

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jernej ČEBELA

**UREJANJE PODATKOV O VPLIVIH
NANOMATERIALOV NA ENCIME ZA STATISTIČNO
OBDELAVO IN RAČUNALNIŠKO MODELIRANJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Jernej ČEBELA

**UREJANJE PODATKOV O VPLIVIH NANOMATERIALOV NA
ENCIME ZA STATISTIČNO OBDELAVO IN RAČUNALNIŠKO
MODELIRANJE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**MANIPULATION OF DATA SETS OF NANOMATERIALS EFFECT ON
ENZYMES FOR STATISTICAL EVALUATION AND
COMPUTATIONAL MODELING**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je dne 15. 1. 2016 sprejela temo in za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Damjano Drobne.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Kristina SEPČIĆ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Matej BUTALA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Damjana DROBNE, mentorica

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Marjan VRAČKO GROBELŠEK, somentor

Kemijski inštitut, Laboratorij za kemometrijo

Datum zagovora:

Podpisani izjavljam, da je naloga rezultat lastnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravico shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Jernej ČEBELA

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 620.3(043.2)=163.6
KG Podatkovne baze poskusov vpliva NM na encime/MTT test/EC_{20/50/80}/
IC_{20/50/80}/večparameterska linearna regresijska analiza/biološki deskriptor
AV ČEBELA, Jernej
SA DROBNE, Damjana (mentorica)/ VRAČKO GROBELŠEK, Marjan (somentor)
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2016
IN UPORABA RAČUNALNIŠKIH PRISTOPOV ZA UGOTAVLJANJE VPLIVA
NANOMATERIALOV NA ENCIME
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX. 34 str., 7 pregl., 4 sl., 62 vir.
IJ SI
JI sl/en
AI Razumevanje mehanizmov delovanja nanomaterialov (NM) na biološke sisteme so bistven del v okviru nanotoksikoloških študij, vendar ostajajo nepojasneni predvsem glede povezave med fizikalno-kemijskimi lastnosti NM in kvarnimi učinki. Računalniško modeliranje je pogosto uporabljan pristop za povezovanje širokega nabora eksperimentalnih podatkov v smiselne zaključke, pri čemer se je zaradi pomanjklivega razumevanja izrazila potreba po dodatnem biološkem deskriptorju NM za povezavo med fizikalno-kemijskimi lastnostmi NM in njihovim biološkim učinkom. Kot ta deskriptor smo izbrali inhibicijo encima butirilholiesteraze (BChE) konjskega izvora (*Equus caballus*) z izbranimi NM in adsorpcijo BChE na NM na podlagi baze podatkov rezultatov predhodno opravljenih poskusov. Za vsak NM smo izračunali učinkovite koncentracije NM za adsorpcijo in inhibicijo pri 20%, 50% in 80% (EC/IC_{20/50/80}) s programom OriginPro 2016, ter opravili test viabilnosti *in vitro* na trajni celični liniji humanega osteosarkoma (MG-63). Z računalniškim modelom večparameterske linearne regresijske metode smo ovrednotili povezavo med odvisno spremenljivko, minimalno koncentracijo NM, kjer je opažena statistično značilna razlika, ovrednotena s testom viabilnosti, ter neodvisnimi spremenljivkami (fizikalno-kemijski in biološki deskriptorji NM). Rezultati računalniškega modela so pokazali, da je struktura NM edini izmed izbranih fizikalno-kemijskih lastnosti, ki kaže korelacijo z vplivom NM na viabilnost celic. Dokažemo, da biološki deskriptorji lahko izboljšajo napovedno sposobnost modela, ter s tem potrdijo primernost uporabe bioloških deskriptorjev pri računalniškem modeliranju vpliva NM na biološke sisteme.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDK 620.3(043.2)=163.6
- CX Nanomaterials effect on enzymes databases/MTT test/EC_{20/50/80}/IC_{20/50/80}/multilinear regression analysis/biological descriptor
- AU ČEBELA, Jernej
- AA DROBNE, Damjana (supervisor)/ VRAČKO GROBELŠEK, Marjan (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2016
- TI COMPUTATIONAL APPROACHES FOR THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF NANOMATERIALS ON ENZYMES
- DT Graduation Thesis, University studies
- NO IX. 34 p., 7 tab., 4 fig., 62 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Nanomaterials' (NM) mode of action is an essential part of nanotoxicological studies, however it remains largely unexplained in the nanoscientific community, especially the correlations between NM' physicochemical properties and their harmful effects on biological systems. Computational modeling is a widely employed method to find these correlations from large databases of experimental data; where the lack of understanding of the modes of action caused a need for a biological descriptor of NM has arose in order to link the physicochemical properties of NM and their biological effect. For this descriptor we have decided on the adsorption of butyrylcholinesterase (BChE) from horse (*Equus caballus*) serum to the tested NM and inhibition of BChE in the presence of the NM. Results of the biochemical enzymatic tests were gathered from a preexistent database of experiments. For each NM type the effective concentration of NM at 20%, 50% or 80% adsorption and inhibition (EC/IC_{20/50/80}) were calculated using the software OriginPro 2016, as well as *in vitro* cell viability experiments on cell cultures of human osteosarcoma (MG-63) were run using the same NM batches. With the multilinear regression computational model we have evaluated the correlation between the dependent variable the lowest observed adverse effect level of the concentration of NM, based on the viability assay and the independent variables (physicochemical descriptors and biological descriptors of NM). The outcomes of the computational model have shown that the structure of NM is the only physicochemical property which has exhibited a correlation with NM effect on cell viability. We also concluded that the selected biological descriptors do increase the computational model accuracy and are therefore suitable for applications as biological descriptors in future computational modeling of NM's effects on biological systems.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija	III
Key words documentation	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZA	1
1.2 NAMEN IN IZHODIŠČA	1
1.3 PRIČAKOVANI REZULTATI	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NANOTEHNOLOGIJA IN NANOMATERIALI	3
2.1.1 Ogljikovi nanomateriali	3
2.1.1.1 Grafen in njegovi derivati	4
2.1.1.2 Ogljikove nanocevke	4
2.1.1.3 Amorfni ogljik	4
2.1.2 Nanodelci titanovega dioksida	4
2.2 INTERAKCIJE NANOMATERIALOV Z BIOLOŠKIMI SISTEMI	5
2.2.1 Oblikovanje (proteinske) korone	5
2.2.2 Biološka reaktivnost testiranih nanomaterialov s proteini	5
2.2.2.1 Ogljikovi nanomateriali	5
2.2.2.2 Nanodelci TiO ₂	6
2.3 METODE ZA PROUČEVANJE INTERAKCIJ MED NANOMATERIALI IN ENCIMI	6
2.4 TESTI VIABILNOSTI <i>IN VITRO</i>	6
2.5 STATISTIČNI PREDVIDNI MODELI	7
2.5.1 Linearni model	7
3 MATERIAL IN METODE	8
3.1 ZAJEM PODATKOV	8
3.1.1 Združevanje podatkov in izračun vrednosti IC/EC	8
3.1.2 Pregled (ang. <i>screening</i>) podatkov	9

3.1.3 Priprava in karakterizacija suspenzij ogljikovih nanomaterialov in nanodelcev TiO₂, uporabljenih v testu viabilnosti	9
3.1.4 Testiranje viabilnosti in vitro s testom MTT	10
3.1.5 Statistična obdelava podatkov	11
3.1.5.1 Priprava podatkov za statistično obdelavo	11
3.1.6 Analiza podatkov z linearnim modelom	11
3.1.6.1 Linearni model	11
4 REZULTATI	13
4.1 Obdelani podatki encimskih testov vpliva NM na aktivnost BChE	13
4.2 Vrednosti adsorpcijskih koncentracij nanomaterialov in inhibitornih koncentracij nanomaterialov encima butirilholinesteraze	13
4.3 Viabilnost celične linije MG-63 po izpostavitvi NM, ovrednoteno s testom viabilnosti MTT	14
4.4 Rezultati testa viabilnosti celic in lastnosti NM, pripravljeni za statistično obdelavo	16
4.5 Analiza korelacije med fizikalnimi in biološkimi deskriptorji ter biološko lastnostjo nanomaterialov	17
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	21
5.1 Razprava	21
5.1.1 Priprava in obdelava podatkov	21
5.1.1.1 Ustvarjanje baze podatkov iz ločenih baz poskusov in pregled podatkov	21
5.1.1.2 Vrednosti EC/IC _{20/50/80}	23
5.1.1.3 Testiranje viabilnosti <i>in vitro</i> s testom MTT in vrednost LOAEL	24
5.1.1.4 Pomen izbranih-fizikalno kemijskih in bioloških deskriptorjev za analize z računalniškimi modeli	25
5.1.1.5 Pomen izbranih metodoloških pristopov za vrednotenje vpliva NM na biološke sisteme	25
5.1.2 Večparametrna linearna regresijska metoda	25
5.2 SKLEPI	27
6 POVZETEK	28
7 VIRI	29

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Razlika med dejanskimi in predvidevanimi vrednosti EC, absolutna razlika in razlika v %, izražena na delež celote.	14
Preglednica 2: Obdelani podatki za viabilnost celic testa MTT	15
Preglednica 3: Zbrani in preračunani podatki za večparametersko linearno regresijsko metodo	16
Preglednica 4: Kvadrati korelacijskih koeficientov (R^2) med posameznimi deskriptorji in lastnostjo LOAEL	17
Preglednica 5: Odstranjen ubežnik NM04 in ponovno izračunani faktorji korelacije za posamezne deskriptorje	18
Preglednica 6: Kombinacije bioloških deskriptorjev s fizikalnim deskriptorjem.	19
Preglednica 7: Nabor delcev in testiranih encimov začetne podatkovne baze	22

KAZALO SLIK

Slika 1: Primer razpršenega grafa adsorpcije BChE (<i>E. caballus</i>) na TiO ₂	96	13
Slika 2: Viabilnost celic trajne linije MG-63 po 24-urni izpostavitvi GO		15
Slika 3: Prikaz primernosti opisnega modela LOAEL s korelacijsko vrednostjo $R^2=0,7450$	18	18
Slika 4: Prikaz primernosti opisnega modela LOAEL s korelacijsko vrednostjo $R^2=0,9673$	20	20

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

- AChE – encim acetilholinesteraza
BChE – encim butirilholinesteraza
CB – amorfni ogljik (ang. *carbon black*)
CNT – ogljikove nanocevke (ang. *carbon nanotubes*)
DB – biološki deskriptor
DF – fizikalno-kemični deskriptor
DMEM – gojišče za celične kulture (ang. *Dulbecco's modified Eagle's medium-glutaMAX*)
DMSO – dimetilsulfoksid
EC₂₀ – koncentracija NM, ki veže 20% molekul BChE
EC₅₀ – koncentracija NM, ki veže 50% molekul BChE
EC₈₀ – koncentracija NM, ki veže 80% molekul BChE
FBS – fetalni goveji serum (ang. *fetal bovine serum*)
GO – ploščice grafenovega oksida (ang. *graphene oxide*)
IC₂₀ – koncentracija NM, potrebna, da povzroči 20% inhibicijo BChE
IC₅₀ – koncentracija NM, potrebna, da povzroči 50% inhibicijo BChE
IC₈₀ – koncentracija NM, potrebna, da povzroči 80% inhibicijo BChE
LOAEL – statistično značilna sprememba pri najmanjši opaženi koncentraciji (ang. *lowest-observed-adverse-effect level*)
MG-63 – trajne celične linije humanega osteosarkoma
MILLIQ – voda čistosti tipa I (prevodnost pri 25°C manj kot 0,1 μS·cm⁻¹)
MTT – (1-(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid
MWCNT – večplastne ogljikove nanocevke (ang. *multi.walled carbon nanotubes*)
N/A – brez vpliva
NADPH⁺ - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
ND – nanodelec/nanodelci
NM – nanomaterial/nanomateriali
NSC – ang. *Nano safety cluster*; Evropska iniciativa za povečanje sinergij med projekti FP6 in FP7
QSAR – kvantitativna analiza povezave strukture in aktivnosti (ang. *quantitative structure–activity relationship*)
QSPR – kvantitativna analiza povezave strukture in lastnosti (ang. *quantitative structure–property relationship*)
R² – korelacijski koeficient
RM – reakcijska zmes
SOP – standardiziran operacijski protokol (ang. *standard operating procedures*)
TiO₂ – nanodelci titanovega oksida
ZP – zeta potencial

1 UVOD

Naraščajoča proizvodnja in široka uporaba nanomaterialov (NM) vodi do vedno večje izpostavljenosti ljudi in okolja različnim proizvodom nanotehnologij. Posledica tega je razvoj novih znanstvenih disciplin (npr. nanobiologija in nanotoksikologija), ki proučujejo interakcije med NM in biološkimi sistemi. Številni evropski projekti se ukvarjajo z organizacijo teh podatkov in pridobivanju novega znanja o njihovem vplivu na procese v celicah (npr. eNanoMapper, NanoPUZZLES, EU COST MODENA action, ModENPTox, MODERN, PreNanoTox, MembraneNanoPart in drugi (<http://www.compnanotox2015.eu/>)), a kljub temu mehanizmi delovanja in kvarni učinki NM še vedno niso pojasnjeni; eden od razlogov je neustrezna organizacija in pomanjkljiva povezanost številnih podatkov o bio-nano interakcijah.

Nanomaterialom lahko določimo primarne lastnosti (velikost, oblika, in površinske lastnosti) in njihove lastnosti v suspenziji (agregacija, aglomeracija, raztapljanje). Lastnosti NM v suspenziji se bistveno spremenijo ob stiku s kompleksnim biološkim okoljem, zato je skoraj nemogoče predvideti učinke NM na podlagi njihovih primarnih lastnosti. Eden od načinov reševanja tovrstnih kompleksnih problemov je računalniško modeliranje. V okviru nanotoksikoloških in nanobioloških znanosti se je izrazila potreba po dodatnem, biološkem deskriptorju NM, ki bi povezal fizikalno-kemijske lastnosti NM z njihovim biološkim učinkom (Sedykh in sod., 2011).

1.1 HIPOTEZA

V nalogi predpostavljamo, da:

1. Obstajajo povezave med fizikalno-kemijskimi lastnostmi NM (površinski naboj NM v suspenziji), vplivom NM na aktivnost encimov holinesteraz in kvarnim učinkom NM na celice *in vitro*.
2. Inhibicija encimov v prisotnosti NM narekuje njihov strupenostni vpliv na celice, ovrednoten s konvencionalnim testom viabilnosti *in vitro*.
3. Vrednotenje aktivnosti encimov holinesteraz predstavlja ustrezn biološki deskriptor.

1.2 NAMEN IN IZHODIŠČA

V nalogi bomo kot biološki deskriptor NM ovrednotili spremembo encimske aktivnosti ob izpostavitvi encima specifičnem NM na podlagi rezultatov že izvedenih testov s strani Skupine za nanobiologijo in nanotoksikologijo, Katedre za zoologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Vrednotenje aktivnosti encimov ob prisotnosti NM in njihove adsorpcije na NM je potekalo po ustaljenih eksperimentalnih postopkih (ang. *standard operating procedures*, SOP; Mesarič in sod. 2013; Sopotnik in sod. 2015). Ustrezna organizacija in povezovanje (korelacije) tovrstnih rezultatov je temelj biološke karakterizacije NM, ki povezuje njihove fizikalno-

kemijske lastnosti, ovrednotene v suspenziji, z izmerjenimi vrednostmi viabilnosti celic po izpostavitvi NM na celičnih kulturah *in vitro*.

1.3 PRIČAKOVANI REZULTATI

Pričakujemo, da NM z različnimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, kot je npr. površinski naboj v suspenziji, ovrednoten z meritvami zeta potenciala (ZP), različno vplivajo na aktivnost testnega encima, t.j. izolirane butirilholinesteraze iz organizma *Equus caballus*. Pričakujemo, da bodo NM z višjimi absolutnimi vrednostmi ZP bolj izrazito vplivali na zmanjšanje encimske aktivnosti v prisotnosti NM. Poleg tega predpostavljamo, da bodo NM z višjim ovrednotenim vplivom na spremenjeno encimsko aktivnost povzročili bolj izrazit strupenostni vpliv na sesalčje celice v kulturi *in vitro*.

Pričakujemo, da bomo na podlagi analize združenih rezultatov, pridobljenih s kombinacijo eksperimentalnih podatkov encimskih testov in testov viabilnosti *in vitro*, z uporabo izbranih statističnih pristopov ponudili kritično oceno ustreznosti vrednotenja aktivnosti encimov holinesteraz kot bioloških deskriptorjev NM. S tem bomo prispevali k razvoju novih bioloških metod karakterizacije NM, ki bodo predstavljale povezavo med fizikalno-kemijskimi pristopi in konvencionalnimi testi strupenosti *in vitro*. Tak način biološke karakterizacije NM bo omogočil enostavno, hitrejšo in cenovno učinkovitejšo oceno strupenosti in/ali aktivnosti NM, primerno kot preliminarno oceno strupenosti NM, t.j. pred izvedbo testov viabilnosti *in vitro* ter nadalje *in vivo*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANOTEHNOLOGIJA IN NANOMATERIALI

Nanotehnologija nedvoumno predstavlja eno izmed najobetavnejših in najhitreje rastočih tehnologij zadnjega desetletja. Njeni proizvodi, nanomateriali (NM), se bistveno razlikujejo od materialov večje velikosti, a enake kemijske sestave; znano in dokazano je, da imajo manjši delci večje razmerje med številom atomov na površini in prostornino, kar pomeni, da so delci nanometrskih dimenzij bolj reaktivni (Nel in sod., 2009). Uporaba proizvedenih NM v vsakdanjem življenju strmo narašča in zajema širok spekter proizvodov različnih industrijskih panog, kot so npr. ojačevalci barv v izdelkih prehranske in tekstilne industrije. Za širšo javnost je aktualna tudi uporaba NM kot antibakterijskih agensov (Hajipour in sod. 2012), v prihodnosti pa pričakujemo dodatni porast raziskovalne usmerjenosti k uporabi NM v medicini, v terapevtske in diagnostične namene (Aguilar, 2010). Pomembno je, da so NM kompatibilni ob stiku z biološkim okoljem, kar pomeni, da ne sprožijo neželenega vnetnostnega in/ali strupenostnega odziva v telesu. Uporaba v vseh naštetih panogah, predvsem v medicinske namene, tako zahteva natančno in sistematično ovrednotenje lastnosti NM še pred stikom z živimi organizmi (Naahidi in sod., 2013; Mitragotri in sod. 2015).

Rezultat hitrega razcveta nanotehnologij je velika raznolikost lastnosti NM. Nanomateriale lahko v splošnem opišemo s primarnimi lastnostmi NM, t.j. obliko, velikostjo jedra, površinske lastnosti in kemijsko sestavo. Poznamo npr. nanodelce (ND; posamezni delci sferične oblike s premerom, manjšim od 100 nm), dvodimenzionalne NM (npr. ploščice grafenovega oksida), ter NM z le eno dimenzijo, večjo od 100 nm, to so nanovlakna, nanocevke in nanožice. Za pripravo biološko kompatibilnih delcev in hkrati dobro dispergiranih v suspenziji so na NM pogosto adsorbirane ali kemijsko vezane različne molekule (npr. citronska ali oleinska kislina ali različni polimeri). Glede na sestavo jedra pa so najbolj raziskani kovinski ND (zlata in srebrovi ND) in ND kovinskih oksidov (titanov dioksid, bakrov oksid, nanodelci železovega oksida, itd.), vedno večja pozornost pa se posveča ogljikovim NM (Borm in sod., 2006; Lynch in sod., 2014).

2.1.1 Ogljikovi nanomateriali

Zaradi edinstvene kombinacije električnih, termičnih, kemičnih in mehaničnih lastnosti imajo ogljikovi materiali nanodimenzij imajo posebno mesto na področju nanotehnoloških in posledično nanobioloških znanosti. Najpogosteje raziskani ogljikovi NM so fulereni (sferična kletka iz 60 ali več ogljikovih atomov), dvodimenzionalne ploščice grafena in njegovih derivatov, ter ogljikove nanocevke (ang. *carbon nanotubes*, CNT). Vse našete oblike NM se uporabljajo v kompozitnih materialih, energetiki, senzorjih, ter se pospešeno raziskujejo za uporabo v biomedicini (Hurt in sod., 2006; Naahidi in sod., 2013).

2.1.1.1 Grafen in njegovi derivati

Aromatski obroč grafena oz. molekula grafena je produkt razslojitve grafita v posamezne plasti; oksidirane plasti pa predstavljajo ploščice grafenovega oksida (GO) (Geim in Novoselov, 2004). Dvodimenzionalnost tega NM ter kombinacija fizikalno-kemijskih lastnosti omogoča široko uporabo grafena in njegovih derivatov ne le v elektronskih napravah, prevodnikih in nanokompozitnih materialih, ampak tudi v različnih medicinskih aplikacijah. Visok adsorpcijski potencial in dvodimenzionalna oblika omogočata uporabo grafena kot biosenzorskega sistema za tarčno dostavo zdravil (Yang in sod., 2010), ali tudi kot sintetičnega inhibitorja delovanja različnih proteinov (De in sod., 2011).

2.1.1.2 Ogljikove nanocevke

Ogljikove nanocevke so zgrajene iz enojne, dvojne ali večslojne plasti grafena, dolge od manj kot enega μm do nekaj μm , s premerom od nekaj nm in tudi do 200 nm (slednje velja za večplastne cevke) (Meng in sod., 2012; Hou in sod., 2003). Njihova majhna molekulska masa, a hkrati lastnosti visoke mehanske trdnosti ter visoke električne in toplotne prevodnosti in kapacitete adsorpcije imajo velik potencial uporabe kot nanobiokatalizatorji in biosenzorji, pa tudi kot prenašalci zdravil in različnih proteinov, tudi encimov (Wang in sod., 2009; Zhang in sod., 2013).

2.1.1.3 Amorfn ogljik

Posebna oblika ogljikovih NM je amorfn ogljik (ang. *carbon black*, CB), ki predstavlja produkt nepopolnega izgorevanja katranskih naftnih derivatov v obliki črnega praha, sestavljenega iz agregatov delcev velikosti od 20 do 300 nm (Hussain in sod., 2009). V študijah je pogosto uporabljen kot primerjalni, pozitivni referenčni material, ter kot pozitivni modelni sistem izpušnih delcev dizelskih goriv (Jackson in sod., 2012).

2.1.2 Nanodelci titanovega dioksida

Nanodelci titanovega dioksida (TiO_2) lahko nastopajo v različnih kristalnih oblikah, med njimi sta najpogostejši tetragonalni obliki (anatazna in rutilna). Obe kristalni obliki sta visoko fotokatalitični, kar pomeni, da ob vzbujanju s svetlobo tvorita elektronske pare (postanejo močan oksidant) (Scalafani in Herrmann, 1996; Hirakawa in sod., 2004).

Uporaba inertnega prahu TiO_2 mikrometrskih velikosti je zelo razširjena že desetletja v produktih kozmetične, prehranske, tekstilne industrije in industriji barv, in v realnih izpostavitvenih dozah nima značilnega strupenostnega učinka. V zadnjem desetletju ali dveh je proizvodnja TiO_2 intenzivno usmerjena k delcem nanometrskih velikosti za uporabo

razkuževanja površin, posledic onesnaževanja, in tudi v različnih prehrabnih, kozmetičnih in farmacevtskih produktih, sončnih celicah in električnih napravah (Mital in Manoj, 2011).

2.2 INTERAKCIJE NANOMATERIALOV Z BIOLOŠKIMI SISTEMI

Proučevanje bio-nano interakcij, definirano kot proučevanje interakcij med entitetami v nanometrskem velikostnem razponu ter biološkimi sistemi, je posebno pomembno za razumevanje interakcij proizvedenih NM (Lynch in sod., 2014).

2.2.1 Oblikovanje (proteinske) korone

Eden od prvih stikov NM, namenjenih za medicinsko uporabo, *in vivo* je na nivoju krvi, torej s krvnimi celicami in s proteini bogato krvno plazmo. Dokazano je, da se ob stiku NM z biološkim okoljem na površini NM oblikuje plast proteinov, t.i. proteinska korona (Cedervall in sod., 2007; Lundqvist in sod., 2008). Poleg proteinov se v manjši meri vežejo tudi molekule sladkorjev in maščob, in ta celotni sloj na površini NM igra ključno vlogo pri biokompatibilnosti, biološki prepoznavnosti, reaktivnosti NM in usodi NM v organizmu (Monopoli in sod., 2012; Saphtharsi in sod., 2013).

Trenutno velja prepričanje, da je vezava bioloških molekul na površino NM v največji meri odvisna od površinskih lastnosti NM, kar pomeni kemijsko vezane funkcionalne skupine ali adsorbirane molekule na površini NM (Cedervall in sod., 2007; Tenzer in sod., 2008; Dobrovolskaia in sod., 2009; Ruh in sod., 2012; Mu in sod., 2015; Sopotnik in sod., 2015). Kombinacija površinskih lastnosti NM se lahko opiše s t.i. adsorpcijskim potencialom oz. indeksom adsorpcije na biološke površine (ang. *biological surface adsorption index*, BSAI) (Xia in sod., 2011). Ta lastnost NM je odraz tako primarnih lastnosti NM (oblika, velikost ter predvsem površinske lastnosti, kot so prisotnost vodikovih vezi in prostih elektronskih parov ter polarnost materiala/molekule), kot tudi lastnosti suspenzije ali medija, v katerem je material dispergirani (Xia in sod., 2011). Poleg vezave bioloških molekul se visok adsorpcijski potencial NM lahko odrazi tudi v oblikovanju večjih skupkov NM v suspenziji, t.j. tvorbi aglomeratov ali agregatov (Walter, 2013).

2.2.2 Biološka reaktivnost testiranih nanomaterialov s proteini

2.2.2.1 Ogljikovi nanomateriali

Ogljikovi NM imajo najvišji adsorpcijski potencial izmed proizvedenih NM, adsorbirajo tako majhne molekule, kot tudi večje proteine (Valenti in sod., 2007; Ruh in sod., 2012). Številne študije poročajo o visoki stopnji vezave proteinov na CNT, in sicer albuminov, apolipoproteinov, fibrinogena, in drugih plazemskih proteinov (Wang in sod., 2009; Ge in sod., 2011; Holt in sod., 2011; Xia in sod., 2011; Andersen in sod., 2013; Zhang in sod., 2013), pri

čemer lahko nastopi močna deformacija strukture vezanih proteinov (Zhao in sod., 2015). Trenutno aktualne študije *in vitro* poročajo o visoki stopnji interakcije grafena in njegovih derivatov s plazemskimi proteini (Feng in sod., 2015; Sopotnik in sod., 2015). V nedavni študiji so Sopotnik in sodelavci (2015) pokazali, da ima GO izmed testiranih ogljikovih NM najnižji potencial za vezavo plazemskih proteinov, a obenem najvišjo afiniteto vezave za ostale, manj številne serumske proteine, med njimi tudi butirilholinesteraze (BChE). Lastnosti amorfne oblike ogljikovih NM, materiala CB, so dobro raziskane in zato v študijah pogosto uporabljane kot referenčni (primerjalni) material ali kot modelni sistem za izpušne delce dizelskih motorjev (Jackson in sod., 2012). V študiji raziskovalne Skupine za nanobiologijo in nanotoksikologijo, Katedre za zoologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani so pokazali, da imajo CB NM veliko afiniteto vezave na proteine, npr. acetilholinesteraze (AChE) (Mesarič in sod., 2013).

2.2.2.2 Nanodelci TiO₂

Nanodelci kovinskih oksidov, med njimi tudi TiO₂, imajo nižji adsorpcijski potencial in s tem manjšo afiniteto vezave za plazemske proteine v primerjavi z ogljikovimi NM (Xia in sod., 2011); ne glede na to se na njihovo površini vežejo plazemski proteini, kar je v nekaterih primerih predvsem odvisno od primarne oblike TiO₂ (Sousa in sod., 2004; Deng in sod., 2009; Sund in sod., 2011; Saptarshi in sod., 2013).

2.3 METODE ZA PROUČEVANJE INTERAKCIJ MED NANOMATERIALI IN ENCIMI

Encimski testi so pogosto uporabljani pristopi za vrednotenje vpliva različnih substanc, tudi vpliva NM, na biološke sisteme. Različne študije so pokazale, da je vrednotenje adsorpcije NM na holinesteraze (oziroma njihova imobilizacija) ter inhibicija njihove encimske aktivnosti ustrezen sistem za testiranje vpliva NM (Wang in sod., 2009; Mesarič in sod., 2013; Šinko in sod., 2014; Sopotnik in sod., 2015), pogosto pa se uporablja tudi kot biomarker pri vrednotenju vpliva organofosfatnih in drugih onesnaževalcev (Arufe in sod., 2007). Modificirana metoda po Ellmanu (Ellman in sod. 1961) predstavlja ustrezen sistem za spektrofotometrično ugotavljanje inhibicije delovanja encimov in tudi adsorpcije NM na encime (Wang in sod. 2009; Mesarič in sod., 2013; Sopotnik in sod., 2015). Nedavno so Sopotnik in sod. (2015) pokazali, da se NM lahko vežejo na plazemske BChE in povzročijo različne stopnje inhibicije encimskega delovanja, kar je predvsem odvisno od sekundarnih lastnosti NM v suspenziji.

2.4 TESTI VIABILNOSTI *IN VITRO*

Konvencionalni testi viabilnosti celic pogosto temeljijo na merjenju encimske aktivnosti celičnih encimov kot markerju preživetja celic ob izpostavitvi testni substanci celičnim kulturam *in vitro*. Najpogosteje uporabljani testi temeljijo na merjenju nastalih produktov kot posledica aktivnega celičnega metabolizma, na primer test MTT (1-(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid, ki se uporablja za oceno mitohondrijske encimske aktivnosti

(nastanek NADPH⁺) (Mosmann1983). V okviru nanotoksikoloških študij smo prevzeli uporabo standardnih testov viabilnosti, ampak to v primeru NM pogosto ne predstavlja ustreznega pristopa (Clift in sod., 2011).

2.5 STATISTIČNI PREDVIDNI MODELI

Statistični predvidni modeli se uporabljajo za obdelavo obsežnih nizov podatkov in ugotavljanje korelacij med podatki. Tako lahko ugotovimo povezave med lastnostmi in učinkom, ki niso neposredno predvidljive, ki so kombinacija več lastnosti, ali pa ko obseg podatkov to onemogoča. Po izgradnji baze podatkov izberemo modelni sistem (npr. kvantitativna analiza povezave strukture in aktivnosti, ang. *quantitative structure–activity relationship*, QSAR, ali večparameterski linearni regresijski model) glede na tip in obseg podatkov (Sayes in sod., 2010). Trenutno so v izdelavi baze podatkov o lastnostih (fizikalno-kemijske lastnosti, kot so npr.: velikost, površina, površinski naboj) in učinkih NM (strupenost, inhibicija encimov, adsorpcija proteinov na površino NM) kot posledica še nepojasnjene mehanizma delovanja NM, na podlagi katerih se izdelujejo predvidni modeli kot je projekt NSC (ang. *Nano safety cluster*; Evropska iniciativa za povečanje sinergij med projekti FP6 in FP7 eNanoMapper) (Jeliazkova in sod., 2015). Najnovejše metode uporabljajo strojniško učenje (ang. *machine learning*), kjer napredni algoritmi omogočajo prilagajanje modela samodejno, na podlagi predhodnih rezultatov modelov in primerjave med njimi (Zhang in sod., 2006).

2.5.1 Linearni model

Večparameterska linearna regresijska analiza je izjemno prilagodljiv sistem za pregled razmerij med več neodvisnimi spremenljivkami (t.i. deskriptorji, prediktorji) in eno odvisno spremenljivko (lastnost, kriterij) več snovi hkrati. Neodvisne spremenljivke oziroma deskriptorji so lahko konstitutivni (npr. število atomov, število vezi, molekularna teža), topološki (opis atomskih povezav znotraj molekule), geometrični (tridimenzionalne koordinate atomov v molekuli), elektrostatični (opis naboja molekule), kvantno-kemični, termodinamični, idr. (Katritzky in sod., 1994). Model na podlagi deskriptorjev opiše oziroma predvidi vrednost odvisne spremenljivke in jo primerja z dejansko vrednostjo lastnosti. Tako ocenimo povezavo med deskriptorji in lastnostjo, kjer bolj podobni vrednosti predstavljata večjo korelacijo med deskriptorji in dotično lastnostjo (Montgomery in sod., 2012).

Model večparameterske linearne regresijske analize ponuja zelo široko polje uporabe (inženiring, kemija, fizika, statistika, matematika, idr.). Uporaba modela je pogosta tudi v nanotehnologiji, kjer se pojavlja kot orodje za optimizacijo produktov (Ghaedi in sod., 2016), dokazovanje povezave med lastnostmi NM in mehanizmi raztapljanja (Lanzl, 2013), ali za prikaz povezave med strupenostjo NM in njihovimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (Stoeger in sod., 2009).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 ZAJEM PODATKOV

Podatke smo zajemali iz baze rezultatov Skupine za nanobiologijo in nanotoksikologijo, Katedre za zoologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani. Začetna baza podatkov je zajemala rezultate poskusov testiranja vpliva nabora nanomaterialov (NM) na aktivnost modelnih encimov (pregl. 7): rekombinantno žuželčjo AChE iz vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), izolirano ribjo AChE iz električne jegulje (*Electrophorus electricus*), AChE iz človeških eritrocitov (*Homo sapiens*), BChE iz konjskega seruma (*Equus caballus*) in BChE iz humanega seruma (objavljeno v: Mesarič in sod. 2013; Mesarič 2014; Drašler 2014; Sopotnik in sod. 2015, poleg nabora neobjavljenih rezultatov). Vsi podatki predstavljajo rezultate adsorpcije encimov na NM in inhibicijo encimske aktivnosti ob prisotnosti NM, ovrednoteni z modificirano metodo po Ellmanu (Wang in sod. 2009; Mesarič in sod. 2013).

3.1.1 Združevanje podatkov in izračun vrednosti IC/EC

Ker je izvedba poskusov na encimih potekala po SOP, so bili zajeti podatki med seboj primerljivi in enakovredni in zato združljivi, ne glede na datum izvedbe ali izvajalca poskusa. To je omogočilo združevanje različnih serij podatkov, pridobljenih na istem encimu za enake tipe NM. V primeru, da so bile v različnih poskusih uporabljene popolnoma enake testne koncentracije NM na istem encimu, smo za obdelavo podatkov uporabili povprečne vrednosti (adsorpcije encima na NM in inhibicije encima v prisotnosti NM), ter izračunali standardno napako. Tak način obdelave in združevanja podatkov je omogočil velik razpon testiranih koncentracij za posamezni tipi NM na dotičnem encimu in je hkrati povečal stopnjo zanesljivosti rezultatov.

Vrednost EC/IC₅₀ predstavlja koncentracijo snovi, ki povzroči 50% spremembo odziva testne substance, kar v konkretnem primeru pomeni koncentracijo NM, ki povzroči 50% zmanjšano stopnjo aktivnosti encima (inhibicijo) ali adsorpcijo encima na NM (Op.: z namenom večje preglednosti smo inhibitorne koncentracije označevali s simbolom »IC« ter adsorpcijske s simbolom »EC«). Poleg vrednosti EC/IC₅₀ smo v nalogi obravnavali tudi druge odzivne vrednosti, EC/IC₂₀ in EC/IC₈₀.

Za izdelavo sigmoidne aproksimacijske krivulje za izračun vrednosti koncentracij NM (EC/IC_{20/50/80}) smo uporabili programsko opremo OriginPro 2016 b9.3.226. S pretvorbo koncentracije NM v logaritemsko vrednost in izdelavo razpršenega diagrama s pripadajočimi vrednosti adsorpcije oziroma inhibicije smo izračunali iskane odzivne vrednosti preko analize grafa z izrisom sigmoidne krivulje z izbrano funkcijo od doze odvisnega odgovora (ang. *dose response*) na osnovi danih podatkov. Nastavitve za izris krivulje so bile: algoritem iteracije Lavenberg Marquardt, z določeno spodnjo asimptoto pri 0 in zgornjo asimptoto pri 100. Z

uporabo te funkcije lahko pridobimo podatke o koncentraciji NM, ki povzroči 20 ali 50 ali 80% stopnjo odziva, t.j. adsorpcije oziroma zmanjšane aktivnosti encima, t.j. inhibicije.

3.1.2 Pregled (ang. *screening*) podatkov

Izvirne vrednosti, izražene kot inhibicija encimske aktivnosti in adsorpcija encimov na NM, smo v okviru diplomskega dela vnesli v skupno tabelo (Microsoft Office Excel®) in obdelali glede na vrednoteni tip NM in uporabljen testni encim. Zaradi omejitev izbrane statistične metode za obdelavo rezultatov smo glede na razpoložljivost in količino testiranih NM za nadaljnjo, statistično analizo uporabili le rezultate testov na encimu BChE iz konjskega seruma.

3.1.3 Priprava in karakterizacija suspenzij ogljikovih nanomaterialov in nanodelcev TiO₂, uporabljenih v testu viabilnosti

Amorfni ogljik v obliki prahu (CB) s povprečno velikostjo primarnih delcev 13 nm in ocenjeno nominalno čistostjo > 99% smo kupili pri proizvajalcu Plasma Chem GmbH (Berlin, Nemčija). Ploščice grafenovega oksida (GO) smo kupili pri proizvajalcu Graphene Supermarket (Calverton, New York, ZDA), večplastne ogljikove nanocevice (MWCNT) pa smo prejeli v okviru FP7 EU projekta NanoValid. Nanodelce TiO₂ z oznako 1 smo kupili v obliki prahu pri proizvajalcu Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija). Suspenzijo ND TiO₂ z oznakami 70, 89 in 97 smo prejeli od podjetja Cinkarna Celje (Celje, Slovenija) v obliki vodnih suspenzij z izvornimi koncentracijami 200 mg/mL (št. 70 in 89) ali 150 mg/mL (št. 97). Suspenzije ND TiO₂ z oznakami 85, 85, 110 in 111 pa smo prejeli v okviru FP7 EU projekta NanoMILE v obliki vodnih suspenzij z izvornimi koncentracijami 10 mg/mL.

Pred izvedbo testov viabilnosti smo pripravili sveže založne suspenzije ogljikovih NM v vodi z izvornimi koncentracijami 1 mg/mL s palično sonikacijo (Sonics VibraCell, Newtown, ZDA), 1 h pri amplitudi 40%, s ciklom 15 s vklop/15 s izklop, hlajeno na ledu. Založne suspenzije vseh tipov nanodelcev TiO₂ (1 mg/mL) smo pripravili v vodi in jih sonicirali v ultrazvočni vodni kopeli (250 W, 50 Hz; Sonis 2GT, Iskra Pio d.o.o., Slovenija; 10 minut).

Karakterizacijo NM smo izvedli v sodelovanju z Odsekom za sintezo materialov (IJS, prof. dr. Darko Makovec in dr. Slavko Kralj). Meritve ZP NM smo izvedli v vodni suspenziji (MilliQ, deionizirana voda visoke čistosti, prevodnost pri 25°C manj kot 0,1 μS·cm⁻¹) v celotnem razponu pH vrednosti ter v reakcijski zmesi (RM) za encime (0,5 mM Ellmanov reagent v 100mM fosfatnem pufri) pri vrednosti pH 8.0 in koncentracijah, uporabljenih v poskusih, z inštrumentom ZetaPALS, Brookhaven Instruments Corp. (New York, ZDA). Za namen analize smo uporabili podatke o primarnih velikostih delcev, podanih s strani proizvajalcev.

3.1.4 Testiranje viabilnosti *in vitro* s testom MTT

Za testiranje vpliva NM na celične kulture po 24-urni izpostavitvi smo uporabili test viabilnosti MTT *in vitro* (MTT ali (1-(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid)).

Trajne celične linije MG-63 (humani osteosarkom) smo gojili v gojišču za celične kulture (ang. Dulbecco's modified Eagle's medium-glutaMAX, DMEM) z dodanim fetalnim govejim serumom (ang. fetal bovine serum, FBS; 10%, v/v) pod nadzorovanimi pogoji (37 °C, visoka zračna vlažnost, stalni dotok 5% CO₂). Po ustaljenem postopku gojenja celičnih kultur *in vitro* smo v mikrotitrsko ploščo nasadili 5000 celic/jamico (100 µL/jamico). Pred izpostavitvijo NM smo celice inkubirali 24 ur pod nadzorovanimi pogoji (s tem smo omogočili pritrnitev celic na dno jamice in ustrezno razrast).

Založne suspenzije NM v vodi smo razredčili v ustreznem gojišču za celične kulture v koncentracijskem razponu, ki je ustrezal 3-kratnim vrednostim končnim izpostavitvenim koncentracijam NM (t.j. 10, 25, 50, 100 in 250 µg/mL) in dodali 50 µL suspenzije z ustrežno koncentracijo NM (k že obstoječim 100 µL gojišča s celicami na posamezno jamico). Poleg izpostavitve NM smo negativno kontrolno skupino celic izpostavili enaki količini vode, ali 0,5 mM vodikovem peroksidu (H₂O₂) za pozitivno kontrolo. Eno paralelko za vsak testirani NM smo namenili merjenju ozadja, t.j. ustrezajoča koncentracijska vrsta NM v gojišču brez celic. Po 24-urni izpostavitvi pri nadzorovanih pogojih smo v vsako jamico dodali 15 µL predhodno pripravljenega reagenta MTT (5 mg/mL v PBS). Celice smo ob prisotnosti MTT inkubirali 3 ure (37°C, 5% CO₂, visoka zračna vlažnost). Nato smo previdno odstranili supernatant, ne da bi premaknili nastale ne-vodotopne kristale formazana. Te smo raztopili v 100 µl organskega topila dimetil sulfoksida (DMSO). Po 10 minutah inkubacije na sobni temperaturi smo spektrofotometrično izmerili absorbanco nastalega produkta pri valovni dolžini 570 nm, ter absorbanco ozadja pri 630 nm.

Izmerjena količina nastalih kristalov formazana je pokazatelj števila metabolno aktivnih celic, iz česar sklepamo na njihovo viabilnost. Najprej smo od vseh vrednosti, izmerjenih pri valovni dolžini 570 nm, odšteli vrednosti, izmerjene pri 630 nm. Izračunali smo povprečno vrednost izmerjene absorbance brez celic in to povprečno vrednost odšteli od izmerjenih vrednosti absorbanc celic. Vrednosti absorbanc celic smo delili s povprečjem negativne kontrole absorbance celic z odštetim povprečjem absorbance brez celic. Rezultati so predstavljeni z grafom, s statističnim t-testom (vrednosti pridobljene v programski opremi Microsoft Excel 2013) in vrednostjo LOAEL, ki poda najmanjšo koncentracijo, kjer je opažena statistično značilna sprememba števila živih celic.

3.1.5 Statistična obdelava podatkov

3.1.5.1 Priprava podatkov za statistično obdelavo

Uporabljena metoda statistične obdelave podatkov na osnovi kvantitativnega odnosa med strukturo-aktivnostjo (ang. *Quantitative structure–activity relationship*, QSAR) za pridobitev zanesljivih rezultatov narekuje uporabo čim več različnih spremenljivk oziroma deskriptorjev za posamezni element. V analizo smo tako vključili podatke o primarni velikosti in strukturi NM, izmerjene vrednosti ZP v vodi in reakcijski zmesi za encime, ter rezultate testa viabilnosti, izražene kot najmanjša koncentracija, pri kateri smo opazili spremembo preživetja celic (ang. *lowest-observed-adverse-effect level*, LOAEL) na osnovi izbranega testa za vrednotenje viabilnosti.

3.1.6 Analiza podatkov z linearnim modelom

3.1.6.1 Linearni model

Primerjavo izmerjenih vrednosti z uporabo linearnega modela smo izvedli v programski opremi CODESSA (Comprehensive Descriptors for Structural and Statistical Analysis), ki je večnamensko orodje za QSAR/QSPR (ang. *Quantitative Structure-Activity Relationship and Structure-Property Relationship*) za programsko okolje Microsoft Windows.

Z uporabo deskriptorjev (t.j. lastnosti NM ter vpliv NM na encim in vrednost LOAEL *in vitro*) ta program omogoča prikaz razmerja med eksperimentalno pridobljenimi podatki (t.i. eksperimentalni tok; vrednosti LOAEL) in njihovimi predvidevanimi vrednostmi (t.i. izračunani tok; izbrani deskriptorji). Kot fizikalno-kemične deskriptorje NM smo uporabili primarno velikost, strukturo, zeta potencial NM; ovrednotene v vodi in reakcijski zmesi, kot eksperimentalni tok pa vrednosti LOAEL, ovrednotene na celičnih kulturah *in vitro* s testom viabilnosti MTT. Poleg fizikalno-kemijskih lastnosti NM smo vrsti deskriptorjev pridružili t.i. biološki deskriptor NM, to je inhibicija encimske aktivnosti in adsorpcija encima na NM.

Pri modeliranju smo uporabili t.i. večparametrsko linearno regresijsko metodo (ang. *multilinear regression*), ki poda razmerje med uporabniško definiranimi lastnostmi (t.j. odvisne spremenljivke; LOAEL) in setom uporabniško izbranih deskriptorjev (neodvisne spremenljivke; fizikalno-kemijski in biološki deskriptorji NM). Rezultat metodološkega pristopa je prikaz lastnosti [P] serije snovi (izbrani NM) z večparametrsko linearno ekspanzijo preko deskriptorjev snovi [x_{ij}], dotičnih snovi [j] (izbrani NM), in dotičnih molekularnih deskriptorskih konstant [i]:

$$P = a_0 + \sum_i a_i x_{ij} \quad \dots(1),$$

kjer koeficienti a_i opisujejo občutljivost lastnosti na podan i -ti parameter.

Izhodni podatki (ang. *output*) vključujejo kvadrat korelacijskega koeficienta R^2 , vrednost F za regresijo in standardno deviacijo regresije s^2 , kjer vrednost R^2 bližje 1 pomenijo večjo korelacijo med modelom in opisno lastnostjo (LOAEL).

Program poda graf, na katerem značilnosti NM padejo med pozitivnimi vrednostmi osi x (eksperimentalni tok) in osi y (izračunani tok). Prikazana premica je idealna pozicija, ko deskriptorji popolnoma opišejo odvisno spremenljivko. NM, ki ležijo na premici oziroma blizu nje, so dobro opisani z računalniškim modelom oziroma imajo R^2 blizu 1, kar predstavlja, da je njihova izračunana vrednost LOAEL blizu dejanski eksperimentalni vrednosti LOAEL.

4 REZULTATI

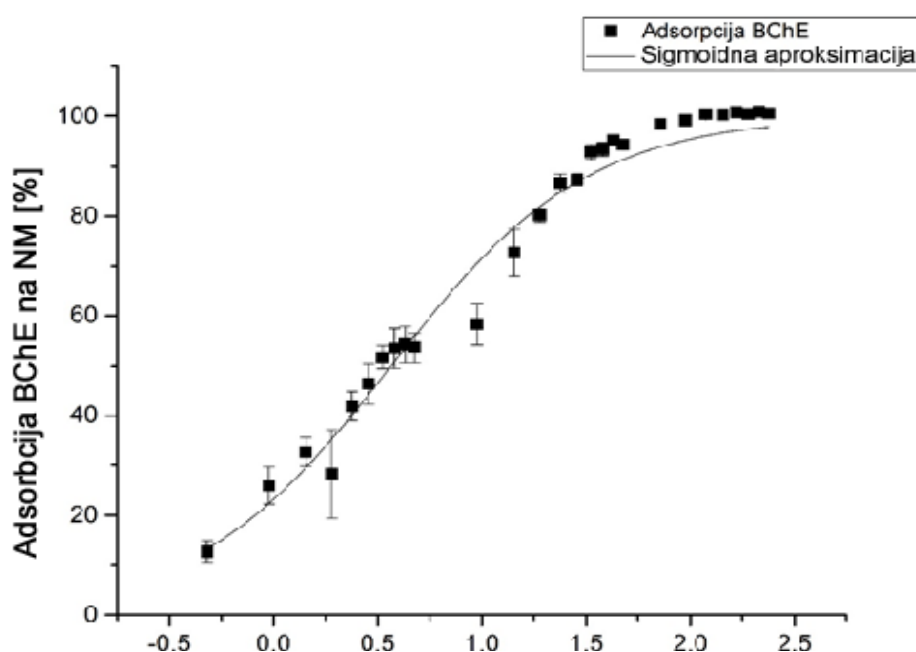
4.1 Obdelani podatki encimskih testov vpliva NM na aktivnost BChE

Izdelana podatkovna baza vpliva NM na encim BChE iz organizma *E. caballus* iz serije poskusov Skupine za nanobiologijo in nanotoksikologijo, Katedre za zoologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani.

4.2 Vrednosti adsorpcijskih koncentracij nanomaterialov in inhibitornih koncentracij nanomaterialov encima butirilholinesteraze

Koncentracija BChE v različnih paralelkah poskusov ni bila enaka, saj SOP narekuje merjenje začetne encimske aktivnosti pred izvedbo vsakega posameznega poskusa (z metodo po Ellmanu, 20-minutna kinetična aktivnost). Končno testno koncentracijo BChE v reakcijski mešanici (RM) smo uravnavežili glede na rezultat izvorne aktivnosti BChE, kar pomeni, da je bila stopnja aktivnosti BChE enaka, primerljiva med paralelkami poskusov vpliva NM na encim. V primeru TiO₂ 96 so izvorne količine encima ustrezale naslednjim volumnom encimske mešanice (5 EE/mL BChE v 1 mL K-P pufra) in sicer: (i) 1,95 µL, (ii) 2 µL, (iii) 2,15 µL. (Opomba avtorja: razlog, da koncentracija encima ni navedena v µg/mL je, da proizvajalec ne navaja mase BChE v liofiliziranem prahu z večjo natančnostjo, kot vsebnost BChE ≥10%.)

Slika 1 prikazuje stopnjo adsorpcije BChE na NM TiO₂ 96, odvisne od koncentracije TiO₂ v µg/mL, ter aproksimacijsko krivuljo za ustrežajoče podatke, izraženo v programski opremi



Slika 1: Primer razpršenega grafa adsorpcije butirilholinesteraze (*E. caballus*) na TiO₂ 96 z aproksimacijsko sigmoidno krivuljo narejeno z uporabo funkcije od doze odvisnega odgovora (ang. *dose response*). Koncentracija TiO₂ 96 je izražena kot logaritem [$\log(\mu\text{g/mL})$]. N=3, prikazan interval napake predstavlja standardno napako

OriginPro 2016 b9.3.226 z uporabo funkcije od doze odvisnega odgovora. Rezultat je podan kot koncentracija NM, pri katerem NM adsorbira 20% ali 50% ali 80% BChE ($EC_{20/50/80}$). Na horizontalni osi so podane logaritmirane vrednosti koncentracije TiO_2 96 v $\mu g/mL$. Vertikalna os pa predstavlja adsorpcijo encima na NM, izraženo v %. Enak postopek je bil izveden za izračun inhibitornih vrednosti $IC_{20/50/80}$. Pri vseh testih koncentracije NM niso dosegle iskanega, od doze odvisnega odgovora. Vendar sigmoidna aproksimacija omogoča predvidevanje vrednosti EC, ki so izven območja testiranih koncentracij NM, pri čemer je stopnja zaupanja tovrstnih podatkov manjša. Ocena kakovosti predvidevanih vrednosti EC je podana kot primerjava vrednosti EC za polni razpon podatkov vrednosti EC s slike 1 z vrednostmi za delni razpon podatkov (od 72% do 100% adsorpcije BChE), na primeru za TiO_2 96. Razlika med koncentracijama je predstavljena tudi kot delež od koncentracije TiO_2 96 pri 100% adsorpciji (pregl. 1).

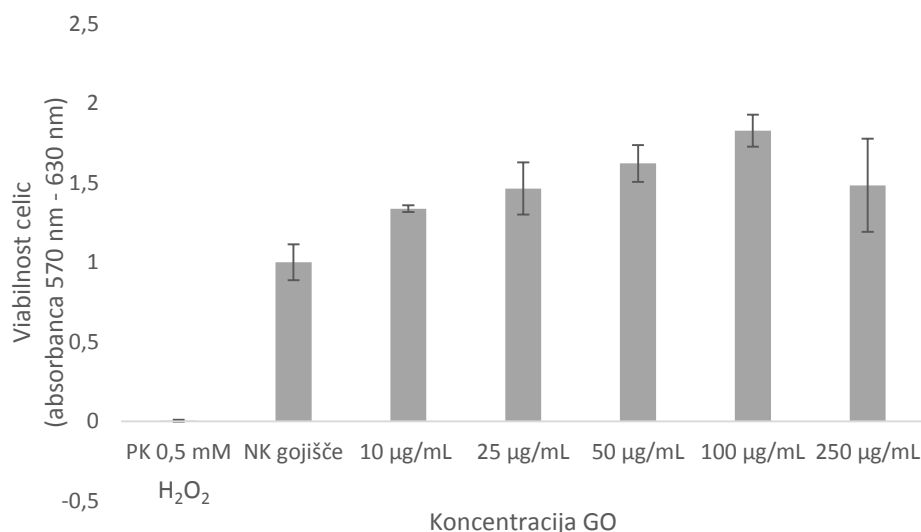
Preglednica 1: Razlika med dejanskimi in predvidevanimi vrednosti EC, absolutna razlika in razlika v %, izražena na delež celote

	EC ₂₀	EC ₅₀	EC ₈₀
Polni razpon podatkov [$\mu g/mL$]	0,8166	3,6794	16,5789
Delni razpon podatkov (72-100%) [$\mu g/mL$]	3,7656	8,3320	17,4362
Razlika [$\mu g/mL$]	2,9490	4,6526	0,8573
Razlika v % celote	4,05	6,40	1,18

Legenda: $EC_{20/50/80}$: adsorpcijska koncentracija NM pri 20% / 50% / 80% adsorpciji BChE na NM

4.3 Viabilnost celične linije MG-63 po izpostavitvi NM, ovrednoteno s testom viabilnosti MTT

Slika 2 prikazuje viabilnost celic trajne celične linije MG-63 po 24-urni izpostavitvi NM, na primeru GO, ovrednotene s testom viabilnosti MTT. Na podlagi rezultatov smo izvedli statistični t-test (dvo-vzorčno, z upoštevanjem enakih varianc), s katerim smo vrednotili statistično značilne razlike v primerjavi z negativno kontrolo (stopnja zaupanja 0,05).



Slika 2: Viabilnost (predstavljena kot delež negativne kontrole) celic trajne linije MG-63 po 24-urni izpostavitvi GO pri različnih koncentracijah, ovrednoteno s testom viabilnosti MTT. Število ponovitev: n=3, interval napake predstavlja standardni odklon.

Preglednica 2 prikazuje primer analize podatkov vpliva NM na celice MG-63, pridobljenih s testom MTT. Z uporabo t-testa smo določili najnižjo koncentracijo NM (poudarjena vrednost na pregl. 2), pri kateri je viabilnost celic statistično značilno različna od negativne kontrole (pri stopnji zaupanja 0,05), t.i. LOAEL.

Preglednica 2: Obdelani podatki za viabilnost celic testa MTT

Koncentracija GO	Viabilnost MG-63	SD	t-test
PK 0,5mM H ₂ O ₂	0,00348508	0,006578	5,34E-10
NK	1	0,112439395	1
10 µg/mL	1,336964	0,021514	0,001002
25 µg/mL	1,464169	0,164558	7,97E-05
50 µg/mL	1,621433	0,115099	1,34E-06
100 µg/mL	1,827053	0,100987	1,71E-08
250 µg/mL	1,484208	0,292392	0,000189

Legenda: PK – pozitivna kontrola (dodatek H₂O₂); NK – negativna kontrola (dodatek gojišča); MG-63 – trajna celična linija (človeški osteosarkom); SD – standardni odklon. Odebeljena vrednost 10 µg/mL predstavlja LOAEL.

4.4 Rezultati testa viabilnosti celic in lastnosti NM, pripravljene za statistično obdelavo

V preglednici 3 so zbrani podatki karakterizacije NM, rezultati encimskih testov in testa MTT (LOAEL), ter so urejeni skladno s sledečo analizo korelacije.

Preglednica 3: Zbrani in preračunani podatki za večparametersko linearno regresijsko metodo

NM	OZNAKA	LOAEL ($\mu\text{g/ml}$)	Struktura	Primarna velikost (nm)	ZP MilliQ	ZP RM
CB	NM01	10	1	20	-32	-33
GO	NM02	10	2	1	-35	-33
CNT	NM03	250	2	40	-21	-50
TiO ₂ 1	NM04	N/A	3	10	4,5	23,7
TiO ₂ 70	NM05	N/A	3	6	-27,7	-29,4
TiO ₂ 84	NM06	100	4	20	17,90	-21,8
TiO ₂ 85	NM07	25	4	20	15,6	-31,6
TiO ₂ 89	NM08	100	3	35	-25,4	-34,9
TiO ₂ 96	NM09	50	3,5	70	-14,3	-35,1
TiO ₂ 97	NM10	50	4	10	-33,3	-26,1
TiO ₂ 110	NM11	50	4	10	-12,9	-40,1
TiO ₂ 111	NM12	100	4	10	-8,8	-36,8

NM	EC20 ($\mu\text{g/ml}$)	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)	EC80 ($\mu\text{g/ml}$)	IC20 ($\mu\text{g/ml}$)	IC50 ($\mu\text{g/ml}$)	IC80 ($\mu\text{g/ml}$)
CB	0,12894	0,67034	3,48484	0,12369	0,44782	1,62138
GO	0,00042	0,02912	2,00761	0,26159	4,76957	86,9629
CNT	2,41672	35,1872	512,3217	3,79567	26,73097	188,2526
TiO ₂ 1	82,42592	200,2982	486,7325	13,39392	43,41397	140,7185
TiO ₂ 70	0,58002	82,41589	11710,53	2,39748	244,1995	24873,35
TiO ₂ 84	314,3016	688,6017	1508,654	277,5117	768,6595	2129,054
TiO ₂ 85	481,4617	763,9184	1212,082	736,25	1950,174	5165,6
TiO ₂ 89	45,3251	196,2118	586,5848	83,10995	240,2292	694,3821
TiO ₂ 96	0,8166	3,67944	16,57891	0,81382	4,86042	29,02818
TiO ₂ 97	30,9176	151,108	738,5319	8,15925	135,9356	2264,727
TiO ₂ 110	16,39162	82,56148	415,8466	16,77642	75,06328	335,858
TiO ₂ 111	25,61752	138,4899	748,6846	13,67052	85,46618	534,3225

Legenda: NM – nanomaterial; LOAEL – ang. *lowest-observed-adverse-effect level*, statistično značilno različna viabilnost od negativne kontrole pri najmanjši koncentraciji NM; Struktura: 1 – amorfna, 2 – kristalična, 3 – anataz, 3,5 – rutil in anataz, 4 – rutil; ZP MilliQ – zeta potencial v vodi čistosti tipa I; ZP RM – zeta potencial v reakcijski zmesi; EC – koncentracija NM pri določenem % adsorpcije BChE (20%/50%/80%); IC – koncentracija NM pri določenem % inhibicije BChE (20%/50%/80%)

4.5 Analiza korelacije med fizikalnimi in biološkimi deskriptorji ter biološko lastnostjo nanomaterialov

Nanomateriali so opisani s štirimi fizikalnimi deskriptorji – DF (primarna velikost, ZP v MILLIQ, ZP v RM ter kristalna struktura NM) in šestimi biološkimi deskriptorji – DB (EC₂₀, EC₅₀, EC₈₀, IC₂₀, IC₅₀, IC₈₀). Biološka lastnost je predstavljena kot LOAEL, ovrednotena s testom MTT.

Prvo stopnjo pri izdelavi modela predstavlja izračun kvadratov korelacijskih koeficientov (R^2) med posameznimi deskriptorji in lastnostjo (pregl. 4). Pri postavitvi modela se je izkazalo, da NM 12 (TiO₂ 111) pokvari opisno zmožnost statističnega modela, zato smo ga ovrednotili kot t.i. ubežnika (ang. *outlier*) in ga posledično izključili iz nadaljnje obdelave (sl. 3). Slika 3 prikazuje oceno kakovosti predvidnega linearnega regresijskega modela za posamezne NM. Bolj kot je model natančen, bližje točka leži točka posameznega NM diagonali kvadranta, ki predstavlja R^2 v vrednosti 1.

Pet označenih deskriptorjev (pregl. 4; odebeljena pisava) predstavlja osnovo za postavitev linearne regresijske funkcije, ki omogoča izračun koncentracije NM pri LOAEL.

Preglednica 4: Kvadrati korelacijskih koeficientov (R^2) med posameznimi deskriptorji in lastnostjo LOAEL

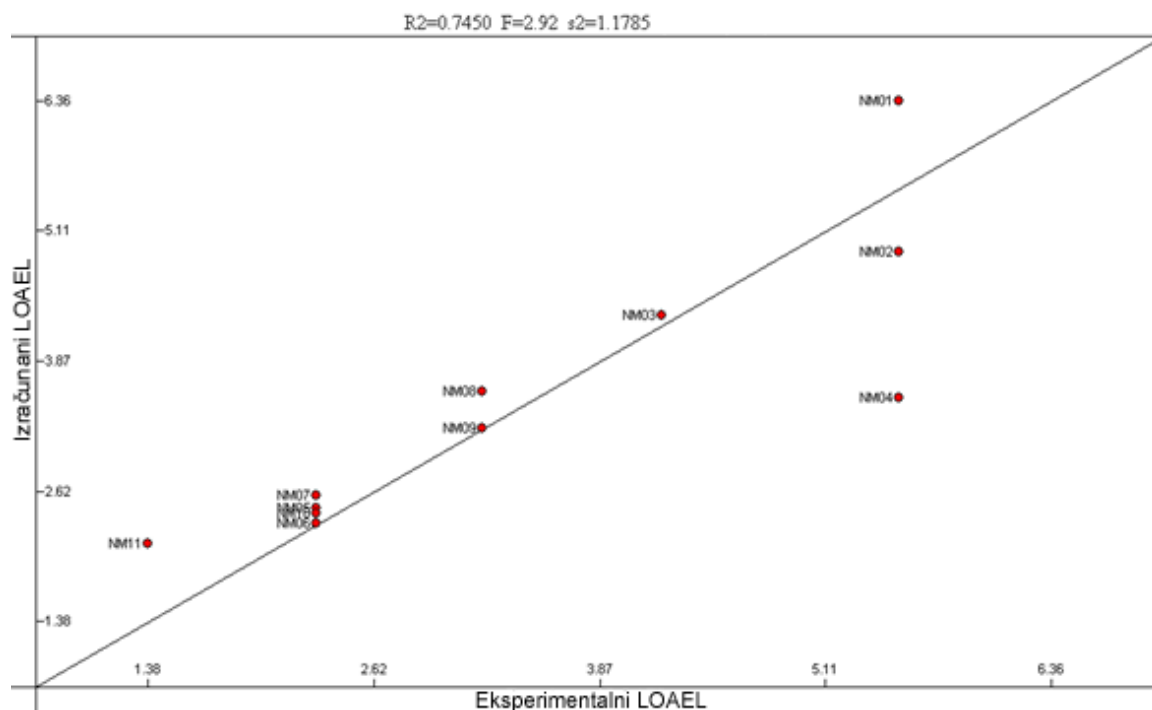
Oznaka	Deskriptor	R^2
DF01	primarna velikost	0,0014
DF02	ZP v MilliQ	0,0745
DF03	ZP v RM	0,1114
DF04	struktura	0,6712
DB05	EC20	0,3016
DB06	EC50	0,4079
DB07	EC80	0,4380
DB08	IC20	0,3481
DB09	IC50	0,4965
DB10	IC80	0,4809

Legenda: DF – fizikalni deskriptor; DB – biološki deskriptor

Postavljena linearna funkcija:

$$LOAEL = 8,2911 - 1,3090 \times DF04 + 0,3628 \times DB06 - 0,5671 \times DB07 - 0,1327 \times DB09 - 0,2511 \times DB10 \quad \dots(2),$$

Korelacijski koeficient med tako izračunano lastnostjo in eksperimentalno vrednostjo je $R^2 = 0.7450$ (sl. 3).



Slika 3: Prikaz primernosti opisnega modela LOAEL (ang. *calculated LOAEL* – izračunane vrednosti) za posamezne nanomateriale (NM), primerjano z dejanskimi vrednostmi LOAEL (ang. *experimental LOAEL* – izmerjene vrednosti)

Odraž odstranitve ubežnika NM04 so nove vrednosti deskriptorjev in ustrežajočih korelacijskih koeficientov (pregl. 5).

Preglednica 5: Odstranjen ubežnik NM04 in ponovno izračunani faktorji korelacije za posamezne deskriptorje

Oznaka	Deskriptor	R ²
DF01	primarna velikost	0,0302
DF02	ZP v MilliQ	0,2552
DF03	ZP v RM	0,0634
DF04	struktura	0,8326
DB05	EC20	0,5757
DB06	EC50	0,6873
DB07	EC80	0,6283
DB08	IC20	0,4851
DB09	IC50	0,6035
DB10	IC80	0,5228

Legenda: DF – fizikalni deskriptor; DB – biološki deskriptor

Izkazalo se je, da je DF04 (struktura NM) edini smiselni izmed fizikalnih deskriptorjev. Preostali trije (primarna velikost, ZP v MILLIQ, ZP v RM) niso pokazali korelacije med njimi

in LOAEL, zato smo jih izključili iz nadaljnje obdelave. Za nadaljnjo izdelavo modela smo primerjali različne kombinacije fizikalnega deskriptorja DF04 in bioloških deskriptorjev. Vrednost R^2 bližje 1 predstavlja najprimernejšo kombinacijo za izračun modela (pregl. 5; DF04).

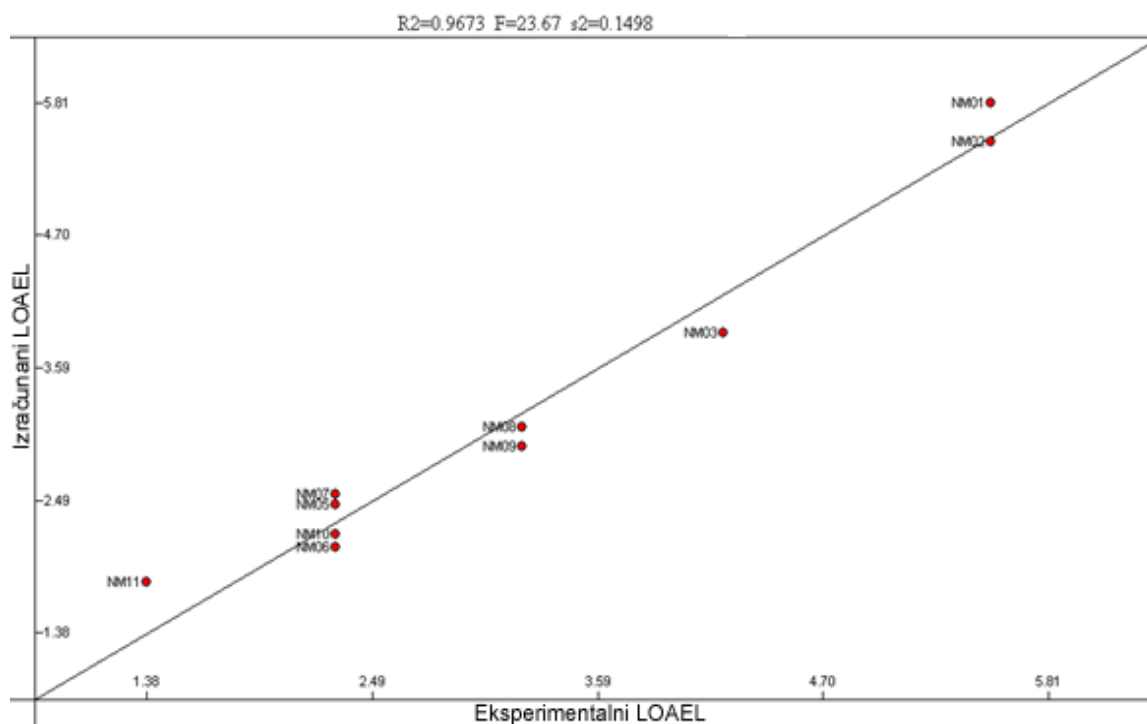
Preglednica 6: Kombinacije bioloških deskriptorjev s fizikalnim deskriptorjem.

Fizikalni	Biološki	R2
DF04	DB05	0,8568
DF04	DB08	0,8347
DF04	DB05, DB06	0,9239
DF04	DB08, DB09	0,8570
DF04	DB05, DB08	0,8690
DF04	DB05, DB06, DB08, DB09	0,9673

Legenda: DF04 – fizikalni deskriptor struktura NM; DB – biološki deskriptor

Končni model računalniško izračunane biološke lastnosti (LOAEL) ima obliko:

$$LOAEL = 7.8016 - 1.2922 \times DF04 + 0.6086 \times DB05 - 1.0062 \times DB06 - 0.3166 \times DB08 + 0.6492 \times DB09 \quad \dots(3),$$



Slika 4: Prikaz primernosti opisnega modela LOAEL (ang. *calculated LOAEL* – izračunane vrednosti) za posamezne nanomateriale (NM), primerjane z dejanskimi vrednostmi LOAEL (ang. *experimental LOAEL* – izmerjene vrednosti) z odstranjenima ubežnikoma, ter upoštevanje najbolj primerne kombinacije bioloških deskriptorjev in fizikalnega deskriptorja strukture NM s korelacijsko vrednostjo $R^2=0,9673$

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 Razprava

V nalogi smo proučevali povezavo med fizikalno-kemijskimi lastnostmi NM, vplivom na encim BChE iz organizma *E. caballus* ter vplivom NM na viabilnost celične linije MG-63 *in vitro*. Ugotovili smo, da posamezne lastnosti NM nimajo enakega doprinosa k vplivu NM na celično linijo, prav tako dobljenega računalniškega modela ni mogoče posplošiti na vse testirane NM. Na podlagi celokupnih rezultatov naloge zaključujemo, da je večparameterski linearni regresijski model z uporabo bioloških deskriptorjev adsorpcije in inhibicije BChE v prisotnosti NM primerno orodje za hitro in ugodno analizo in oceno strupenosti NM (sl. 4).

5.1.1 Priprava in obdelava podatkov

Postavitev računskega modela za izračun potencialne strupenosti NM zahteva čim obsežnejšo bazo eksperimentalnih podatkov. Zajem le-teh je bil opravljen na osnovi baze eksperimentalnih rezultatov vpliva NM na AChE in BChE različnega izvora (adsorpcija encimov na NM in inhibicija delovanja encimov). Vsi poskusi so bili opravljeni v Skupini za nanobiologijo in nanotoksikologijo, Katedre za zoologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani, pod enakimi eksperimentalnimi pogoji SOP, torej so bili rezultati medsebojno enakovredni, primerljivi in združljivi. Baza podatkov, zajetih v analizo diplomskega dela, je tako obsegala rezultate poskusov, opravljenih na dvaindvajsetih različnih NM ter šestih encimih.

5.1.1.1 Ustvarjanje baze podatkov iz ločenih baz poskusov in pregled podatkov

Vsak par NM – encim je bil eksperimentalno ovrednoten v okviru več izvedenih poskusov (različni izvajalci ter čas izvedbe). Pri nekaterih poskusih so se testirane koncentracije NM prekrivale, pri drugih pa dopolnjevale. Oba primera lahko interpretiramo kot ugodna za namen diplomskega dela, saj to pomeni bodisi višjo stopnjo zaupanja podatkov (povprečenje vrednosti več poskusov in ponovni izračun standardne napake), bodisi večji razpon testiranih koncentracij NM, kar omogoča bolj natančno sliko vpliva NM na encim.

Prvi korak obdelave rezultatov je predstavljal natančen pregled vseh opravljenih testov vpliva NM na encima AChE in BChE različnih izvorov (preg. 7). Na osnovi tega smo se za nadaljnjo analizo omejili zgolj na encim BChE, izoliran iz konjskega seruma (*E. caballus*), saj je bilo na tem encimu izpeljanih največ poskusov vpliva NM na inhibicijo encima in adsorpcijo encima na NM, t.j. najširši razponi koncentracij NM ter največje število različnih testiranih NM. Primernost uporabe tega nabora podatkov je v skladu tudi z več parametrskim linearno regresijskim računalniškim modelom, ki zahteva vnos popolnih nizov podatkov (brez manjkajočih podatkov na kateremkoli nivoju). To je bil nadaljnji razlog za dodatno omejitev količine podatkov, število testiranih (analiziranih) NM na končnih 12, saj nekateri NM niso bili

Preglednica 7: Nabor delcev in testiranih encimov začetne podatkovne baze

NM	NM s testiranim encimom
CB	CB <i>E. electricus</i> AChE
	CB Eritrocitna AChE
	CB <i>E. caballus</i> BChE
	CB <i>D. melanogaster</i> AChE
GO	GO <i>E. electricus</i> AChE
	GO Eritrocitna AChE
	GO z BSA <i>E. electricus</i> AChE
	GO <i>E. caballus</i> BChE
	GO <i>D. melanogaster</i> AChE
CNT	CNT <i>E. electricus</i> AChE
	CNT Eritrocitna AChE
	CNT z BSA <i>E. electricus</i> AChE
	CNT <i>E. caballus</i> BChE
C60	C ₆₀ <i>E. electricus</i> AChE
	C ₆₀ Eritrocitna AChE
	C ₆₀ <i>D. melanogaster</i> AChE
SiO ₂	SiO ₂ -NH ₂ <i>E. electricus</i> AChE
	SiO ₂ -COOH <i>E. electricus</i> AChE
	SiO ₂ <i>E. electricus</i> AChE
	SiO ₂ <i>E. caballus</i> BChE
Au	AuC ₁₃ <i>E. electricus</i> AChE
	AuC ₁₄ <i>E. electricus</i> AChE
	AuC ₁₅ <i>E. electricus</i> AChE
TiO ₂	TiO ₂ 1 <i>E. caballus</i> BChE
	TiO ₂ 70 CCA 100 <i>E. caballus</i> BChE
	TiO ₂ 84 <i>E. caballus</i> BChE
	TiO ₂ 85 <i>E. caballus</i> BChE
	TiO ₂ 89 CCA 200 <i>E. caballus</i> BChE
	TiO ₂ 96 <i>E. caballus</i> BChE
	TiO ₂ 97 <i>E. caballus</i> BChE
	TiO ₂ 110 <i>E. electricus</i> AChE
	TiO ₂ 110 <i>E. caballus</i> BChE
	TiO ₂ -PVP 111 <i>E. electricus</i> AChE
TiO ₂ 111 <i>E. caballus</i> BChE	
Ag	Ag 29 <i>E. electricus</i> AChE
BSA	BSA <i>E. electricus</i> AChE

Legenda: C₆₀ – fuleren, SiO₂ – ND silicijevega dioksida, AuC – zlati ND s plaščem citronske kisline, Ag – srebrovi ND, BSA – goveji serumski albumin,

testirani na BChE, medtem ko je bil razpon testiranih koncentracij nekaterih drugih NM premajhen za potrebe uporabljenega modela oziroma željenih izsledkov (izračun $EC/IC_{20/50/80}$). Izbira enega samega encima je bila ključna tudi v okviru predpostavljenih ciljev diplomske naloge; pri izbiri dveh encimov bi obravnavali manjše število testiranih NM. Slednje bi se najverjetneje odrazilo v računalniškem modelu z bolj natančno analizo (kot posledica večjega, števila vključenih deskriptorjev (Cherkasov in sod., 2014), vendar tega ne moremo z gotovostjo predvideti. Potrebno je poudariti, da zaradi omejitve s količino podatkov visoka natančnost modela ne predstavlja prednosti za namen dosega željenega cilja diplomskega dela, t.j. za prikaz povezav med fizikalno-kemijskimi lastnostmi NM in vplivom NM na aktivnost izoliranih encimov holinesteraz v primerjavi s prikazom teh povezav z manj natančnim modelom, ki zajema več različnih testiranih NM.

5.1.1.2 Vrednosti $EC/IC_{20/50/80}$

Iz podatkov o stopnji inhibicije aktivnosti encima in adsorpcije BChE na različne NM smo izračunali vrednosti $IC_{20/50/80}$ (inhibicija) in $EC_{20/50/80}$ (adsorpcija) za vsak testirani par NM-encim (sl. 1). Te vrednosti predstavljajo biološki deskriptor NM. Kljub podatkom, združenih iz več različnih poskusov, pri določenih NM testirane koncentracije niso dosegle zadostnih vrednosti, t.j. razpona koncentracij, ki bi zajemale celotno območje inhibicije ali adsorpcije od 0% do 100%, oziroma za namen izbranega obsega od 20% do 80%. Program OriginPro 2016 omogoča predvidevanje vrednosti $EC/IC_{20/50/80}$ manjkajočim podatkom navkljub, torej smo lahko pridobili manjkajoče vrednosti z ustrezno ekstrapolacijo podatkov. Posledično je potrebno ločiti dva tipa predvidevanih vrednosti. V prvem primeru eksperimentalni podatki vpliva NM na encim obsegajo razpon koncentraciji NM na adsorpcijo ali inhibicijo od katerekoli stopnje do 100% adsorpcije oziroma inhibicije (primer v: pregl. 1; popolni razpon podatkov, uporabljen za namen ocenitve kakovosti predvidnega sistema in iz njega ustvarjen delni razpon podatkov adsorpcija od 72% do 100%). Razvidno je, da program ustrezno predvidi vrednosti pri manjkajočih podatkih (npr. pri nizu podatkov za zadnjih 28%, t.j. od 72 do 100% adsorpcije za TiO_2 96). Predvidena vrednost EC_{20} , kljub veliki oddaljenosti od dejanskih podatkov, ostaja v istem velikostnem razredu kot EC_{20} vrednost pri polnem razponu podatkov, dejanska predvidena koncentracija EC_{20} (3,7656 $\mu\text{g/mL}$) pa bi na sigmoidni aproksimaciji s polnim razponom koncentracij NM ustrezala vrednosti EC_{24} . Izkazalo se je torej, da so predvidene vrednosti EC/IC v takem primeru manjkajočih podatkov ustrezne.

Drugi primer manjkajočih podatkov je, ko vrednosti vpliva NM na inhibicijo encima ali adsorpcijo encima na NM ne dosežejo 100% oziroma 80%. To predstavlja problem za namen predvidevanja vrednosti na osnovi ekstrapolacije eksperimentalno pridobljenih podatkov, saj je izračun predvidenih vrednosti EC/IC v veliki meri odvisen od vodoravnih asimptot sigmoidne krivulje (nastavitve programa OriginPro 2016). Slednji skupaj s podatki oblikujeta sigmoido, ki napove vrednosti EC/IC . Mesto spodnje asimptote določimo za 0%, saj vedno obstaja tako nizka koncentracija NM, da je vpliv na encim neobstoječ. Idealna pozicija zgornje asimptote bi

bila pri 100% inhibiciji encima ali adsorpciji NM na encim, vendar je potrebno poudariti, da brez eksperimentalnih dokazov ni mogoče preprosto ekstrapolirati te stopnje in trditi, da dotični NM dejansko lahko inhibira ali adsorbira BChE do te stopnje. Postavitev zgornje asimptote na zadnjo eksperimentalno določeno vrednost (t.j. koncentracijo NM) se lahko odrazi v popačeni obliki sigmoidne krivulje (pozicija izmerjenih podatkov je precej oddaljena od krivulje). Podatke za vrednosti EC/IC v takih primerih smo dobili s prilagajanjem vrednosti zgornje asimptote med zadnjo izmerjeno vrednostjo in 100%, tako da je čim več izmerjenih adsorpcij pri določenih koncentracijah ustrezalo krivulji. Predvidenim vrednostim, ki ležijo dlje kot za vrednost 10% od zadnje izmerjene vrednosti, pripišemo že močno zmanjšano stopnjo zaupanja (upoštevamo pri analizi, sl. 6 – upoštevane zgolj EC/IC_{20/50}). Kot posledica tega predpostavljamo, da vrednosti EC/IC₈₀ obravnavanih združenih podatkov za izbrane pare testiranih NM in BChE večinoma niso neposredno dovolj kakovostne za uporabo kot biološki deskriptor pri izgradnji računskega modela. Kakovostne in primerne postanejo, ko z dodatnimi poskusi (eksperimentalno testiranje vpliva na encim) to potrdimo.

5.1.1.3 Testiranje viabilnosti *in vitro* s testom MTT in vrednost LOAEL

Za vzpostavitev encimskih testov kot bioloških deskriptorjev NM je potrebno vključiti dodatni pokazatelj vpliva NM, kot biološko lastnost – lastnost, ki jo računski model predvideva (Montgomery in sod., 2012). Za ta namen smo izbrali vpliv NM na celični kulturi MG-63 (humani osteosarkom). Izbrani test viabilnosti MTT po 24-urni izpostavitvi celic NM *in vitro* poda rezultat preživetje celic, primerjano glede na negativno kontrolo (dodatek celičnega gojišča namesto suspenzije NM, sl. 2). Za opis biološke lastnosti NM smo izbrali koncentracijo, pri kateri se viabilnost izpostavljene skupine statistično značilno razlikuje od te pri negativni kontroli (Lewandowski in sod., 2003). Za namen statistične analize smo uporabili t-test (dvo-vzorčno, z upoštevanjem enakih varianc, s stopnjo zaupanja 0,05, pregl. 2) in označili statistično značilno različen rezultat viabilnosti pri najmanjši koncentraciji NM kot LOAEL (pregl. 2).

Viabilnost celične linije MG-63 pri nekaterih NM se je po izpostavitvi povečala v primerjavi z negativno kontrolo (sl. 2, pregl. 2). Interpretacija nepričakovanega vpliva NM (CB, GO, TiO₂ 84) na povišano viabilnost celic v primerjavi s kontrolno skupina presega okvir obsega diplomskega dela in hkrati ni potrebna za razumevanje rezultatov uporabljene računalniške analize. Predpostavljamo, da pride do pojava t.i. hormetskega učinka, kjer nizka koncentracija, pri višjih dozah strupenih snovi, povzroči stimulativen učinek (Mytych in sod. 2016). Pri vseh zgoraj naštetih NM smo zabeležili zmanjšan učinek pri višjih koncentracijah (pregl. 2), izgine ali celo se celo prevesi v negativen vpliv NM na viabilnost MG-63. Za namen diplomskega dela smo kot biološko lastnost NM določili LOAEL, pri katerem smo upoštevali prve koncentracije NM, kjer je bil učinek statistično značilno različen od tega pri celicah negativne kontrole. Zaključujemo, da je stimulativen učinek lahko posledica lastnosti NM.

5.1.1.4 Pomen izbranih-fizikalno kemijskih in bioloških deskriptorjev za analize z računalniškimi modeli

Primarne fizikalno-kemijske lastnosti NM (oblika, velikost, površina, kemijska sestava) in sekundarne lastnosti, ki se oblikujejo v suspenziji (površinski naboj, hidrodinamska velikost), določimo s pomočjo kombinacije različnih metodoloških pristopov. Poleg transmisijske elektronske mikroskopije (TEM) in meritev dinamičnega sipanja svetlobe (ang. *dynamic light scattering*, DLS) za ovrednotenje velikosti NM in njihovih skupkov v suspenziji, so meritve ZP ene izmed najpogosteje uporabljenih metod za določanje lastnosti NM. S slednjo metodo ovrednotimo posredni naboj na površini NM; in obe lastnosti (hidrodinamski radij in površinski naboj) sta posledica lastnosti okolja, v katerem so NM suspendirani, kar bistveno vpliva na interpretacijo rezultatov (Murdock in sod., 2008).

5.1.1.5 Pomen izbranih metodoloških pristopov za vrednotenje vpliva NM na biološke sisteme

V okviru *in vitro* in *in vivo* pred-kliničnih in kliničnih študij vpliva NM na biološke sisteme se pogosto uporabljajo standardni testi strupenosti (Hussain S.M. in sod. 2005), torej enaki metodološki pristopi kot za testiranje vpliva konvencionalnih kemikalij. Tako vrednotenje je pogosto neustrezno, saj se z manjšo velikostjo delcev na nivoju nano-dimenzij ustvarjajo nove, edinstvene lastnosti (nano-specifične lastnosti; Becker in sod. 2011, Lynch in sod. 2014), ki ne dovoljujejo neposrednega ugotavljanja njihovih lastnosti na podlagi lastnosti kemikalij ali materialov večjih dimenzij. Hkrati tako proizvajalci NM kot tudi avtorji številnih študij pogosto podajo le primarne fizikalno-kemijske lastnosti NM, kot so velikost in kemijska sestava, in lastnosti v suspenziji (hidrodinamski radij, površinski naboj), in tudi lastnosti NM v stiku s kompleksnim biološkim okoljem (Monopoli in sod., 2012). Obenem število študij strupenostnega učinka NM *in vitro* ter *in vivo* strmo narašča, vendar informacije o taki kombinaciji lastnosti, četudi sistematično in natančno pridobljene, ne podajo celotne slike o biološki reaktivnosti NM. Eden največjih izzivov nanotehnologije in nanobiologije je najti povezavo med vrednotenimi učinki. Z uporabo t.i. bioloških deskriptorjev NM, kar je npr. njihova encimska aktivnost, smo ponudili enega od načinov za ustvarjanje mostu med podatki o primarnih in sekundarnih lastnostih NM in njihovi strupenosti.

5.1.2 Večparametrna linearna regresijska metoda

Z večparametrsko linearno regresijsko metodo smo določili kvadrate korelacijskih koeficientov R^2 med posameznimi deskriptorji in lastnostjo LAOEL (pregl. 4). Vključili smo štiri fizikalno-kemijske deskriptorje (DF01-04) in šest bioloških deskriptorjev (DB05-10). Na podlagi prve analize smo en tip NM, t.j. TiO_2 111, odstranili iz analize kot ubežnika (ang. *outlier*) (pregl. 4). Razvidno je, da izmed deskriptorjev izstopa deskriptor 4, t.j. struktura NM. Za ostale fizikalno-kemijske deskriptorje pa smo izračunali vrednosti R^2 pod 0,111. Slednje lahko razložimo za vsak posamezni deskriptor, in sicer (i) primarna velikost: kljub temu, da je visoka reaktivnost

NM posledica njihove majhnosti, v primeru obravnavanega nabora NM z deskriptorjem primarne velikosti ni mogoče razložiti razlik med reaktivnostjo, saj so vsi NM bolj ali manj v istem velikostnem razredu, (vsaj v eni dimenziji). (ii) vrednosti ZP za vse NM, ovrednotene v reakcijski zmesi za encime, v negativnem območju (-21,8 do -50 mV), razen TiO₂ 1, kar je ponovno premajhna variacija za razlago razlik med LOAEL. Kljub večji variaciji vrednosti ZP v MilliQ pa je le-ta manj relevantna, saj takoj ko NM pridejo v stik z biološkim okoljem, nase vežejo proteine t.j. nastanek proteinske krone (Cedervall in sod., 2007), in lahko pride menjava oziroma odcepljanja ligandov, kar bistveno vpliva na vrednost ZP NM; v obravnavanem primeru to pomeni, da so vrednosti v relevantnem, kompleksnem biološkem okolju bolj primerljive med posameznimi tipi NM (Monopoli in sod., 2012).

Pet deskriptorjev z največjo vrednostjo R^2 (pregl. 4) smo uporabili za postavitev začetne linearne regresijske funkcije, ki poda izračun vrednosti LOAEL. Vrednost korelacijskega koeficienta med izračunanim in dejanski LOAEL je pri tej funkciji $R^2=0,7450$. Na grafu korelacije (sl. 3) med eksperimentalno določenim in izračunanim LOAEL za to linearno regresijsko funkcijo vidimo da NM04 (t.j. TiO₂) leži daleč od diagonale med osema, katera predstavlja idealno pozicijo, ko je $R^2=1$ in računalniški model idealno izračuna LOAEL. Možna razlaga za slabo napovedano vrednost LOAEL za NM04 je lahko, ker pri modelu ni bila upoštevana vrednost ZP v reakcijski zmesi, kjer je ta delec imel zelo izstopajočo vrednost. Ob odstranitvi NM04 in ponovnim izračunom R^2 med deskriptorji in LOAEL, smo deskriptor DF04 (struktura NM) potrdili kot edini smiselni fizikalni deskriptor z $R^2=0,8326$ (pregl. 5). Za določanje končne oblike modela smo najprej primerjali vrednosti R^2 možnih kombinacij DF04 z biološkimi deskriptorji (Montgomery in sod., 2012). Kombinacija z najvišjo vrednostjo R^2 se je izkazala v primeru EC_{20/50} in IC_{20/50}, kar ni presenetljivo, saj so bile vrednosti EC/IC₈₀ predvidevane s programom OriginPro 2016 s sigmoidno aproksimacijo, in ne eksperimentalno določene, kot je že interpretirano v poglavju 5.1.2. Končni model z upoštevano strukturo NM in EC/IC_{20/50} ter z ustrežajočo vrednostjo $R^2=0,9673$ tako predstavlja izjemno dober predvidni model za to bazo podatkov.

Izkazalo se je, da je zastavljeni sistem za hitro ocenitev oziroma izračun vpliva NM na celice primeren za tovrstno analizo predvidevanja biološkega vpliva NM na osnovi fizikalno-kemijskih in bioloških deskriptorjev. Izmed dvanajstih analiziranih NM smo z uporabo večparameterskega linearne regresijskega modela analizirali deset NM z visoko natančnostjo predvidevanja. Primer ubežnika bi bilo mogoče pojasniti z dodatnimi opisi/lastnostmi NM, ki bi jih vključili med fizikalno-kemijske deskriptorje, kot je na primer površinska modifikacija NM, saj ta ključno vpliva na interakcije NM z biološkimi sistemi (Murdock in sod., 2008).

Uspešnost uporabljenega računalniškega pristopa za predvidevanje vpliva NM na biološke sisteme smo potrdili tudi na osnovi bolj okrnjenega števila podatkov (npr. DF04 z DB05 in DB06 oziroma EC₂₀ in EC₅₀; pregl. 5).

Razvidno je, da v vsakem primeru ob uporabi biološkega deskriptorja povečamo uspešnost računskega modela.

Zaključujemo, da je uporaba vrednotenja adsorpcije NM na BChE in inhibicije aktivnosti encima v prisotnosti NM ustrezna in zelo ugodna kot biološki deskriptor pri modeliranju, saj tako enostavno opišemo in zajamemo kompleksne lastnosti NM, mehanizme interakcij NM z encimi, vključno s spremembo aktivnosti encima in posledičnega vpliva na celice z eno vrednostjo, brez potrebe specifične definicije in natančnega razumevanja mehanizmov vsakega posameznega obravnavanega dela.

5.2 SKLEPI

- Stopnji adsorpcije encima na NM in inhibicije delovanja encima v prisotnosti NM vsaj deloma narekuje njihov vpliv na celice.
- Vrednotenje aktivnosti encimov holinesteraz v kombinaciji s primernim računalniškim modelom in upoštevno strukturo NM predstavlja ustrezeni biološki deskriptor NM.
- Največjo korelacijo med vplivom na encimsko aktivnost BChE iz organizma *E. Caballus* (adsorpcijo encimov na NM in inhibicijo) in vrednostim LOAEL ima struktura NM (vrednost $R^2=0,8326$).
- Vzpostavitev in upoštevanje standardnega operacijskega postopka (SOP) je izjemno pomembno in učinkovito orodje za zagotavljanje dolgoročne in enostavne primerljivosti eksperimentalnih rezultatov vpliva NM na biološke sisteme.
- Z uporabo bioloških deskriptorjev NM je mogoče enostavno opisati in upoštevati kompleksne lastnosti NM v računalniških modelih, vključno z morebitnimi nepojasnenimi mehanizmi delovanja NM in vpliva posameznih lastnosti NM.
- Z dodelanim računalniškim modelom, uporabo bioloških deskriptorjev NM in zajetne podatkovne baze lahko hitro, ekonomično in z dovoljšno natančnostjo ocenimo kvarni učinek NM na biološke sisteme (npr. strupenost).

6 POVZETEK

V diplomskem delu smo predpostavili, da je mogoče z ustrezno kombinacijo fizikalno-kemičnih lastnosti NM in izbranim biološkim deskriptorjem t.j. spremenjena stopnja encimske aktivnosti BChE ob prisotnosti NM, vzpostaviti enostaven, a natančen računalniški model za opis vpliva NM na biološke sisteme (npr. celice v kulturi *in vitro*).

Z izdelavo baze podatkov o poskusih vpliva NM na aktivnost encimov holinesteraz smo poleg izboljšanja kakovosti rezultatov zaradi združevanja več poskusov dobili pregled nad podatki in si omogočili preprosto izbiro primernih nizov podatkov za vzpostavitev računalniških modelov, npr. večparameterska linearna regresijska analiza.

Z izračunom adsorpcijskih in inhibitornih koncentracij NM na aktivnost BChE iz organizma *E.caballus* pri stopnjah zmanjšane aktivnosti ali adsorpcije 20%, 50% in 80% (t.j. EC/IC_{20/50/80}) smo na podlagi razpoložljivih nizov podatkov dobili ustrezne biološke deskriptorje za izbran računalniški model. Kot fizikalno-kemijske deskriptorje smo uporabili bodisi dostopne podatke, navedene s strani proizvajalcev, bodisi eksperimentalno ovrednotene lastnosti NM (ZP v vodi in reakcijski zmesi za encime).

LOAEL (ang. *lowest-observed-adverse-effect level*) smo izbrali kot odvisno spremenljivko, t.j. lastnost, ki jo računalniški model večparameterske linearne regresijske analize predvideva na osnovi vnesenih podatkov. t.j. fizikalno-kemijskih in bioloških deskriptorjev. LOAEL smo izrazili na podlagi eksperimentov na humani celični liniji *in vitro* po 24-urni izpostavitvi izbranim NM, ovrednoteno s testom celične viabilnosti MTT. Z uporabo t-testa kot statističnega orodja smo poiskali najnižjo koncentracijo, pri kateri je vpliv NM statistično različen od negativne kontrole (t.i. LOAEL).

S podatki o strukturi NM, primarni velikosti NM, vrednosti ZP v MilliQ in RM in vrednostim EC/IC_{20/50/80} smo vzpostavili računalniški model (večparameterska linearna regresijska analiza) za izračun vrednosti LOAEL in ga nato z odstranitvijo ubežnikov in izbiro optimalne kombinacije fizikalno-kemičnih in bioloških deskriptorjev izboljšali do končne natančnosti modela s korelacijsko vrednostjo $R^2=0,9673$.

Potrdili smo predpostavko povezave med fizikalno-kemijskimi lastnostmi NM in vplivom NM na aktivnost izoliranih encimov holinesteraz. Poleg tega smo pokazali, da z vključitev bioloških deskriptorjev EC/IC izboljša natančnost modela, torej zaključujemo, da inhibicija encimov v prisotnosti NM vsaj deloma narekuje njihov strupenostni vpliv na celice. Vrednotenje aktivnosti encimov holinesteraz se je izkazalo kot ustrezn biološki deskriptor pri vrednotenju biološkega učinka NM na celice v kulturi z računskimi modeli.

7 VIRI

- Andersen S.M., Borghei M., Lund P., Elina Y., Pasanen A., Kauppinen E., Riuz V., Kauranen P., Skou E. M. 2013. Durability of carbon nanofiber (CNF) & carbon nanotube (CNT) as catalyst support for Proton Exchange Membrane Fuel Cells. *Solid State Ionics*, 231: 94-101
- Aguilar Z. P., Aguilar Y., Xu He., Jones B., Dixon J., Xu Ho., Wang Y. A. 2010. Nanomaterials in Medicine. *ECS*, 40: 2275
- Arufe M. I., Arellano J. M., Garcia L., Albendin G., Sarasquete C. 2007. Cholinesterase activity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae: Characterization and sensitivity to the organophosphate azinphosmethyl. *Aquatic Toxicology*, 84, 3: 328-336
- Becker H., Herzberg F., schulte A., Kolossa-Gehring M. 2011. The carcinogenic potential of nanomaterials, their release from products and options for regulating them. *International journal of hygiene and environmental health*, 214, 3: 231-238
- Borm P., Klaessig F. C., Landry T. D., Moudgil B., Pauluhn J., Thomas K., Trottier R., Wood S. 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part V: Role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicological Sciences*, 90, 1: 23-32
- Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggard T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K. A., Linse S. 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 7: 2050-2055
- Chatterjee S., Bandyopadhyay A., Sarkar K. 2011. Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *Journal of nanobiotechnology*, 9, 34
- Cherkasov A., Muratov E. N., Fourches D., Varnek A., Baskin II., Cronin M., Dearden J., Gramatica P., Martin Y. C., Todeschini R., Consonni V., Kuz'min V. E., Cramer R., Benigni R., Yang C., Rathman J., Terfloth L., Gasteiger J., Richard A., Tropsha A. 2014. QSAR modeling: where have you been? Where are you going to?. *Journal of medicinal chemistry*, 57, 12: 4977-5010
- Clift M. J. D., Gehr P., Rothen-Rutishauser B. 2011. Nanotoxicology: a perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative. *Archives of toxicology*, 84,7: 723-731

- CODESSA, Comprehensive Descriptors for Structural and Statistical Analysis, Reference Manual version 2.0. 1994. Katritzky A. R., Lobanov V. S. Gainesville: 2-18
- De M., Chou S. S., Dravid V. P. 2011. Graphene Oxide as an Enzyme Inhibitor: Modulation of Activity of alpha-Chymotrypsin. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 44: 7524-17527
- Deng Z. J., Mortimer G., Schiller T., Musumeci A., Martin D., Minchin R. F. 2009. Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. *Nanotechnology*, 20, 45
- Dobrovolskaia M. A., Clogston J. D., Neun B. W., Hall J. B., Patri K. A., McNeil S. E. 2008. Method for Analysis of Nanoparticle Hemolytic Properties in Vitro. *Nano Letters*, 8, 8: 2180-2187
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 2: 88-90
- Feng R., Yu Y., Shen C., Jiao Y., Zhou C. 2015. Impact of graphene oxide on the structure and function of important multiple blood components by a dose-dependent pattern. *Journal of biomedical materials research*, 103, 6: 2006-2014
- Ge C., Du J., Zhao L., Wang L., Ying L., Li D., Yang Y., Zhou R., Zhao Y., Chai Z., Chen C. 2011. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 41: 16968-16973
- Geim A. K., Novoselov K. S. 2007. The rise of graphene. *Nature Mater*, 6: 183-191
- Ghaedi M., Rahimi M., Ghaedi A. M., Tyagi I., Agaewal S., Gupta V. K. 2016. Application of least squares support vector regression and linear multiple regression for modeling removal of methyl orange onto tin oxide nanoparticles loaded on activated carbon and activated carbon prepared from Pistacia atlantica wood. *Journal of Colloid and Interface Science*, 461: 425-434
- Hajipour M.J., Fromm K.M., Ashkarran A.A., Jimenez de Aberasturi D., de Larramendi I.R., Rojo T., Serpooshan V., Parak W.J., Mahmoudi M. 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol*, 30, 10: 499-511
- Hirakawa Y., Kamat P.V. 2004. Photoinduced electron storage and surface plasmon modulation in Ag@TiO₂ clusters. *Langumir*, 20, 14: 5645-5647

- Holt B. D., Dahl N. K., Islam M. F. 2011. Quantification of Uptake and Localization of Bovine Serum Albumin-Stabilized Single-Wall Carbon Nanotubes in Different Human Cell Types. *Small*, 7, 16: 2348-2355
- Hou P. X., Xu S. T., Ying Z., Yang Q. H., Liu C., Cheng H. M. 2003. Hydrogen adsorption/desorption behavior of multi-walled carbon nanotubes with different diameters. *Carbon*, 41, 13: 2471-2476
- Hurt R. H., Monthioux M., Kane A. 2006. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. *Carbon*, 44, 6: 1028-1033
- Hussain S., Boland S., Baeza-Squiban A., Hamel R., Thomassen L. C. J., Martens J. A., Billon-Galland M. A., Fleury-Feith J., Moisan F., Paireon J. C., Marano F. 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*, 260, 1-3: 142-149
- Hussain S. M., Hess K. L., Gearhart J. M., Geiss K. T., Schlager J.J. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicology in vitro*, 19, 7: 975-983
- Jackson P., Hougaard K. S., Boisen A. M. Z., Jacobsen N. R., Jensen K. A., Moller P., Brunborg G., Gutzkow K. B., Andersen O., Loft S., Vogel U., Wallin H. 2012. Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: Effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring. *Nanotoxicology*, 6, 5: 486-500
- Jeliazkova N., Doganis P., Fadeel B., Grafström R., Hastings J., Jeliazkov V., Kohonen P., Munteanu C.R., Sarimveis H., Smeets B., Tsiliki G., Vorgrimmler D., Willighagen E. 2014. The first eNanoMapper prototype: A substance database to support safe-by-design. 2014. IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine, Belfast. 2-5 nov. 2014: 1-9
- Lanzl A. C., 2013. Size-dependent reactivity of hematite nanoparticles: environmental implications of dissolution mechanisms and aggregation. Iowa, University of Iowa, <http://ir.uiowa.edu/etd/2557/> (6. maj 2016)
- Lynch I., Weiss C., Valsami-Jones E. 2014. A strategy for grouping of nanomaterials based on key physico-chemical descriptors as a basis for safer-by-design NMs. *Nano Today*, 9: 266-270
- Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T., Dawson K. A. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for

- biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 38: 14265-14270
- Meng J., Cheng X. L., Liu J., Zhang W. Q., Li X. J., Kong H., Xu H. Y. 2012. Effects of Long And Short Carboxylated or Aminated Multiwalled Carbon Nanotubes on Blood Coagulation. *Plos One*, 7, 7: e38995
- Mesarič T., Baweja L., Drašler B., Drobne D., Makovec D., Dušak P., Dhawan A., Sepčič K. 2013. Effects of surface curvature and surface characteristics of carbon-based nanomaterials on the adsorption and activity of acetylcholinesterase. *Carbon*, 62: 222-232
- Mital G. S., Manoj T. 2011. A review of TiO₂ nanoparticles. *Chinese Science Bulletin*, 56, 16: 1639-1657
- Mitragotri S., Anderson D.G., Chen X., Chow E.K., Ho D., Kabanov A.V., Karp J.M., Kataoka K., Mirkin C.A., Petrosko S.H., Shi J, Stevens M.M., Sun S., Teoh S., Venkatraman S.S., Xia Y., Wang S., Gu Z., Xu C. 2015. Accelerating the Translation of Nanomaterials in Biomedicine. *ACS Nano*, 9, 7: 6644-6654
- Monopoli M. P., Aberg C., Salvati A., Dawson K. A. 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7, 12: 779-786
- Montgomery D. C., Peck E. A., Vining G. G. *Introduction to Linear Regression Analysis*. 5. izd. Hoboken, Wiley: 660 str.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 1-2: 55-63
- Mu Q., Jiang G., Chen L., Zhou H., Fourches D., Tropsha A., Yan B. 2015. Chemical Basis of Interactions Between Engineered Nanoparticles and Biological Systems. *Chemical reviews*, 114, 15: 7740-7781
- Murdock R. C., Braydich-Stolle L., Schrand A. M., Schlager J. J., Hussain S. M. 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological sciences*, 101, 2: 239-253
- Mytych J., Wnuk M., Rattan S. 2016. Low doses of nanodiamonds and silica nanoparticles have beneficial hormetic effects in normal human skin fibroblasts in culture. *Chemosphere*, 148: 307-315

- Naahidi S., Jafari M., Edalat F., Raymond K., Khademhosseini A., Chen P. 2013. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of controlled release*, 166, 2: 182-194
- Nel A.E., Mädler L., Velegol D., Xia T., Hoek E.M., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*, 8, 7: 543-557
- Ruh H., Kuhl B., Brenner-Weiss G., Hopf C., Diabate S., Weiss C. 2012. Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials. *Toxicology Letters*, 208, 1: 41-50
- Saptarshi R. S., Duschl A., Lopata A. L. 2013. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *Journal of nanobiotechnology* 11, 26
- Sayes C., Ivanov I. 2010. Comparative Study of Predictive Computational Models for Nanoparticle-Induced Cytotoxicity. *Risk Analysis*, 30, 11: 1723-1734
- Sclafani A., Herrman J. M. 1996. Comparison of the Photoelectronic and Photocatalytic Activities of Various Anatase and Rutile Forms of Titania in Pure Liquid Organic Phases and in Aqueous Solutions. *The journal of Physical Chemistry*, 100, 32: 13655-13661
- Sedykh A., Zhu H., Tang H., Zhang L., Richard A. 2011. Use of in Vitro HTS-Derived Concentration-Response Data as Biological Descriptors Improves the Accuracy of QSAR Models of in Vivo Toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 119, 3: 364-370
- Sopotnik M., Leonardi A, Križaj I., Dušak P., Makovec D., Mesarič T., Poklar Urlih N., Junkar I., Sepčič K., Drobne D., 2015. Comparative study of serum protein binding to three different carbon-based nanomaterials. *Carbon*, 95: 560-572
- Sousa S. R., Moradas-Ferreira P., Saramago B., Melo L. V., Barbosa M. A. 2004. Human serum albumin adsorption on TiO₂ from single protein solutions and from plasma. *Langmuir*, 20, 22: 9745-9754
- Stoeger T., Takenaka S., Frankenberger B., Ritter B., Karg E., Maier K., Schulz H., Schmid O. 2009. Deducing in Vivo Toxicity of Combustion-Derived Nanoparticles from a Cell-Free Oxidative Potency Assay and Metabolic Activation of Organic Compounds. *Environmental health perspectives*, 117, 1: 54-60
- Sund J., Alenius H., Vippola M., Savolainen K., Puustinen A. 2011. Proteomic Characterization of Engineered Nanomaterial-Protein Interactions in Relation to Surface Reactivity. *ACS Nano*, 5, 6: 4300-4309

- Šinko G., Vinković Vrček I., Goessler W., Leitinger G., Dijanošić A., Miljanić S. 2014. Alteration of cholinesterase activity as possible mechanism of silver nanoparticle toxicity. *Environmental science and pollution research international*, 21, 2: 1391-1400
- Tenzer S., Docter D., Rosfa S., Wlodarski A., Kuharev J., Rekik A., Knauer S. K., Bantz C., Nawroth T., Bier C., Sirirattanapan J., Mann W., Treuel L., Zellner R., Maskos M., Schild H., Stauber R.H. Nanoparticle Size Is a Critical Physicochemical Determinant of the Human Blood Plasma Corona: A Comprehensive Quantitative Proteomic Analysis. *ACS Nano*, 5, 9: 7155-7167
- Valenti L. E., Fiorito P.A., Garcia C. D. Giacomelli C. E. 2007. The adsorption-desorption process of bovine serum albumin on carbon nanotubes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 307, 2: 349-356
- Walter D. 2013. Primary Particles – Agglomerates – Aggregates. Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. Weinheim, Deutsche Forschungsgemeinschaft: 9-24
- Wang Z. Y., Zhao J., Li F. M., Gao D. M., Xing B. S. 2009. Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. *Chemosphere*, 77, 1: 67-73
- Xia X. R., Monteiro-Riviere N. A., Mathur S., Song X. F., Xiao L. S., Oldenberg S. J., Fadeel B., Riviere J. E. 2011. Mapping the Surface Adsorption Forces of Nanomaterials in Biological Systems. *ACS Nano*, 5, 11: 9074-9081
- Yang K., Zhang S. A., Zhang G. X., Sun X. M., Lee S. T., Liu Z. A. 2010. Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy. *Nano Letters*, 10, 9: 3318-3323
- Zhang C. D., Luo S. M., Chen W. 2013. Activity of catalase adsorbed to carbon nanotubes: Effects of carbon nanotube surface properties. *Talanta*, 113: 142-147
- Zhao S., Golbraikh A., Oloff S., Kohn H., Tropsha A. 2006. A Novel Automated Lazy Learning QSAR (ALL-QSAR) Approach: Method Development, Applications, and Virtual Screening of Chemical Databases Using Validated ALL-QSAR Models. *Journal of chemical information and modeling*, 46,5: 1984-1995
- Zhao Z., Sun Y., Dong F. 2015. Graphitic carbon nitride based nanocomposites: a review. *Nanoscale*, 7: 15-37

ZAHVALA

Največjo zahvalo za bi rad izrekel svoji mentorici prof. dr. Damjani Drobne, da me je vzela pod okrilje svoje skupine v trenutku časovne stiske in negotovosti. Prof. Drobne, hvala vam za strokovno pomoč in sproščeno vzdušje pri delu.

Somentorju doc. dr. Marjanu Vračko Grobeljšku za izjemno prijetno sodelovanje, hitro in korektno delo, ter vso izkazano dobro voljo.

Posebno zahvalo izrekam recenzentu doc. dr. Mateju Butali za neverjetno hiter pregled diplomskega dela, namenu svojega osebnega časa, razumevanju situacije in za voljo za sodelovanje.

Draga prof. dr. Kristina Sepčič, hvala za vso nesebično pomoč, podporo in veliko mero pozitivnosti, ki se širi na vse in nam vsem daje voljo in zalet.

Zahvaljujem se celotni skupini Bionanoteam za topel sprejem, izvedbo vseh poskusov in deljenja njihovih rezultatov za namen diplomske naloge.

Zahvaljujem se Neži Rugelj za pomoč pri izvedbi testa MTT in vseh nasvetov.

Zelo veliko zahvalo bi rad izrekel dr. Sari Novak. Sara, hvala za prevzete vloge sela v mojem imenu, rešitve vseh nedokončanih formalnosti, podpore in prijateljstva. Ostajam tvoj dolžnik, za vedno.

Zahvaljujem se predstojnici Katedre za splošno zoologijo prof. dr. Jasni Štrus za možnost sodelovanja.

Poleg strokovnega doprinosa se zahvaljujem svoji puncici dr. Barbari Drašler za neizmerno potrpežljivost in podporo, ki mi jo nudi v vsakem trenutku, ne le v času izdelave diplomskega dela. Hvala, da me sprejemaš, z vsemi lastnostmi.

In nenazadnje, najlepša hvala za nesebično podporo družine in prijateljev tudi v času dodiplomskega študija.

Zahvala tudi Zdenki Repanšek Tavčar in Lučki Glavač za pohitritev postopkov potrebnih za izvedbo diplomskega dela.

Hvala vsem, ki ste prispevali k izdelavi diplomskega dela.