.L., Votyakova T.V., Reynolds I.J. 2002. Zinc causes loss of membrane potential and alters production of reactive oxygen species in isolated brain mitochondria. *Journal of Neurochemistry*, 81: 104-104
- Drobne D., Hopkin S.P. 1995. The Toxicity of Zinc to Terrestrial Isopods in a Standard Laboratory Test. *Ecotox Environ Safe*, 31: 1-6

- Drobne D., Strus J. 1996. The effect of Zn on the digestive gland epithelium of *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). *Pflügers Archiv*, 431, 2: 247-258
- Drobne D. 1997. Terrestrial isopods - A good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 1159-1164
- Drobne D., Milani M., Leser V., Tatti F., Zrimec A., Znidarsic N., Kostanjsek R., Strus J. 2008. Imaging of intracellular spherical lamellar structures and tissue gross morphology by a focused ion beam/scanning electron microscope (FIB/SEM). *Ultramicroscopy*, 108, 7: 663-670
- Drobne D., Jemec A., Tkalec Z.P., 2009. In vivo screening to determine hazards of nanoparticles: Nanosized TiO₂. *Environmental Pollution* 157: 1157-1164
- Ellegaard-Jensen L.; Jensen K.A.; Johansen A. 2012. Nano-silver induces dose-response effects on the nematode *Caenorhabditis elegans* *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80: 216-223
- Farkas J., Christian P., Urrea J.A., Roos N., Hassellöv M., Tollefsen K.E., Thomas K.V. 2010. Effects of silver and gold nanoparticles on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 96, 1: 44-52
- Farmen E., Mikkelsen H.N., Evensen O., Einset J., Heier L.S., Rosseland B.O., Salbu B., Tollefsen K.E., Oughton D.H. 2012. Acute and sub-lethal effects in juvenile *Atlantic salmon* exposed to low µg/L concentrations of Ag nanoparticles. *Aquatic Toxicology*, 108: 78-84
- Fisichella M., Berenguer F., Steinmetz G., Auffan M., Rose J., Prat O. 2012. Intestinal toxicity evaluation of TiO₂ degraded surface-treated nanoparticles: a combined physico-chemical and toxicogenomics approach in caco-2 cells. *Particle and Fibre Toxicology*. 9, 18: 1-13
- Ghadially F.N. 1997. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. 4th ed, Butterworth-Heinemann, Newton MA: vol 1: 617, Vol 2: 1414 str.
- Galloway T., Lewis C., Dolciotti I., Johnston B.D., Moger J., Regoli F. Sublethal toxicity of nano-titanium dioxide and carbon nanotubes in a sediment dwelling marine polychaete. *Environmental Pollution*, 158: 1748–1755
- Gaiser B.K., Fernandes T.F., Jepson M.A., Lead J.R., Tyler C.R., Baalousha M., Biswas A., Britton G.J., Cole P.A., Johnston B.D., Ju-Nam Y., Rosenkranz P., Scown T.M., Stone V. 2012. Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 1: 144-154
- Garcia-Alonso J., Khan F.R., Misra S.K. Turmaine M., Smith B.D., Rainbow P.S., Luoma S.N., Valsami-Jones E. 2011. Cellular Internalization of Silver Nanoparticles in Gut Epithelia of the Estuarine Polychaete *Nereis diversicolor*. *Environmental Science and Technology*, 45, 10: 4630-4636
- Hames C.A.C., Hopkin S.P. 1989. The Structure and Function of the Digestive-System of Terrestrial Isopods. *Journal of Zoology*, 217: 599-627
- Hames C.A.C., Hopkin S.P. 1991. A daily cycle of apocrine secretion by the B cells in the hepatopancreas of terrestrial isopods. *Canadian Journal of Zoology*, 69: 1931-1937
- Handy R.D., Owen R., Valsami-Jones E. 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17: 315–325
- Hara K., Tsujimoto H., Huang C.C., Kawashima Y., Ando R., Kusuoka O., Tamura K., Tsutsumi M. 2012. Ultrastructural and Immunohistochemical Studies on Uptake and

- Distribution of FITC-Conjugated PLGA Nanoparticles Administered Intratracheally in Rats. *Journal of Toxicological Pathology*, 25, 1: 19-26
- Heckmann L.H., Hovgaard M.B., Sutherland D.S., Autrup H., Besenbacher F., Scott-Fordsmand J.J., 2011. Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology*, 20: 226-233
- Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourgier H.-C., Kahru A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71: 1308–1316
- Heinlaan M., Kahru A., Kasemets K., Arbeille B., Prensier G., Dubourguier H.C., 2011. Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: A transmission electron microscopy study. *Water Research*, 45: 179-190
- Hodl E., Felder E., Chabicoovsky M., Dallinger R., 2010. Cadmium stress stimulates tissue turnover in *Helix pomatia*: increasing cell proliferation from metal tolerance to exhaustion in molluscan midgut gland. *Cell and Tissue Research*, 341, 1: 159-171
- Hooper H.L., Jurkschat K., Morgan A.J., Bailey J., Lawlor A.J., Spurgeon D.J., Svendsen C. 2011. Comparative chronic toxicity of nanoparticulate and ionic zinc to the earthworm *Eisenia veneta* in a soil matrix. *Environment International*, 37: 1111–1117
- Hopkin S.P., Martin M.H. 1982. The distribution of zinc, cadmium, lead and copper within the hepatopancreas of a woodlouse. *Tissue and Cell*, 14, 4: 703–715
- Hopkin S.P. 1990. Critical concentrations, pathways of detoxification and cellular ecotoxicology of metals in terrestrial arthropods. *Functional Ecology*, 4: 321–327
- Hopkin S.P. 1989. *Ecophysiology of metals in Terrestrial Invertebrates*. Elsevier, London, New York, 366 str.
- Hu C.W., Li M., Cui Y.B., Li D.S., Chen J., Yang L.Y. 2010. Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 586–591
- Inoue H., Shimada A., Kaewamatawong T., Naota M., Morita T., Ohta Y., Inoue K., Takano H. 2009. Ultrastructural changes of the air-blood barrier in mice after intratracheal instillation of lipopolysaccharide and ultrafine carbon black particles. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61, 1: 51-58
- Jemec A., Drobne D., Remškar M., Sepčič K., Tišler T. 2008. The effects of ingested nano-sized titanium dioxide on terrestrial isopods *Porcellio scaber*. Accepted for publication *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 9: 1904-1914
- Jemec A., Leser V., Drobne D. 2012. The link between antioxidant enzymes catalase and glutathione S-transferase and physiological condition of a control population of terrestrial isopod (*Porcellio scaber*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79: 42-47
- Jiang J.K., Oberdorster G., Biswas P. 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 1: 77-89
- Johnston B.D., Scown T.M., Moger J., Cumberland S.A., Baalousha M., Linge K., van Aerle R., Jarvis K., Lead J.R., Tyler C.R. 2010. Bioavailability of nanoscale metal oxides TiO(2), CeO(2), and ZnO to fish. *Environmental Science and Technology*, 44, 3: 1144-1151
- Khan F.R., Misra S.K., García-Alonso J., Smith B.D., Strekopytov S., Rainbow P.S., Luoma S.N., Valsami-Jones E. 2012. Bioaccumulation dynamics and modeling in an

- estuarine invertebrate following aqueous exposure to nanosized and dissolved silver. *Environmental Science and Technology*, 46, 14: 7621-7628
- Kim T.H., Kim M., Park H.S., Shin U.S., Gong M.S., Kim H.W. 2012. Size-dependent cellular toxicity of silver nanoparticles. *Journal of Biomedical Material Research Part A*, 100, 4: 1033-1043
- Kocbek P., Teskac K., Kreft M.E., Kristl J., 2010. Toxicological Aspects of Long-Term Treatment of Keratinocytes with ZnO and TiO₂ Nanoparticles. *Small*, 6, 17: 1908-1917
- Köhler H.R., Hüttenrauch K., Berkus M., Gräff S., Alberti G. 1996. Cellular hepatopancreatic reactions in *Porcellio scaber* (Isopoda) as biomarkers for the evaluation of heavy metal toxicity in soils. *Applied Soil Ecology*, 3: 1–15
- Kwok K.W.H., Auffan M., Badireddy A.R., Nelson C.M., Wiesner M.R., Chilkoti A., Liu J., Marinakos S.M., Hinton D.E. 2012. Uptake of silver nanoparticles and toxicity to early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Effect of coating materials. *Aquatic Toxicology*, 120: 59-66
- Laban G., Nies L.F., Turco R.F., Bickham J.W., Sepúlveda M.S. 2010. The effects of silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology*, 19, 1: 185-195
- Lapied E., Nahmani J.Y., Moudilou E., Chaurand P., Labille J., Rose J., Exbrajat J.-M., Oughton D.H., Joner E.J. 2011. Ecotoxicological effects of an aged TiO₂ nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbriculus terrestris* after exposure through water, food and soil. *Environment International*, 37: 1105–1110
- Lee K.J., Nallathamby P.D., Browning L.M., Osgood C.J., Xu X.H.N. 2007. In vivo imaging of transport and biocompatibility of single silver nanoparticles in early development of zebrafish embryos. *ACS Nano*, 1: 133-143
- Lee K.J., Browning L.M., Nallathamby P.D., Desai T., Cherukuri P.K., Xu X.H.N. 2012. In Vivo Quantitative Study of Sized-Dependent Transport and Toxicity of Single Silver Nanoparticles Using Zebrafish Embryos. *Chemical Research in Toxicology*, 25: 1029-1046
- Leser V., Drobne D., Vilhar B., Kladnik A., Znidarsic N., Strus J. 2008. Epithelial thickness and lipid droplets in the hepatopancreas of *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda) in different physiological conditions. *Zoology*, 111: 419-432
- Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D., Misra C., Sempf J., Wang M., Oberley T., Froines J., Nel A. 2003. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environmental Health Perspectives*, 111, 4: 455-460
- Li H.Y., Turner A., Brown M.T. 2013. Accumulation of Aqueous and Nanoparticulate Silver by the Marine Gastropod *Littorina littorea*. *Water Air and Soil Pollution*, 224: 1-9
- Lin H.W., Hwu W.H., Ger M.D. 2008. The dispersion of silver nanoparticles with physical dispersal procedures. *Journal of Materials Processing Technology*, 206: 56-61
- Lipovsek S., Letofsky-Papst I., Hofer F., Leitinger G., Devetak D., 2012. The evidence on the degradation processes in the midgut epithelial cells of the larval antlion *Euroleon nostras* (Geoffroy in Fourcroy, 1785) (Myrmeleontidae, Neuroptera). *Micron*, 43: 651-665
- Liu T.L., Li L.L., Fu C.H., Liu H.Y., Chen D., Tang F.Q. 2012. Pathological mechanisms of liver injury caused by continuous intraperitoneal injection of silica nanoparticles. *Biomaterials*, 33: 2399-2407

- Liu Z.S., Tang S.L., Ai Z.L. 2003. Effects of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of human hepatoma BEL-7402 cells. *World Journal of Gastroenterology*, 9, 9: 1968-1971
- Longo G., Trovato M., Mazzei V., Ferrante M., Conti G.O. 2013. *Ligia italica* (Isopoda, Oniscidea) as Bioindicator of Mercury Pollution of Marine Rocky Coasts. *Plos One*, 8: 1-10
- Lopez-Serano A., Munoz-Olivas R., Sanz Landuze J., Anasagasti M., Rainieri S., Ruiz-Gonzalez L., Camara C. 2013. Bioconcentration of ionic silver and silver nanoparticles by zebrafish eleutheroembryos. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Submitted apr. 2013
- Luoma S.N. 2008. Silver Nanotechnologies and the Environment: Old Problems or New Challenges? Publication 15. Woodrow Wilson International Center for Scholars and PEW Charitable Trusts, Washington, DC, 67 str.
- Ma H.B., Williams P.L., Diamond S.A., 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review. *Environmental Pollution*. 172: 76-85
- McTeer J., Dean A.P., White K.N., Pittman J.K. 2013. Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a freshwater algal diet and the impact of phosphate availability. *Nanotoxicology*, Early Online:1-12
- 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*. *Aquatic Toxicology*, 100: 140-150
- Monteiro-Riviere N.A., Orsiere T. 2007. Toxicological Impacts of Nanomaterials. V: *Environmental Nanotechnology: Applications and Impacts of Nanomaterials*. Wiesner M.R. in Bottero J.Y. (ur.). McGraw-Hill. New York, 11: 395-444
- Mueller N.C., Nowack B., 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science and Technology*, 42: 4447-4453
- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B., Filser J., Miao A.J., Quigg A., Santschi P.H., Sigg L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17: 372-386
- Nel A., Xia T., Madler L., Li N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311: 622-627
- Novak S., Drobne D., Valant J., Pipan-Tkalec Z., Pelicon P., Vavpetic P., Grlj N., Falnoga, I., Mazej D., Remskar M., 2012. Cell membrane integrity and internalization of ingested TiO₂ nanoparticles by digestive gland cells of a terrestrial isopod. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 1083-1090
- Onishchenko G.E., Erokhina M.V., Abramchuk S.S., Shaitan K.V., Raspopov R.V., Smirnova V.V., Vasilevskaya L.S., Gmoshinski I.V., Kirpichnikov M.P., Tutelyan V.A. 2012. Effects of titanium dioxide nanoparticles on small intestinal mucosa in rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 154, 2: 265-270
- Oosthuizen M.A., Oberholzer H.M., Scriba M.R., van der Spuy W.J., Pretorius E. 2012. Evaluation of the morphological changes in the lungs of BALB/c mice after inhalation of spherical and rod-shaped titanium nanoparticles. *Micron*, 43, 8: 863-869
- Paoletti M.G., Hassall M. 1999. Woodlice (Isopoda: Oniscidea): their potential for assessing sustainability and use as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 74: 157-165

- Park M.S., Park P., Takeda M., 2009. Starvation induces apoptosis in the midgut nidi of *Periplaneta americana*: a histochemical and ultrastructural study. *Cell and Tissue Research*, 335: 631-638
- Pawert M., Triebkorn R., Graff S., Berkus M., Schulz J., Kohler H.R., 1996. Cellular alterations in collembolan midgut cells as a marker of heavy metal exposure: Ultrastructure and intracellular metal distribution. *Science of the Total Environment*, 181: 187-200
- Perkins G.A., Frey T.G. 2000. Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron*, 31, 1: 97-111
- Physical Properties of Zinc Oxide – CAS 1314-13-2. International Zinc Association, Bruselj, Belgija. <http://www.znoxide.org/properties.html> (dec. 2012)
- Pipan Tkalec T., Drobne D., Jemec A., Romih T., Zidar P., Bele M. 2010. Zinc bioaccumulation in a terrestrial invertebrate fed a diet treated with particulate ZnO or ZnCl₂ solution. *Toxicology*, 269: 198–203
- Prosi F., Dallinger R., 1988. Heavy metals in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latreille. I. Histochemical and ultrastructural characterization of metal-containing lysosomes. *Cell Biology and Toxicology*, 4: 81-96
- Pulskamp K., Diabate S., Krug H.F., 2007. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology Letters*, 168: 58-74
- Resano M., Lapena A.C., Belarra M.A. 2013. Potential of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry to monitor the Ag body burden in individual *Daphnia magna* specimens exposed to Ag nanoparticles. *Analytical Methods*, 5: 1130-1139
- Qi L.F., Xu Z.R., Li Y., Jiang X, Han X.Y. 2005. In vitro effects of chitosan nanoparticles on proliferation of human gastric carcinoma cell line MGC803 cells. *World Journal of Gastroenterology*, 11, 33: 5136-5141
- Remškar M. 2009. Nanodelci in nanovarnost. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje, Urad RS za kemikalije: 103 str.
- Resano M., Lapena A.C., Belarra M.A. 2013. Potential of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry to monitor the Ag body burden in individual *Daphnia magna* specimens exposed to Ag nanoparticles. *Analytical Methods*, 5: 1130-1139
- Reyes-Coronado D., Rodríguez-Gattorno G., Espinosa-Pesqueira M.E., Cab C., de Coss R., Oskam G. 2008. Phase-pure TiO₂ nanoparticles: anatase, brookite and rutile *Nanotechnology*, 19: 1-14
- Roh J.Y., Sim S.J., Yi J., Park K., Chung K.H., Ryu D.Y., Choi J. 2009. Ecotoxicity of Silver Nanoparticles on the Soil Nematode *Caenorhabditis elegans* Using Functional Ecotoxicogenomics. *Environmental Science & Technology*, 43: 3933-3940
- Ruppert E.E., Fox R.S., Barnes R.D. 2004. *Invertebrate Zoology. A Functional Evolutionary Approach*. 7th edition. Belmont, ZDA, Brooks/Cole – Thomson Learning: 661–667 str.
- Sancho-Martínez S.M., Prieto-García L., Prieto M., López-Novoa J.M., López-Hernández F.J. 2012. Subcellular targets of cisplatin cytotoxicity: an integrated view. *Pharmacology and Therapeutics*, 136, 1: 35-55

- Schmitz G., Müller G. 1991. Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *Journal of Lipid Research*, 32, 10: 1539-1570
- Scown T.M., van Aerle R., Johnston B.D., Cumberland S., Lead J.R., Owen R., Tyler C.R. 2009. High doses of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles accumulate in the kidneys of rainbow trout but with no observable impairment of renal function. *Toxicological Science*, 109, 2: 372-380
- Shu Y.H., Zhang G.R., Wang J.W., 2012. Response of the common cutworm *Spodoptera litura* to zinc stress: Zn accumulation, metallothionein and cell ultrastructure of the midgut. *Science of the Total Environment*, 438: 210-217
- Shoults-Wilson W.A., Reinsch B.C., Tsyusko O.V., Bertsch P.M., Lowry G.V., Unrine J.M. 2011a. Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms (*Eisenia fetida*), *Nanotoxicology*, 5, 3: 432-444
- Shoults-Wilson W.A., Reinsch B.C., Tsyusko O.V., Bertsch P.M., Lowry G.V., Unrine J.M. 2011b. Role of Particle Size and Soil Type in Toxicity of Silver Nanoparticles to Earthworms. *Soil Science Society of America Journal*, 75: 365-377
- Strus J., Burkhardt P., Storch V. 1985. The ultrastructure of the midgut glands in *Ligia italica* (Isopoda) under different nutritional conditions. *Helgolander meeresuntersuchungen biologische anstalt helgoland*, 39: 367-374
- Strus J. 1987. The effects of starvation on the structure and function of the hepatopancreas in the isopod *Ligia italica*. *Investigacion Pesquera*, 51, 1: 505-514
- Strus J., Drobne D., Licar P. 1995. Comparative anatomy and functional aspects of the digestive system in amphibious and terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). In: Alikhan, M.A. (Ed.). *Terrestrial isopod biology*. A.A. Balkema, Rotterdam, 15-23 str.
- Strus J., Blejec A. 2001. Microscopic anatomy of the integument and digestive system during the molt cycle in *Ligia italica* (Oniscidea). in: *Isopod systematics and evolution*, A. A. Balkema, (Crustacean issues, 13), Kensley B., Brusca R. C. (Eds), Rotterdam, Brookfield, 343 str.
- Sun J., Ding T. 2009. p53 reaction to apoptosis induced by hydroxyapatite nanoparticles in rat macrophages. *Journal of Biomedical Material Research Part A*, 88, 3: 673-679
- Sun L., Li Y., Liu X., Jin M., Zhang L., Du Z., Guo C., Huang P., Sun Z. 2011. Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. *Toxicology In Vitro*, 25, 8: 1619-1629
- Tarnawska M., Migula P., Przybyłowicz W., Mesjasz-Przybyłowicz J., Augustyniak M. 2007. Nickel toxicity in the hepatopancreas of an isopod *Porcellio scaber* (Oniscidea). *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms*, 260: 213-217
- Taylor U., Klein S., Petersen S., Kues W., Barcikowski S., Rath D. 2010. Nonendosomal cellular uptake of ligand-free, positively charged gold nanoparticles. *Cytometry Part A*, 77, 5: 439-446
- Tkalec Z.P., Drobne D., Vogel-Mikus K., Pongrac P., Regvar M., Strus J., Pelicon P., Vavpetic P., Grlj N., Remskar M., 2011. Micro-PIXE study of Ag in digestive glands of a nano-Ag fed arthropod (*Porcellio scaber*, Isopoda, Crustacea). *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms*, 269: 2286-2291

- Tourinho P.S., van Gestel C.A.M., Lofts S., Svendsen C., Soares A.M.V.M., Loureiro S., 2012. Metal-based nanoparticles in soil: Fate, behavior, and effects on soil invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31: 1679-1692
- Tseng M.T., Lu X., Duan X., Hardas S.S., Sultana R., Wu P., Unrine J.M., Graham U., Butterfield D.A., Grulke E.A., Yokel R.A. 2012. Alteration of hepatic structure and oxidative stress induced by intravenous nanocerium. *Toxicol and Applied Pharmacology*, 260, 2: 173-182
- Unfried K., Albrecht C., Klotz L.O., Von Mikecz A., Grether-Beck S., Schins R.P.F., 2007. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1: 52-71
- Valant J., Drobne D., Novak S., 2012. Effect of ingested titanium dioxide nanoparticles on the digestive gland cell membrane of terrestrial isopods. *Chemosphere* 87: 19-25
- Valant J., Drobne D., Sepcic K., Jemec A., Kogej K., Kostanjsek R., 2009. Hazardous potential of manufactured nanoparticles identified by in vivo assay. *Journal of Hazardous Materials*, 171: 160-165
- Vogel-Mikuš K. et al. Micro-PIXE Analysis for Localisation and Quantification of Elements in Roots of Mycorrhizal Metal-Tolerant Plants, in: *Symbiotic fungi: principles and practice*. (Soil biology, 18), A. Varma, A.C. Kharkwal (Eds.), Springer, Heidelberg, 2009, 227 str.
- Vogel-Mikuš K., Pongrac P., Kump P., Nečemer M., Simčič J., Pelicon P., Budnar M., Povh B., Regvar M. 2007. Localisation and quantification of elements within seeds of Cd/Zn hyperaccumulator *Thlaspi praecox* by micro-PIXE. *Environmental Pollution*, 147, 1: 50-59
- Vogel-Mikuš K., Regvar M., Mesjasz-Przybyłowicz J., Przybyłowicz W.J., Simčič J., Pelicon P., Budnar M. 2008. Spatial distribution of cadmium in leaves of metal hyperaccumulating *Thlaspi praecox* as revealed by micro-PIXE. *New Phytologist*, 179, 3: 712-721
- Wägele J.W. 1992. Isopoda. Microscopic anatomy of invertebrates. Wiley- Liss, New York, 559-625 str.
- Wang H.H., Wick R.L., Xing B.S., 2009. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, 157: 1171-1177
- Wang J., Liu Y., Jiao F., Lao F., Li W., Gu Y., Li Y., Ge C., Zhou G., Li B., Zhao Y., Chai Z., Chen C. 2008. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology*, 254, 1-2:82-90
- Wang J.X., Zhou G.Q., Chen C.Y., Yu H.W., Wang T.C., Ma Y.M., Jia G., Gao Y.X., Li B., Sun J., Li Y.F., Jiao F., Zhao Y.L., Chai Z.F., 2007. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicology Letters*, 168: 176-185
- Wang X., Guo J., Chen T., Nie H.Y., Wang H.F., Zang J.J., Cui X.X., Jia G., 2012. Multi-walled carbon nanotubes induce apoptosis via mitochondrial pathway and scavenger receptor. *Toxicology in Vitro*. 26: 799-806
- Wiench K., Wohlleben W., Hisgen V., Radke K., Salinas E., Zok S., Landsiedel R. 2009. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 76: 1356-1365

- Williams P.L., James R.C, Roberts S.M. 2000. Principles of toxicology. Enviromental and Industrial Applications. 2th ed John Wiley and sons, New York, 603 str.
- Wu G.X., Gao X., Ye G.Y., Li K., Hu C., Cheng J.A. 2009. Ultrastructural alterations in midgut and Malpighian tubules of *Boettcherisca peregrina* exposure to cadmium and copper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 1137-1147
- Yang X.Y., 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*. *Environmental Science and Technology*, 46, 2: 1119-1127
- Zensi A., Begley D, Pontikis C., Legros C., Mihoreanu L., Wagner S., Büchel C., von Briesen H., Kreuter J. 2009. Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *Journal of Controlled Release*, 137, 1: 78-86
- Zhang L.L., Jiang Y.H., Ding Y.L., Povey M., York D., 2007. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). *Journal of Nanoparticle Resarch*, 9: 479-489
- Zimmer M. 2002. Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): an evolutionary ecological approach, *Biology Reviews* 77: 455–493
- Zhao C.M., Wang W.X. 2012a. Importance of surface coatings and soluble silver in silver nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*, *Nanotoxicology*, 6, 4: 361-370
- Zhao C.M., Wang W.X. 2012b. Size-Dependent Uptake of Silver Nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology*, 46: 11345-11351
- Zhu X., Chang Y., Chen Y. 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, 7, 3:209-15
- Zidar P., Drobne D., Strus J., Blejec A. 2003. Intake and assimilation of zinc, copper, and cadmium in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latr. (Crustacea, Isopoda). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70, 5: 1028-1035
- Zidar P., Bozic J., Strus J. 2005. Behavioral response in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea) offered a choice of uncontaminated and cadmium-contaminated food. *Ecotoxicology*, 14: 493-502
- Zidar P., van Gestel C.A.M., Štrus J. 2009. Single and joint effects of Zn and Cd on *Porcellio scaber* (Crustacea, Isopoda) exposed to artificially contaminated food. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72, 8: 2075-2082
- Znidaršič N., Strus J., Drobne D. 2003. Ultrastructural alterations of the hepatopancreas in *Porcellio scaber* under stress. *Enironmental Toxicology and Pharamcology*, 13: 161-174