



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Irena GORENC

**CITOTOKSIČNI IN GENOTOKSIČNI UČINKI UV-A
AKTIVIRANIH ANATAZNIH DELCEV TiO₂ NA
CELICE HepG2**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Irena GORENC

**CITOTOKSIČNI IN GENOTOKSIČNI UČINKI UV-A AKTIVIRANIH
ANATAZNIH DELCEV TiO₂ NA CELICE HepG2**

MAGISTRSKO DELO
(Magistrski študij – 2.stopnja)

**CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF UV-A ACTIVATED
ANATASE TiO₂ PARTICLES IN HepG2 CELLS**

M. SC. THESIS
(Master Study Programmes)

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija – 2. stopnja Molekulska biologija. Opravljeno je bilo na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani in na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Študijska komisija Študija molekulske biologije je dne 18. 4. 2014 odobrila temo in naslov magistrskega dela in za mentorja imenovala prof. dr. Gregorja Serša, za somentorico dr. Jano Nunić in za recenzentko prof. dr. Damjano Drobne.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Jasna DOLENC KOCE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gregor SERŠA
Onkološki inštitut

Članica: dr. Jana NUNIĆ
Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za gensko toksikologijo in biologijo raka

Članica: prof. dr. Damjana DROBNE
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 22. 5. 2014

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svojega dela na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Irena Gorenc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2
DK UDK 620.3(043.2)=163.6
KG nanotehnologija/titanov dioksid/nanodelci/podmikronski delci/UV-A/fotokataliza/citotoksičnost/genotoksičnost/celice HepG2
AV GORENC, Irena, diplomirana biotehnologinja
SA SERŠA, Gregor (mentor)/NUNIČ, Jana (somentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI 2014
IN CITOTOKSIČNI IN GENOTOKSIČNI UČINKI UV-A AKTIVIRANIH ANATAZNIH DELCEV TiO₂ NA CELICE HepG2
TD Magistrsko delo (Univerzitetni študij – 2. stopnja Molekulska biologija)
OP XII, 77 str., 16 pregl., 15 sl., 114 vir.
IJ sl
JI sl/en

AI Titanov dioksid (TiO₂) zaradi posebnih fizikalno-kemijskih lastnosti in fotokatalitske aktivnosti uporabljamo v številnih aplikacijah. Čeprav testiranja potencialnih negativnih učinkov TiO₂ na zdravje ljudi potekajo že nekaj let, naše znanje o njihovih morebitnih toksičnih učinkih ostaja omejeno, posebej glede varnosti fotokatalitsko (z UV-A) aktiviranih delcev TiO₂. Zato smo v magistrskem delu preverili, ali se po pred-obsevanju anataznih TiO₂ nanodelcev (TiO₂-N) in podmikronskih delcev (TiO₂-B) z UV-A njihovo citotoksično in genotoksično delovanje spremeni, in koliko časa se potencialni učinek fotoaktivacije obdrži. Kot testni sistem smo uporabili človeške jetrne celice (celice HepG2), ki smo jih izpostavili neobsevanim delcem, pred-obsevanim delcem takoj po obsevanju in pred-obsevanim delcem, ki so bili 1 dan oziroma 7 dni v temi. Po izpostavitvi celic neobsevanim delcem smo ugotovili, da le TiO₂-B pri najvišji testirani koncentraciji po 24- in 48-urni izpostavitvi zmanjša preživetje celic za približno 14 %, medtem ko sta oba tipa delcev delovala genotoksično, predvsem TiO₂-N. Po pred-obsevanju z UV-A svetlobo smo opazili precej večje citotoksične in genotoksične učinke, ki so bili najbolj izraziti takoj po obsevanju. Primerljivi so bili tudi učinki po 1 dnevu v temi, medtem ko po 7 dneh v temi učinka citotoksičnosti skoraj nismo opazili, genotoksičnost delcev TiO₂ pa se je delno ohranila. Zaključimo lahko, da se toksično delovanje delcev TiO₂ po obsevanju z UV-A močno poveča ne glede na velikost delcev ter da se povečana reaktivnost ohrani za najmanj 1 dan tudi po končanem obsevanju.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDK 620.3(043.2)=163.6
CX nanotechnology/titanium dioxide/nanoparticles/bulk/UV-A/photocatalysis/
citotoxicity/genotoxicity/HepG2 cells
AU GORENC, Irena
AA SERŠA, Gregor (supervisor)/NUNIĆ, Jana (co-advisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of biology
PY 2014
TY CYTOTOXIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF UV-A ACTIVATED
ANATASE TiO₂ PARTICLES IN HepG2 CELLS
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes – Molecular biology)
NO XII, 77 p., 16 tab., 15 fig., 114 ref.
LA sl
Al sl/en
AB Titanium dioxide (TiO₂) is used in many applications due to its special physico-chemical properties and photocatalytic activity. Although testing the potential adverse effects of TiO₂ on human health have been ongoing for several years, our knowledge of their potential toxic effects remains limited, especially regarding the safety of photocatalytic (UV-A) activated TiO₂ particles. Therefore the aim of our master`s thesis was to investigate whether the pre-irradiation of TiO₂ anatase nanoparticles (TiO₂-N) and sub-micron particles (TiO₂-B) with UV-A changes their cytotoxic and genotoxic effects and how long is the potential impact of photoactivation maintained. As a test system, we used human liver cells (HepG2 cells), which were exposed to non-irradiated particles, pre-irradiated particles immediately after irradiation, and the pre-irradiated particles, which were in the dark for 1 day or 7 days. After exposure to non-irradiated particles, we found that only TiO₂-B at the highest concentration after 24 and 48 hour exposure reduced viability of the cells for about 14 %, while both types of particles were genotoxic, especially TiO₂-N. After the pre-irradiation with UV-A light we observed significantly increased cytotoxic and genotoxic effects, which were most prominent immediately after irradiation. The effects were comparable also after 1 day in the dark, while after 7 days in the dark we did not observe almost none cytotoxic effect, while genotoxicity of TiO₂ particles was partially maintained. It can be concluded that the toxic effects of TiO₂ particles are strongly increased after irradiation with UV-A, regardless to the size of the particles, and that the increased reactivity is maintained at least for 1 day after the end of irradiation.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	X
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA.....	1
1.2 CILJ MAGISTRSKEGA DELA.....	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA.....	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NANODELCI.....	3
2.2 TiO ₂	7
2.3 FOTOKATALITSKE LASTNOSTI TiO ₂	10
2.4 SUPERHIDROFILNOST.....	14
2.5 TiO ₂ V SONČNIH KREMAH.....	15
2.6 TOKSIČNO DELOVANJE DELCEV TiO ₂	18
3 MATERIALI IN METODE.....	26
3.1 MATERIALI	26
3.1.1 Laboratorijska oprema.....	26
3.1.2 Kemikalije	28
3.1.3 Celična kultura HepG2	29
3.1.3.1 Gojenje celic HepG2.....	31
3.1.3.2 Štetje celic.....	33
3.1.4 Karakterizacija delcev TiO₂.....	34
3.1.4.1 Priprava delcev TiO ₂	36

3.2	METODE	37
3.2.1	Test MTT	37
3.2.2	Izvedba testa MTT	38
3.2.3	Test komet	39
3.2.4	Modificirani test komet	42
3.2.5	Izvedba modificiranega testa komet	44
4	REZULTATI	49
4.1	TEST MTT	49
4.2	MODIFICIRANI TEST KOMET	52
5	RAZPRAVA	56
6	SKLEPI	64
7	POVZETEK	65
8	VIRI	67
	ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Lastnosti nanomaterialov (Wolfgang, 2004).....	5
Pregl. 2: Pregled uporabe nanomaterialov po različnih panogah (Wolfgang, 2004; National Nanotechnology Initiative, 2014).	6
Pregl. 3: Uporaba fotokatalitskih lastnosti delcev TiO ₂ (Fujishima in sod., 2008).	14
Pregl. 4: Primeri raziskav, ki so pokazali vpliv delcev TiO ₂ različnih kristalnih struktur in velikosti na oksidativni stres v različnih celicah in organizmih.	21
Pregl. 5: Uporabljena laboratorijska oprema navedena skupaj s proizvajalcem.	26
Pregl. 6: Uporabljene kemikalije navedene skupaj s proizvajalcem in kataloško številko.	28
Pregl. 7: Sestavine za pripravo medija za gojenje celic HepG2 (50 ml).	32
Pregl. 8: Sestavine za pripravo 1×PBS (100 ml).	32
Pregl. 9: Sestavine za pripravo 0,1 % raztopine tripsina (1000 ml).	32
Pregl. 10: Lastnosti delcev TiO ₂ -N in TiO ₂ -B.....	34
Pregl. 11: Lastnosti delcev TiO ₂ -N in TiO ₂ -B v raztopini.....	36
Pregl. 12 : Priprava 1 % NMP in LMP agaroze.	45
Pregl. 13: Priprava raztopine za lizo celic (300 ml).	46
Pregl. 14: Priprava pufra ERB (600 ml).	46
Pregl. 15: Priprava elektroforetskega pufra (1250 ml).	47
Pregl. 16: Priprava nevtralizacijskega pufra (300 ml).	47

KAZALO SLIK

Sl. 1: Različne kristalne oblike TiO ₂ (Smyth in Bish, 1988).	8
Sl. 2: Shematski prikaz poteka reakcij na delcu TiO ₂ po obsevanju z UV svetlobo (prirejeno po Yang Yang Zhang's Weblog, 2010).	11
Sl. 3: Prikaz superhidrofilnosti površine prekrte z delci TiO ₂ ob izpostavljenosti UV sevanju svetlobe (prirejeno po Feng in sod., 2005: 5117).	14
Sl. 4: Mehanizmi delovanja delcev TiO ₂ na celico, ki lahko povzročijo oksidativni stres ali vnetni odziv, ter posledično poškodujejo DNK in spremenijo izražanje genov (prirejeno po Singh in sod., 2009: 3901).	20
Sl. 5: Kemični strukturi z UV svetlobo povzročenih fotoproduktov v celicah (prirejeno po Cadet in sod., 2005: 4).	23
Sl. 6: Posnetek celic HepG2 (100-kratna povečava; fotografirala J. Nunić).	30
Sl. 7: Posnetki morfologije anataznih delcev TiO ₂ -N in TiO ₂ -B (fotografiral: Z. Samardžija).	35
Sl. 8: Redukcija MTT reagenta z mitohondrijsko sukcinat dehidrogenazo v formazan (prirejeno po FAME Pharmaceuticals, 2010).	37
Sl. 9: Prikaz različnih stopenj poškodb DNK pri testu komet (Collins in Dušinská, 2002: 152).	40
Sl. 10: Prikaz 8-OH gvanina (a) in nastanek baznega para adenin: 8-OH gvanin (b) (prirejeno po Brown T. In Brown T. (Jr.), 2014).	43
Sl. 11: Vpliv različnih koncentracij TiO ₂ -N (A) in TiO ₂ -B (B) na preživetje celic HepG2 po 4 urah izpostavitve.	49
Sl. 12: Vpliv različnih koncentracij TiO ₂ -N (A) in TiO ₂ -B (B) na preživetje celic HepG2 po 24 urah izpostavitve.	50
Sl. 13: Vpliv različnih koncentracij TiO ₂ -N (A) in TiO ₂ -B (B) na preživetje celic HepG2 po 48 urah izpostavitve.	50

Sl. 14: Vpliv delcev TiO ₂ -N (A in B) in TiO ₂ -B (C in D) na nastanek prelomov DNK (-Fpg) in oksidiranih purinov (+Fpg) po 4 urah izpostavitve.....	52
Sl. 15: Vpliv delcev TiO ₂ -N (A in B) in TiO ₂ -B (C in D) na nastanek prelomov DNK (-Fpg) in oksidiranih purinov (+Fpg) po 24 urah izpostavitve..	54

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Okrajšava	Pomen
A _{570/590}	absorbanca pri valovni dolžini 570 nm in referenčnem filtru 690 nm
ALS	alkalno labilna mesta
BaP	benzo[a]piren
BER	bazno izrezovalno popravljanje
BET metoda	določevanje specifične površine z adsorbcijo plinov
BSA	goveji serumski albumin
CA	kontaktni kot
Ca ²⁺	kalcijevi ioni
CPD	ciklobutanski pirimidinski fotodimer
CYP	citokrom P450
dH ₂ O	destilirana voda
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DSB	dvoverižni prelomi DNK
EDTA	etilendiaminotetraetanojska kislina
ERB	encimski reakcijski pufer
EtdBr	etidijev bromid
EtOH	etanol
FBS	serum govejega zarodka
FDA	Administracija za hrano in zdravila
FEG-SEM	elektronski mikroskop z izvorom elektronov na poljsko emisijo
Fe ₃ O ₄ , Fe ₂ O ₃	železovi oksidi
Fpg	formamidopirimidin N-glikozilaza DNK
GST	glutation S-transferaza
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina
HepG2	celična linija humanega hepatoma
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IARC	Mednarodna agencija za raziskave raka

KCl	kalijev klorid
KOH	kalijev hidroksid
LMB agarosa	agarosa z nizko točko tališča
MEM	minimalni esencialni medij
MeOH	metanol
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid
NaCl	natrijev klorid
NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
NaHCO ₃	natrijev hidrogen karbonat
NaOH	natrijev hidroksid
NEAAS	neesencialne aminokisljine
NER	nukleotidno izrezovalno popravljanje
NIOSH	Ameriški Nacionalni inštitut za poklicno varnost in zdravje
NMP agarosa	agarosa z normalno točko tališča
NO [·]	dušikov oksidni radikal
NOS	sintaza dušikovega oksida
O ₂	molekularni kisik
O ₂ ^{·-}	superoksidni radikal
¹ O ₂	singletni kisik
³ O ₂	tripletno stanje kisika
[·] OH	hidroksilni radikal
OECD	Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj
ONOO ⁻	peroksinitrit
8-OH gvanin	8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksigvanozin
PBS	fiziološka raztopina v fosfatnem pufru
RNK	ribonukleinska kislina
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
SCGE	test elektroforeze posameznih celic
SiO ₂	silicijev dioksid
SOD	superoksid dismutaza
SPF	faktor zaščite sončne kreme

SSB	enoveržni prelomi DNK
tBOOH	tert-Butil hidroperoksid
TEM	presevni elektronski mikroskop
TiO ₂	titanov dioksid
TiO ₂ -B	titanov (IV) oksid, podmikronske velikosti
TiO ₂ -N	titanov (IV) oksid, nanodelci (< 25nm)
Ti(IV)	titanij z oksidacijskim stanjem 4+
Ti(III)	titanij z oksidacijskim stanjem 3+
TRIS	2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol
Triton X-100	polietilen glikol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil eter
UV	ultravijolična svetloba
XRD	rentgenska praškovna difrakcija
ZnO	cinkov oksid

1 UVOD

Nanotehnologija je ena najpomembnejših tehnologij 21. stoletja, saj zaradi inovacij na številnih področjih uporabe obeta velike ekonomske dobičke in gospodarski napredek. Nanotehnologija omogoča proizvodnjo novih materialov, ki so popolnoma drugačni od materialov večjih dimenzij, saj jih odlikuje nenavadna trdnost, posebne električne, fizikalne, optične in kemične lastnosti. Z manjšimi, lažjimi, hitrejšimi in učinkovitejšimi materiali, napravami in sistemi nanotehnologija ponuja možne rešitve za številne trenutne težave. Uporaba nanodelcev je tako možna na številnih področjih: v biomedicini, metalurški industriji, agrikulturi, tekstilni industriji, kozmetiki, energetiki, elektroniki... Nanotehnologija je multidisciplinarno področje, ki zaradi širokega spektra uporabe nanodelcev združuje strokovnjake s področja kemije, biologije, fizike, elektrotehnike in ostale specialiste za področje materialov. Razvoj nanotehnologije in nanodelcev je trenutno eno najbolj aktivnih področij raziskovanja v svetovnem merilu, saj obeta, da bo mogoče temeljne raziskave spreobrniti v uspešne inovacije, kar je ustvarilo bilijonska vlaganja v raziskave in razvoj novih produktov (Ostiguy in sod., 2006). Doba nanotehnologije in nanomaterialov bo ena glavnih znanstvenih dosežkov in prodorov v prihodnosti s trajnim učinkom na naše vsakdanje življenje.

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Medtem ko se število raziskav in hitrost razvoja novih produktov nanotehnologije na trgu povečuje z veliko hitrostjo, precej počasneje narašča število toksikoloških študij in raziskav učinkov nanodelcev na zdravje ljudi in živali ter vpliv na okolje. Nanotehnologija je namreč v zadnjih nekaj desetletjih močno napredovala in eni gospodarsko najbolj zanimivih nanodelcev so nanodelci TiO₂. Nanodelci TiO₂ imajo zaradi majhne velikosti in velike specifične površine posebne fizikalno-kemijske lastnosti. Hkrati pa ravno zaradi teh posebnih lastnosti vse pogosteje ugotavljamo tudi njihov škodljiv vpliv na različne organizme, kot so bakterije, alge, nevretenčarji, ribe in sesalci. Poleg tega so nanodelci v okolju podnevi izpostavljeni sončni svetlobi, zaradi česar se njihova reaktivnost še dodatno poveča, kar ima za posledico tudi večjo toksičnost delcev. Kljub hitro rastočemu razvoju novih materialov pa so možni škodljivi učinki delcev TiO₂ slabo preiskovani. Hkrati so tudi

slabo raziskane interakcije delcev TiO₂ s tarčnimi celicami in biološkimi sistemi, kar je pomembno pri razumevanju toksičnosti in biološkem učinku nanodelcev (Nel in sod., 2006; Handy in sod., 2008a). Rezultati raziskav na področju nanotoksikologije pa so si pogosto tudi nasprotujoči, zaradi česar je težko priti do zaključkov, ki so med drugim pomembni tudi na nivoju zakonodaje. Nezadostna karakterizacija lastnosti nanodelcev, heterogenost parametrov in hkrati izjemna raznolikost in nepredvidljivost lastnosti le-teh onemogočajo primerjavo rezultatov različnih študij. Potrebne so nadaljnje raziskave za določitev natančnejših mehanizmov toksičnosti in trajanja škodljivega delovanja, saj bomo le na ta način lahko varno uporabljali produkte nanotehnologije in hkrati zaščitili sebe in ostale žive organizme na Zemlji pred škodljivim delovanjem nanodelcev.

1.2 CILJ MAGISTRSKEGA DELA

Cilj magistrskega dela je določiti in primerjati citotoksično in genotoksično delovanje neobsevanih in z UV-A svetlobo pred-obsevanih anataznih delcev TiO₂ podmikronske (TiO₂-B) in nano velikosti (TiO₂-N) na celice HepG2. Citotoksičnost delcev TiO₂ bomo določili s testom MTT, genotoksičnost delcev, to je nastanek prelomov DNK, s testom komet, oksidativne poškodbe DNK pa z modificiranim testom komet. Celice bomo izpostavili neobsevanim in obsevanim delcem TiO₂. Delce TiO₂ bomo po obsevanju z UV-A svetlobo izpostavili celicam takoj oziroma po 1 dnevu oziroma po 7 dneh v temi. Podaljšano škodljivo delovanje delcev TiO₂ po prenehanju obsevanja z UV-A svetlobo do sedaj še ni bilo preučevano, zato bodo naši rezultati prispevali pomembne ugotovitve k boljšemu poznavanju in razumevanju škodljivega delovanja delcev TiO₂.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da se povečano citotoksično in genotoksično delovanje z UV-A svetlobo pred-obsevanih nanodelcev TiO₂-N in podmikronskih delcev TiO₂-B na celice HepG2 po končanem obsevanju določen čas ohrani.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANODELCI

Nanodelci nastajajo pri različnih geoloških in bioloških procesih vse od nastanka Zemlje, zaradi česar smo jim ljudje izpostavljeni že ves čas skozi evolucijo, skozi katero smo se jim uspeli tudi delno prilagoditi. Nanodelec je delec, ki je vsaj v eni dimenziji < 100 nm. Nanomaterial pa pomeni netopen ali biološko obstojen in namenoma proizveden material z eno ali več zunanjimi dimenzijami ali notranjo strukturo < 100 nm (Borm in sod., 2006; Uredba ..., 2009). To definicijo moramo prilagoditi za področje ekotoksikologije in upoštevati tudi nanomaterialne, ki lahko vsebujejo nekaj primarnih delcev večjih od 100 nm ali večje agregate delcev z velikostjo nekaj μm . V toksikologiji sesalcev lahko delce razdelimo v tri skupine in sicer na grobe delce (angl. coarse particles) s premerom od 10–2,5 μm , drobne delce (FP, angl. fine particles) s premerom $< 2,5$ μm in majhne delce (UFP, angl. ultrafine particles) s premerom < 1 μm , kamor uvrščamo tudi večino nanodelcev. Natančno mejo med nanodelcem in delcem mikro velikosti tako težko postavimo, lahko pa kot mejno vrednost določimo velikost 0,5 μm (Handy in sod., 2008a, 2008b).

Spekter nanomaterialov obsega organske in anorganske snovi, kristalne in amorfne delce, ki jih najdemo kot posamezne delce, agregate, praške, koloide, suspenzije in emulzije, nanosloje in nanofilme ter tudi supramolekularne spojine, kot so dendrimeri, miceli ali liposomi. Medtem ko imajo nanovlakna dve dimenziji manjši od 100 nm in je tretja dimenzija lahko mnogo večja od le-te, imajo nanofilmi le eno dimezijo nano velikosti. Tudi vsi konvencionalni materiali, kot so kovine, polprevodniki, steklo, keramika in polimeri, se lahko nahajajo v nano dimenziji (Wolfgang, 2004; Handy in sod., 2008b).

Nanodelci imajo različen izvor, in sicer jih delimo na naravne, inženirske in nenamensko proizvedene delce. Naravni nanodelci nastajajo v naravi zaradi vulkanskih izbruhov in pri drugih naravnih in bioloških procesih. Inženirske nanodelce proizvajamo načrtno in jih najdemo na tržišču v hrani, kozmetiki, detergentih in drugih proizvodih. Nekateri od teh nanodelcev so titanov dioksid (TiO₂; angl. titanium dioxide), železov oksid (Fe₃O₄, Fe₂O₃; angl. iron oxide), nanosrebro, cinkov oksid (ZnO; angl. zinc oxide) in silicijev dioksid (SiO₂;

angl. silicium dioxide). Tovrstni nanodelci so namensko narejeni majhnih velikosti in površinsko obdelani, da se ne morejo združevati v večje skupke, kar je pri naravnih nanodelcih običajno. Hkrati pa so v okolju prisotni tudi nanodelci, ki jih ljudje sami nenamensko proizvajamo, in na katere nismo oziroma smo še vedno premalo pozorni. Primer je odprti ogenj, motorji z notranjim izgorevanjem in industrijska proizvodnja. Pri gorenju zaradi nepopolne oksidacije ogljika nastajajo ogljikovi nanodelci, ki smo jim najpogosteje izpostavljeni skozi dihala in imajo na ljudi številne negativne učinke. Gorenje in promet pa sta tudi največja onesnaževalca ozračja z nanodelci (Remškar, 2009; Handy in sod., 2008b).

Industrijsko proizvedene nanodelce moramo obravnavati drugače, saj so oblikovani tako, da imajo specifične lastnosti, ki jih pri naravnih nanodelcih ne najdemo (Pregl. 1). Poleg tega imajo kompleksno koloidno in agregacijsko strukturo, na katero vplivajo oblika delca, velikost, površina in naboj. Abiotski dejavniki, kot so pH, ionska jakost, trdota vode in prisotnost organskih snovi, lahko spremenijo agregacijske lastnosti in vplivajo na toksičnost nanodelcev (Handy in sod., 2008a, 2008b).

Tovrstne posebne lastnosti nanomaterialov so posledica kvantne velikosti delcev in ekstremno velikega razmerja med površino in volumnom delca, zaradi česar je veliko število atomov/molekul izpostavljenih na površini delca. Velikost je zelo pomembna, saj če primerjamo delce s premerom 10 nm, je le približno 20 % vseh atomov izpostavljenih na površini, medtem ko ima delec s premerom 1 nm kar 90 % vseh atomov izpostavljenih na površini delca. Povečanje razmerja med površino in volumnom se kaže v povečani površinski energiji delca, kar vodi v nižanje točke ledišča in povečanje aktivnosti. Nanodelci zaradi povečane reaktivnosti pogosto tvorijo aglomerate. Znano je, da velika specifična površina delca močno poveča možnost neugodnih kemijskih in termodinamičnih reakcij (Wolfgang, 2004; Oberdörster in sod., 2007; Shi in sod., 2013).

Preglednica 1: Lastnosti nanomaterialov (Wolfgang, 2004).

LASTNOSTI	PRIMERI
Katalitične	Večja katalitična učinkovitost zaradi večjega razmerja med površino in volumnom delca
Električne	Povečana električna prevodnost v keramičnih in magnetnih nanokompozitih, povečana električna upornost pri kovinah
Magnetne	Povečana magnetna koercitivnost in superparamagnetne lastnosti
Mehanske	Izboljšana trdota kovin in zlitin, razteznost in plastičnost keramike
Optične	Spektralni premik optične absorpcije in fluorescenčnih lastnosti, povečana kvantna učinkovitost polprevodniških kristalov
Sterične	Povečana selektivnost, votle kroglice za specifičen transport zdravil in kontrolirano sproščanje
Biološke	Povečana permeabilnost skozi biološke bariere (membrane, krvno-možganska bariera ...), izboljšana biokompatibilnost

S temi edinstvenimi lastnostmi nanomaterialov imajo nanodelci velik ekonomski potencial in bistveno izboljšujejo učinkovitost številnih izdelkov v različnih aplikacijah (nega kože in potrošniški izdelki, zdravstvo, elektronika, fotonika, biotehnologija, farmacevtski izdelki, dostava zdravilnih učinkovin, kmetijstvo itd.) (Pregl. 2) (Wolfgang, 2004). Nanotehnologija prinaša s ponudbo novih izdelkov na trgu številne koristi za potrošnike kot tudi za gospodarski razvoj in poslovne dobičke. Optimističen pogled na tako učinkovit razvoj napoveduje novo industrijsko revolucijo v naslednjih desetletjih (Robichaud in sod., 2009).

Preglednica 2: Pregled uporabe nanomaterialov po različnih panogah (Wolfgang, 2004; National Nanotechnology Initiative, 2014).

PODROČJA UPORABE	PRIMER UPORABE
Avtomobilaska industrija	Senzorji, barve, gume, filtri, avtomobilski odbijači in katalizatorji
Kemična industrija Tehnika	Magnetne tekočine, impregnatorji papirja, premazni sistemi Zaščita pred obrabo za orodje in aparature, antikorozijske prevleke, razmaščevalci
Elektro industrija	Prikazovalniki, diode, optična vlakna, antistatične prevleke, tranzistorji, integrirana vezja, pomnilniki
Gradbeništvo	Konstruktivski materiali, toplotna izolacija, protipožarni zaviralci, samočistilne fasade in stekla
Medicina	Dostavni sistemi za zdravila, kontrastni mediji, implantati in proteze, dejavniki v terapiji raka, antimikrobne prevleke, biosenzorji
Tekstilna industrija	Površinsko obdelana oblačila, prevleke tkanin za šotore
Energetika	Sončne celice, baterije, kondenzatorji, gorivne celice
Kozmetika	Sončne kreme, zobne paste, kreme za kožo, šamponi
Hrana in pijača	Embalaza, aditivi, nanoprevleke za živila
Športna oprema	Očala, premazi za smuči, motoristične čelade, teniški loparji in žogice

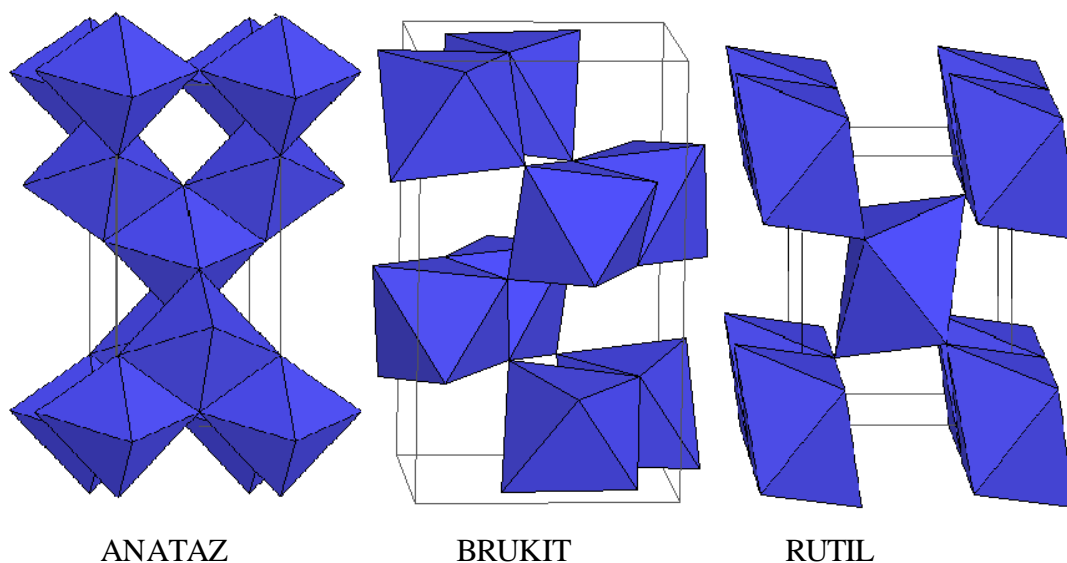
Zaradi vse večje proizvodnje in uporabe nanodelcev smo jim ljudje in okolje čedalje bolj izpostavljeni. To je lahko problematično, saj so iste lastnosti, zaradi katerih so nanodelci tako zanimivi, odgovorne tudi za njihove neželene toksične učinke. Številne študije v zadnjem desetletju so pokazale, da so nanodelci bolj toksični kot večji delci (Hart in Hesterberg, 1998; Gurr in sod., 2005; Karlsson in sod., 2009). Ta dejstva povečujejo zaskrbljenost javnosti, posameznikov in organizacij v zvezi z varnostjo uporabe nanodelcev in tveganj za zdravje. Tudi zakonodaja na tem področju je zelo neurejena. Regulatorni organi, kot so Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj (OECD; angl. Organisation

for Economic Co-operation and Development) in Evropska komisija, se zavedajo edinstvenih bioloških lastnosti nanodelcev in potencialnih tveganj pri njihovi uporabi. Zaradi pomanjkanja znanja o toksičnem potencialu nanodelcev in težav pri ocenah izpostavljenosti nanodelcem trenutno ni mogoče postaviti pravil, ki bi zagotovila varno uporabo produktov nanotehnologije.

2.2 TiO₂

Eden izmed najpogosteje uporabljenih nanodelcev je TiO₂. Le-ta velja za inerten in varen material (Chen in Fayerweather, 1988) v primerjavi z večino drugih nanodelcev. Je zelo slabo topen in titanovi (Ti; angl. titanium) ioni nimajo pomembnega toksičnega učinka (Hahn in sod., 2012). TiO₂ je tudi zelo raznolik material glede velikosti delcev, oblike, kristalne strukture, biološke dostopnosti in z ultravijolično svetlobo (UV; angl. ultraviolet irradiation) aktivirane fotokatalitske aktivnosti (Skočaj in sod., 2011; Nel in sod., 2006).

Kristalne oblike TiO₂ se v naravi pojavljajo v treh polimorfih: anatazu, rutilu in brukitu, pri čemer sta prvi dve obliki najpogosteje uporabljeni. Oblike se ločijo po svojih kristalnih simetrijah, po vzorcu zlaganja oktaedričnih verig in v zvitosti posameznih oktaedrov (Sl. 1). Rutilna oblika je najpogosteje preiskovana, saj se najpogosteje tvori pri kristalizaciji in koloidni kemični sintezi ter je najbolj stabilna oblika (Smyth in Bish, 1988; Skočaj in sod., 2011). Anatazna oblika TiO₂ ima v primerjavi z rutilno energijsko vrzel veliko 3.2 eV, medtem ko ima rutilna oblika veliko le 3.0 eV (Dounghong in sod., 1982). Razlikujeta se tudi v fotokatalitski aktivnosti, saj so delci anatazne oblike TiO₂ katalitično bolj aktivni od rutilne in tudi brukitne oblike (Miyagi in sod., 2004; Foster in sod., 2011).



Slika 1: Različne kristalne oblike TiO₂ (Smyth in Bish, 1988).

Poznavanje fizikalno-kemijskih lastnosti delcev TiO₂ je pomembno, saj le-te določajo biološke učinke na celice v *in vivo* in *in vitro* pogojih. Biološko aktivnost delca določa površinska reaktivnost, ki je pri manjših delcih TiO₂ večja v primerjavi z večjimi delci, poleg tega pa je odvisna tudi od oblike, strukture in površinskih karakteristik, kot so površina, naboj in površinske modifikacije ter stopnje aglomeracije (Oberdörster in sod., 2005; Handy in sod., 2008b). Na obnašanje delcev TiO₂ močno vpliva okolje, v katerem se nahajajo, saj delce pogosto dispergiramo v vodni raztopini. Stabilna disperzija predstavlja tekočino, kjer se delci zaradi Brownovega gibanja, temperature in koncentracije delcev gibajo in trkajo med seboj, toda po trkih ne ostanejo skupaj. Vendar pa so nanodelci nagnjeni k agregaciji v vodi, na kar vplivajo pH raztopine, ionska jakost, prisotnost organskih snovi ali drugih koloidov. Agregacijo delcev lahko povzroči povečanje ionske jakosti z dodatkom elektrolitov, kot je natrijev klorid (NaCl). Delci se lahko zaradi spremembe naboja na površini in zmanjšanja elektrostatskega odboja povežejo in zblížajo z van der Waalsovimi silami, hidrofobnimi interakcijami in elektrostatskim privlakom, kar vodi v aglomeracijo delcev (Handy in sod., 2008b; Jassby in sod., 2012). Aglomerati so namreč skupki delcev, ki so povezani s šibkimi vezmi, medtem ko so agregati skupki delcev, povezani z močnimi kemijskimi vezmi (Jiang in sod., 2009).

Stopnja agregacije, disperzibilnost in naboj se močno spremenijo pri prehodu iz vodne raztopine v medij s tkivno kulturo in proteini. Poleg tega je različen tudi vnos v celice,

znotrajcelična lokalizacija in zmožnost produkcije reaktivnih kisikovih zvrsti (angl. ROS; reactive oxygen species) (Xia in sod., 2006). Delci so dlje časa stabilni v serumu v primerjavi z vodnim medijem brez seruma, saj so v serumu proteini, ki prekrivajo nanodelce in težje pride do aglomeracije (Shukla in sod., 2011). Nasprotno ugotavljajo, da pride do povečane agregacije delcev v mediju v primerjavi z deionizirano vodo (Kim in An, 2012). Delci so lahko sterično stabilizirani s surfaktanti, kar preprečuje agregacijo, oziroma lahko delce dispergiramo z uporabo sonikacije, topil ali z mešanjem. Pri mešanju pride čez nekaj časa do ponovne agregacije, stabilni agregati delcev pa nastanejo kljub sonikaciji. Merjenje zeta potenciala kot funkcije pH-ja lahko predstavlja dobro napoved koloidne stabilnosti (Handy in sod., 2008b; Jassby in sod., 2012). Zeta potencial namreč odraža naboj na površini delca in je povezan z elektrostatskim privlakom, znižanje zeta potenciala pa povzroči agregacijo delcev (Hussain in sod., 2009; Borm in sod., 2006).

Za toksikološke raziskave je med drugim zelo pomembno razumevanje disperzijskih lastnosti delcev TiO₂, saj spremembe pomembno vplivajo na obnašanje delcev v okolju, interakcije z drugimi polutanti, kot tudi na vnos in distribucijo v organizmu (Handy in sod., 2008a). Vnos in nalaganje delcev TiO₂ v različnih delih celic, kot so vakuole, vpliva na obliko struktur, ki jo tvorijo delci in lahko povzroči še dodatno aglomeracijo (Zou in sod., 2013). Agregacija delcev TiO₂ je zelo pomembna, saj vpliva na reaktivnost delcev in produkcijo ROS v odvisnosti od agregacijske velikosti in strukture. Povečanje agregacije zmanjša nastajanje prostih hidroksilnih radikalov ($\cdot\text{OH}$) v vodnih raztopinah in pomembno vpliva na fotokatalitsko aktivnost. Tudi ostali dejavniki, kot so prevleke delcev, organske molekule ter ionske spojine, vplivajo na nastanek ROS in spremenijo vpliv delcev TiO₂ na celice (Jassby in sod., 2012). Od vseh naštetih spremenljivk je odvisna reaktivnost in interakcije delcev s celicami, poškodbe celičnih komponent, vnetni odziv, povzročanje oksidativnega stresa in antioksidativna aktivnost (Wamer in sod., 1997; Unfried in sod., 2007).

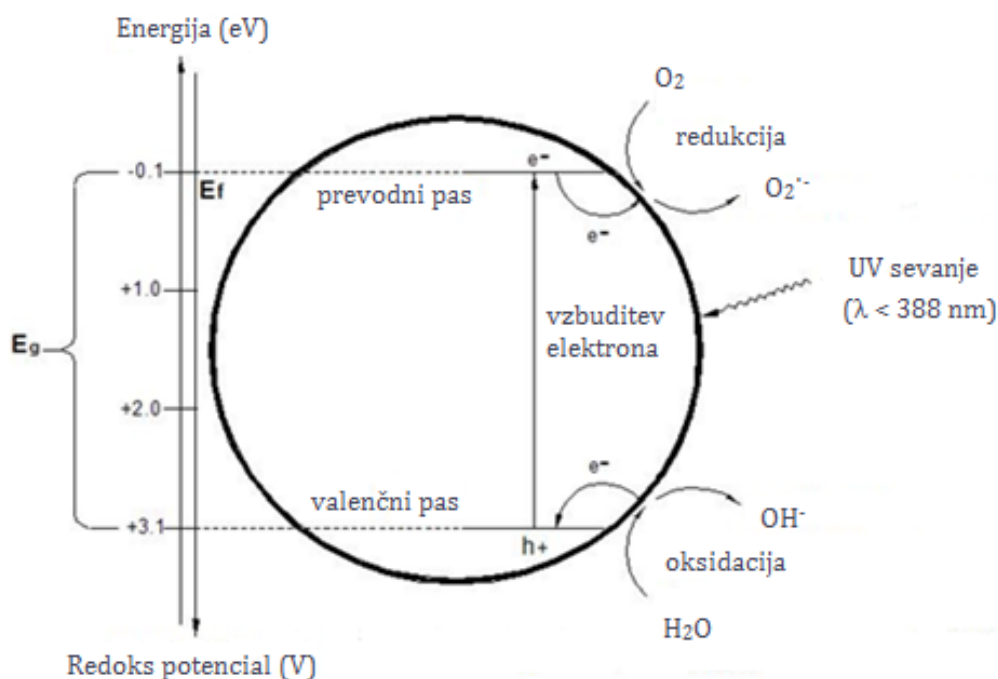
V zadnjih desetletjih se je uporaba TiO₂ razširila v številne produkte. TiO₂ v vidnem spektru svetlobe ne absorbira, ampak pride le do sipanja svetlobe, zaradi česar se lahko uporablja kot beli pigment v barvah, papirju in kozmetiki. Na površini delca TiO₂ pride do sipanja in absorpcije UV svetlobe ter s tem zmanjšanja UV sevanja, zaradi česar je njegova uporaba

zelo pogosta v sončnih kremah (Wamer in sod., 1997; Sayre in sod., 1990). Nekaj nanometrov debel sloj amorfne oblike TiO₂ se pogosto nahaja na površini ortopedskih in dentalnih vsadkov, narejenih iz titanija ali njegovih zlitin. V ZDA je Administracija za hrano in zdravila (FDA; angl. Food and Drug Administration) TiO₂ uvrstila na seznam neaktivnih sestavin za uporabo v zobni pasti, oralnih kapsulah, tabletah in preparatih za dermalno uporabo. TiO₂ je kot aditiv pod oznako E171 dovoljen v hrani in farmacevtskih produktih, čeprav nimamo zanesljivih podatkov o njegovi absorpciji, distribuciji, izločanju in toksičnosti v telesu (Skočaj in sod., 2011).

2.3 FOTOKATALITSKE LASTNOSTI TiO₂

Lastnosti delca TiO₂ se po obsevanju z UV svetlobo močno spremenijo. Kemično je TiO₂ stabilen le v temi in je aktiven, ko je obsevan z UV svetlobo. Na površini delca TiO₂ namreč pride do različnih fotokemičnih reakcij. Prva vključuje s svetlobo povzročeno redoks reakcijo absorbirane substance in druga s svetlobo povzročeno hidrofilno pretvorbo samega TiO₂ (Hashimoto in sod., 2005). Kljub temu, da TiO₂ absorbira le 5 % sončne svetlobe, ki doseže površje zemlje, je najboljši poznani polprevodnik na področju kemijske pretvorbe in shranjevanja sončne energije (Benedix in sod., 2000).

TiO₂ ima kljub svoji majhnosti, lastnosti podobne makroskopsko velikim materialom, zaradi česar ob obsevanju delcev pride do oksidacijsko-redukcijskih procesov in prenosa elektronov. Dounghong in sod. (1982) so prvi naredili poskus dinamike medfaznega prenosa elektronov iz polprevodnika na elektronski donor oziroma akceptor v raztopini. Ker je TiO₂ anorganski polprevodnik, absorpcija fotona ($h\nu$) z energijo enako ali večjo od energijske vrzeli v prepovedanem pasu polprevodnika povzroči prenos elektrona iz valenčnega pasu v prevodni pas in nastanek aktivnih parov elektron-vrzel (1) (e^-/h^+ ; angl. electron-hole pair). Delec TiO₂ ne absorbira v spektru vidne svetlobe, ampak pri valovni dolžini manjši od 388 nm, saj je energijska vrzel velika 3.2 eV (TiO₂ kristalna struktura anataz) (Sl. 2) (Dounghong in sod., 1982; Fox, 1983).



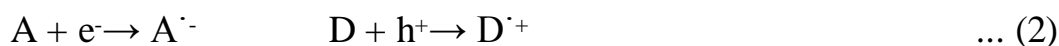
Slika 2: Shematski prikaz poteka reakcij na delcu TiO_2 po obsevanju z UV svetlobo (prirejeno po Yang Yang Zhang's Weblog, 2010).

Fotokatalizo tako aktivirata fluorescenčna svetloba in UV svetloba, ki jo razdelimo na UV-A (valovna dolžina od 320 – 400 nm), UV-B (valovna dolžina od 280 – 320 nm), UV-C (valovna dolžina od 200 – 280 nm) in ekstremno UV območje (valovna dolžina od 10 – 200 nm). Prav tako jo aktivirajo tudi žarki x z valovno dolžino < 10 nm, katerih uporaba v sistemih je energetsko ugodnejša od uporabe UV luči (Caballero in sod., 2009; Thomas in Stamnes, 1999; Namiki in sod., 2005). Fotokatalizo pa lahko sproži tudi vidna svetloba, če v TiO_2 z dopiranjem vnesemo dušik, žveplo ali druge kovinske in nekovinske ione (Livraghi in sod., 2006; Hashimoto in sod., 2005).

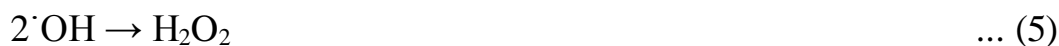
Če površino TiO_2 elektrode v elektrokemični fotocelici obsevamo s svetlobo valovne dolžine < 415 nm, molekule vode razpadejo na molekularni kisik (O_2 ; angl. oxygen) in vodik (H_2 ; angl. hydrogen) (Fujishima in sod., 2000). Produkcija H_2 predstavlja velik izziv, saj je učinkovitost procesa relativno nizka. To je posledica dejstva, da se 90 % nastalih e^- v prevodnem pasu in h^+ znotraj delca v času 10 ns ponovno rekombinira. Zaradi tega je učinkovitost razpada vode majhna, saj se mora razpad na O_2 in H_2 zgoditi prej kot v 10 ns. Produkcija O_2 se zgodi v sekundnem časovnem okvirju, medtem ko produkcija H_2 le v 10

ns, kar pomeni, da nastajanje O₂ določa hitrost razpada vode (Serpone in sod., 1995; Tang in sod., 2008).

Po obsevanju TiO₂ z dovolj veliko energijo delec preide v vzbujeno stanje. V takšnem stanju lahko nastali e⁻ reducira primerno elektron akceptorsko molekulo (A), medtem ko lahko nastala h⁺ oksidira donorsko molekulo (D) (2) (Dounghong in sod., 1982). Nastale h⁺ imajo veliko oksidacijsko moč in lahko reagirajo z vodo (H₂O) ter povzročijo nastanek [•]OH radikala (3). O₂ deluje kot akceptor pri fotokatalizi nastalih elektronov, pri čemer se tvori superoksidni anion (O₂^{•-}) (4) (Benedix in sod., 2000).



Fotoaktivirani delci TiO₂ sprožijo različne kemijske reakcije, ki lahko povzročijo tvorbo singletnega kisika (¹O₂) neposredno na površini delca TiO₂ v prisotnosti triplet stanja kisika (³O₂). Zelo pomemben povzročitelj oksidativnega stresa je tudi vodikov peroksid (H₂O₂), ki lahko nastane spontano (5) ali s katalizirano kemijsko reakcijo s superoksid dismutazo (SOD; angl. superoxide dismutase) (6) (Konaka in sod., 1999; Unfried in sod., 2007). Izpostavljenost delcem TiO₂ in UV-A sevanju povzroči kaskado reakcij, ki lahko vodijo v aktivacijo sintaze dušikovega oksida (NOS; angl. nitric oxide synthase). Aktivirana NOS povzroči produkcijo dušikovega oksidnega radikala (NO[•]), ki lahko reagira z O₂^{•-} in povzroči nastanek peroksinitrita (ONOO⁻) (7). ONOO⁻ je pomemben vnetni mediator, ki lahko poškoduje celice z oksidacijo ali nitracijo celičnih komponent (Klotz in Sies, 2003; Unfried in sod., 2007).





V zadnjih letih je fotokatalitska uporaba TiO₂ postala zelo zanimiva za industrijo in razvoj tehnologij za čiščenje vode in zraka. $\cdot\text{OH}$ in $\text{O}_2^{\cdot-}$, ki nastanejo po obsevanju TiO₂ z UV svetlobo, so močno reaktivne molekule, kar je lahko uporabno pri oksidaciji večine organskih onesnaževalcev. Fotokatalitska oksidacija se lahko uporablja za odstranjevanje onesnaževalcev zraka z uporabo v ventilatorjih, klimatskih napravah in čistilcih zraka, pri čemer nastane ogljikov dioksid (CO₂) in H₂O (Benedix in sod., 2000). Poleg tega fotokatalitsko aktivnost TiO₂ izkoriščajo številne aplikacije in sicer pri TiO₂ filmih, samočistilnih površinah in fotoreaktorjih za čiščenje onesnažene in odpadne vode (Fujishima in sod., 2000; Wamer in sod., 1997). Ireland in sod. (1993) so za čiščenje vode v reaktorju uporabili anatazno kristalno obliko delcev TiO₂. Zaradi oksidacijskega potenciala in neselektivne reaktivnosti TiO₂ je le-ta v naravnem vzorcu vode povzročil celično smrt kulture *Escherichia coli* (*E. coli*) in tudi smrt lokalnega avtohtonega rastlinstva. Ko TiO₂ izpostavimo UV-A svetlobi, le-ta postane močno reaktiven in deluje baktericidno (Ireland in sod., 1993). Mehanizem delovanja vključuje razgradnjo celične stene in citoplazemske membrane zaradi produkcije ROS in nastanka oksidativnega stresa, kar vodi v lizo celic (Foster in sod., 2011; Adams in sod., 2006). To je še posebej uporabno v bolnišnicah in zdravstvenih ustanovah ter v javnih ustanovah, šolah, kuhinjah, kopalnicah in pri čiščenju talnih površin za zagotavljanje higiene in preprečevanje širjenja infekcij (Pregl. 3) (Benedix in sod., 2000).

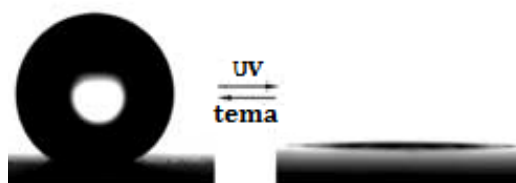
Potencialna aplikacija je tudi uporaba TiO₂ pri terapiji rakavih celic. Fujishima in sod. (2000) so pokazali, da se z injiciranjem delcev v tumor in obsevanjem tumorja z UV svetlobo rast tumorja opazno zmanjša, prav tako pa je obsevan TiO₂ povzročil smrt rakavih celic. Z *in vitro* izpostavitvijo rakavih celičnih linij delcem TiO₂ so dosegli zmanjšanje viabilnosti celic in celično smrt. Rezultati kažejo na to, da so delci TiO₂ potencialno uporabni za zdravljenje rakavih obolenj (Sha in sod., 2013). Vendar pa se pojavljajo še številna vprašanja in težave, ki jih bo potrebno rešiti pred splošno uporabo v medicini.

Preglednica 3: Uporaba fotokatalitskih lastnosti delcev TiO₂ (Fujishima in sod., 2008).

LASTNOST	UPORABA
Samočistilna funkcija	Steklene, plastične in aluminijaste površine, fasade in zidovi v tunelih, šotori, tekstil
Čiščenje zraka	Sobni in industrijski čistilci zraka, filtri, klimatske naprave
Čiščenje vode	Čiščenje pitne vode in odpadnih industrijskih voda
Sterilizacijska sposobnost	Antibakterijske ploščice za tla in zidove, uporaba v bolnišnicah

2.4 SUPERHIDROFILNOST

Med preiskovanjem samočistilnih funkcij materialov prekritih z delci TiO₂ so v 90. letih prejšnjega stoletja po obsevanju TiO₂ z UV svetlobo naključno odkrili še drugo lastnost, to je superhidrofilnost. Hidrofilnost površine ocenjujemo s kontaktnim kotom (CA; angl. contact angle), ki je definiran kot kót med površino in tangento tekoče faze na stičišču vodne, trdne in plinaste faze. Ko je površina izpostavljena UV svetlobi, pride do zmanjševanja kontaktnega kota in ko je kot 0 stopinj, pride do pojava superhidrofilnosti, pri čemer se kapljice vode zlijejo po površini (Sl. 3) (Hashimoto in sod., 2005; Benedix in sod., 2000). V tem procesu pride do izhajanja kisikovih atomov in nastanka vrzeli h⁺, kamor lahko gredo molekule vode in s tem naredijo površino hidrofilno. Dlje časa ko je površina z delci TiO₂ obsevana z UV svetlobo, bolj je hidrofilna in v približno 30 minutah je kontaktni kot med kapljico vode in površino nič, zaradi česar se voda popolnoma razlije po površini (Fujishima in sod., 2000). Po končanem obsevanju ostane površina hidrofilna še 1–2 dni, vendar se njena hidrofilnost s časom začne zmanjševati (Hashimoto in sod., 2005).



Slika 3: Prikaz superhidrofilnosti površine prekrute z delci TiO₂ ob izpostavljenosti UV sevanju svetlobe. Površina ima lastnost preprečevanja rošenja in s tem preprečuje dostop umazanije, ki je enostavno sprana z vodo (prirejeno po Feng in sod., 2005: 5117).

Fotokatalitska aktivnost in superhidrofilnost, ki sta različna procesa, lahko nastopata simultano na isti površini delca TiO₂. Tudi v primeru superhidrofilnosti pari elektron-vrzel (e^-/h^+) še vedno nastanejo, vendar delujejo v drugačni smeri. Elektroni težijo k temu, da reducirajo Ti(IV) katione v Ti(III) in vrzeli oksidirajo O²⁻ anione (Fujishima in sod., 2000). Superhidrofilnost je posledica strukturnih sprememb površine, saj se po obsevanju delcev z UV svetlobo h⁺ izpostavijo na površini. Večina teh h⁺ je adsorbiranih direktno z organskimi snovmi ali vodo, nekaj pa jih reagira s samim TiO₂, pri čemer pride do pretrganja vezi med TiO₂ in kisikovimi molekulami. Tovrstni fenomen je zelo uporaben pri preprečevanju rošenja stekel in ogledal, saj TiO₂ preprečuje nastanek drobnih kapljic vode in s tem rošenje stekel (Hashimoto in sod., 2005).

Ena od aplikacij uporabe TiO₂ je tudi samočistilna funkcija materialov prekritih s TiO₂, ki lahko deluje na principu superhidrofilne ali superhidrofobne površine. Superhidrofilna površina, ki nastane pri obsevanju površine prekrte z delci TiO₂, preprečuje nastanek vodnih kapljic na površini. Po približno dveh dneh po prenehanju obsevanja površine pa le-ta ponovno pridobi hidrofobne lastnosti. Superhidrofobna površina vodi preprečuje zlivanje s površino in povzroči nastanek vodnih kapljic. Na kapljice se lahko pritrdijo delci umazanije in so tako odstranjeni s površine. Učinek odbojnosti površine imenujemo Lotus Effect (Benedix in sod., 2000).

2.5 TiO₂ V SONČNIH KREMAH

Kožni rak je eden najpogostejših oblik raka v Republiki Sloveniji in ga med drugim povezujemo s čezmernim sončenjem (Slora, 2013). Prav zaradi tega je zelo pomembna zaščita kože pred škodljivimi UV žarki z različnimi sončnimi kremami. Zaščita kože je potrebna pred UV-A in UV-B svetlobo, UV-C žarki pa so skoraj popolnoma absorbirani v ozonski plasti (Popov in sod., 2005). Sončne kreme so zaščitni pripravki, ki vsebujejo filtre, ki ščitijo pred škodljivim delovanjem svetlobe. Ločimo jih na dve skupini: kemične in fizikalne. Kemični filtri imajo lastnost absorpcije UV žarkov, fizikalni pa zmanjšujejo sevanje svetlobe s sipanjem in odbijanjem vidne svetlobe in absorpcijo UV svetlobe. Eden najučinkovitejših in najpogosteje uporabljenih fizikalnih filtrov je ravno TiO₂. Nanodelci v sončnih kremah delujejo neselektivno in ščitijo pred širokim spektrom valovnih dolžin sončne svetlobe (Sayre in sod., 1990).

Na začetku uporabe delcev TiO₂ za zaščito pred UV sevanjem svetlobe so uporabljali delce podmikronske velikosti (200 – 500 nm). Omogočali so odboj vidne svetlobe, vendar so zaradi velikosti na koži puščali viden tanek sloj bele kreme. V zadnjih nekaj letih je trend v kozmetični industriji in industriji sončnih krem zamenjava TiO₂ mikro velikosti za nano velikost. Razvili in začeli so uporabljati kozmetično bolj sprejemljive sončne kreme z delci velikosti 10 – 50 nm, ki ne puščajo sledov bele barve in so pri nanosu na kožo nevidni (More, 2007; Tyner in sod., 2011). *In vitro* in *in vivo* analize faktorja zaščite sončnih krem (SPF, angl. sun protection factor) so pokazale, da imajo kreme z delci TiO₂ podmikronske velikosti (170 nm) nižjo vrednost SPF kot kreme z delci nano velikosti (20 nm) v istih koncentracijah. Višja vrednost SPF delcev nano velikosti je posledica nastanka več plasti aglomeratov delcev, zaradi česar se zmanjša površina nepokrite površine kože, kar predstavlja učinkovitejšo zaščito pred sončno svetlobo (Lin C. in Lin W., 2011). Kot najbolj učinkovita velikost delcev TiO₂ za zaščito pred UV-B svetlobo so se izkazali delci velikosti 62 nm (Popov in sod., 2005).

Povečana uporaba delcev TiO₂ nano velikosti je porodila številna vprašanja. Povečalo se je število preučevanj vpliva različnih formulacij TiO₂ v sončnih kremah na stabilnost produkta, potencialno škodljivost za kožo in zaščito pred UV svetlobo. Uporaba delcev TiO₂ v sončnih kremah vodi v izpostavitve kože in prav tako tudi pljuč, saj obstajajo tudi kreme za zaščito kože v sprejih (Karlsson in sod., 2009). Raziskave, ki so bile izvedene pri primerljivih pogojih kot pri izpostavitvi delcem TiO₂ v sončnih kremah, so pokazale, da so lahko delci TiO₂ toksični (Lin C. in Lin W., 2011). Sončne kreme, ki vsebujejo TiO₂, so obsevali s svetlobo valovne dolžine > 300 nm. Prišlo je do nastanka ROS, kot sta $\cdot\text{OH}$ in $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Brezová in sod., 2005). Nobena formulacija TiO₂ po izpostavitvi UV svetlobi pa ni poškodovala kože in povečala permeabilnosti ter zmanjšala zaščitne funkcije kože (Tyner in sod., 2011).

Pogosta tema diskusije je tudi prehajanje TiO₂ skozi kožo in prehod v kri ter prenos po telesu. Možne so tri poti prehoda delcev TiO₂ skozi kožo: intracelularna, intercelularna in folikularna. Pri slednji je majhna verjetnost prehoda, saj predstavljajo lasni mešički le 0,1 % celotne površine kože. Vendar pa so delce TiO₂ našli tudi znotraj lasnih mešičkov in tovrstnega prehoda delcev ne moremo popolnoma izključiti (Borm in sod., 2006). Koža je sestavljena iz treh plasti: vrhnjice, usnjice in podkožja. Roževinasta plast (SC; angl. stratum

corneum) je zunanja porožena plast kože, ki jo sestavljajo odmrle in keratinizirane celice, ter predstavlja bariero za prehod večine snovi (Hoet in sod., 2004). Nedavna raziskava je pokazala, da je prehod delcev TiO₂ skozi vrhnjico kože možen, saj so delci prehajali skozi 7 plasti poroženele neobsevane kože in kar 13 plasti globoko v kožo obsevano z UV-B svetlobo. Dokazali so prisotnost Ti v vrhnjici in zgornjih plasteh usnjice, vendar do prehoda skozi kožo ni prišlo (Monteiro-Riviere in sod., 2011). Nepoškodovana koža tako predstavlja dobro zaščito pred delci TiO₂, vendar pa se prehodnost kože lahko močno poveča pri poškodovani in opečeni koži ter drugih oblikah občutlivejše kože (Shi in sod., 2013).

Raziskovalci poskušajo razviti nove formulacije sončnih krem, ki bi predstavljale minimalno tveganje za zdravje ljudi, in bi hkrati imele visoko zaščito pred sevanjem svetlobe. Modifikacije površine delcev, kot sta prevleka delca in obdelava površine, imajo lahko za posledico manj toksične delce, poleg tega delci dispergirani v vodnih sistemih lahko tvorijo agregate različnih velikosti in struktur, kar močno vpliva na citotoksičnost nanodelcev (Borm in sod., 2006; Hsiao in Huang, 2011). TiO₂ je za uporabo v sončnih kremah pogosto prevlečen, da se zmanjša njegova reaktivnost, medtem ko obdrži lastnosti absorpcije UV svetlobe (Nel in sod., 2006). Raziskave uporabe nanokapsul, v katerih so zapakirani delci TiO₂, so se izkazale za zelo uspešne. Delci TiO₂, ki so jih zapakirali v kapsule iz hitosana, so se na površini kože bolje razporedili. Nanokapsule z delci TiO₂ so bile velike 30 – 80 nm in so predstavljale visoko zaščito (95 %) pred UV-A in UV-B sončno svetlobo (Chung in sod., 2010). Majhni, neaglomerirani, enakomerno razporejeni delci TiO₂, ki so stabilizirani s slojem aluminijevega hidroksida, omogočajo boljšo zaščito kože pred UV svetlobo zaradi okrepljene absorpcije in sipanja svetlobe (Tyner in sod., 2011).

Izpostavljenost sončni svetlobi je povezana z razvojem številnih bolezni in stanj, kot so kancerogeneza, staranje in preobčutljivost, zaradi česar je zelo pomembna zaščita pred sončno svetlobo (Lin C. in Lin W., 2011). Hkrati pa zaradi pomanjkljivega poznavanja mehanizmov toksičnega delovanja delcev TiO₂ ne moremo z gotovostjo trditi, da je uporaba sončnih krem z delci TiO₂ ob obsevanju z UV svetlobo popolnoma varna.

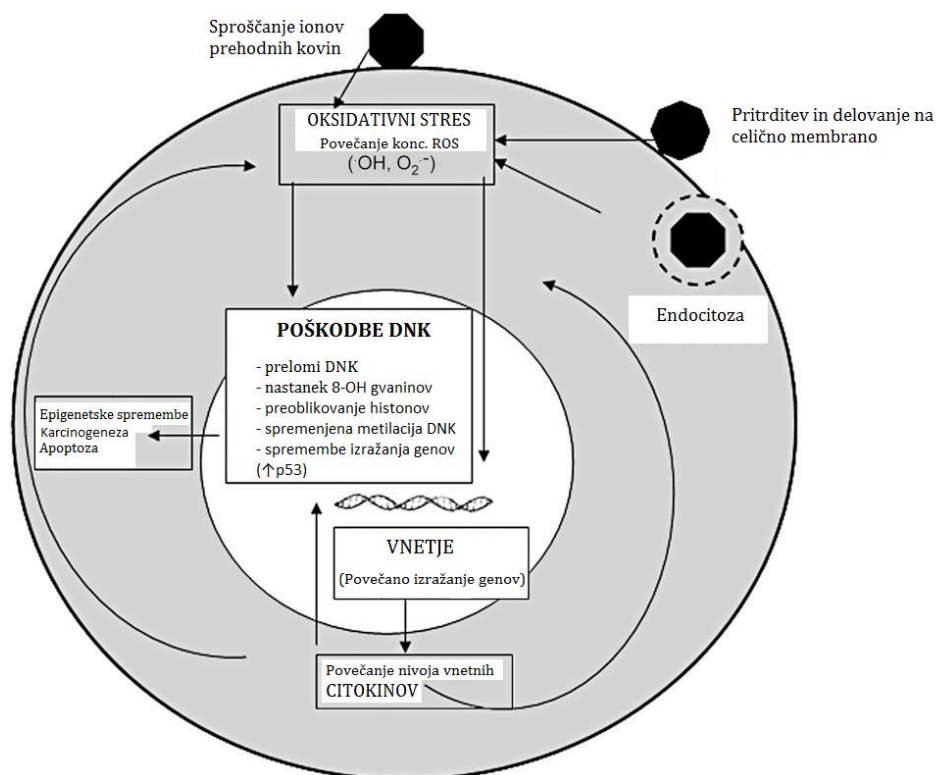
2.6 TOKSIČNO DELOVANJE DELCEV TiO₂

Zanimive lastnosti delcev TiO₂, zaradi katerih je njihova proizvodnja in uporaba vse večja, so hkrati lahko odgovorne za njihove neželene toksične učinke. Vendar pa je vseeno trajalo nekaj časa do pojava dvomov glede morebitnih zdravstvenih in okoljskih posledic nanotehnologije. Število publikacij, ki proučujejo potencialne negativne učinke nanodelcev, od takrat narašča, vendar ti rezultati ne zadoščajo za njihovo oceno tveganja. Vzrok predstavljajo predvsem izjemna raznolikost in nepredvidljivost lastnosti nanodelcev ter posledično tudi nepredvidljivost interakcij nanodelcev s celicami in tkivi. Rezultati številnih *in vitro* in *in vivo* študij so nasprotujoči in jih je zaradi nezadostne karakterizacije fizikalno-kemijskih lastnosti delcev TiO₂ težko razložiti.

Delci TiO₂ se nahajajo v hrani, kozmetiki in tudi v drugih proizvodih, zaradi česar smo ljudje z njimi pogosto v stiku in lahko le-ti tudi vstopajo v naše telo. Delcem TiO₂ smo lahko izpostavljeni pri vdihavanju, saj lahko enostavno vstopijo v pljučno tkivo. Drugi načini vključujejo vstop skozi kožo, ali oralno, možen pa je tudi sistemski vnos za diagnostične in terapevtske namene. Po vstopu v telo se delci TiO₂ hitro razporedijo po telesu na mesta, kjer prihaja do interakcij z biološkim okoljem. Hkrati pa so le-ti v tkivih in organih izpostavljeni številnim obrambnim mehanizmom, ki jih poskušajo odstraniti ali zadržati (Shi in sod., 2013; Wolfgang, 2004; Nel in sod., 2006). Delci TiO₂ se lahko nalagajo v različnih tkivih in organih, kot so jetra, ledvica, vranica in pljuča. V pljučih so prepoznani in odstranjeni s strani imunskih celic, kot so makrofagi, monociti, levkociti in dendritične celice. V primeru vlaknaste oblike delcev velikosti > 20 μm, ki jih makrofagi ne morejo fagocitirati, le-ti niso odstranjeni iz dihal in povzročajo morfološko toksičnost, ki lahko pri dolgotrajni izpostavljenosti vodi celo v nastanek raka (Li in sod., 2010b; Geiser in sod., 2008; Oberdörster, 2002).

Delci TiO₂ lahko zaradi svoje velikosti in reaktivnosti vstopajo v celice z aktivnim transportom z endocitozo ali s pasivnim transportom z difuzijo in tudi z adhezivnimi interakcijami (Skočaj in sod., 2011; Geiser in sod., 2005). Mehanizem vnosa v celice je odvisen od fizikalno-kemijskih lastnosti delcev TiO₂, kot so kemijska sestava, velikost, oblika in stopnja aglomeracije ter tarčnih celic, to je celičnega tipa in diferenciacijske stopnje

(Unfried in sod., 2007). Raziskave so pokazale, da manjši delci TiO₂ velikosti od 30 – 100 nm lahko prehajajo celično membrano, medtem ko večji delci > 500 nm ostanejo na zunanji strani celice in se lahko pritrdijo na membrano (Shukla in sod., 2011). Ko so delci TiO₂ enkrat v celici, imajo neposreden dostop do znotrajceličnih organelov, lahko se vežejo na različne receptorje, proteine in vplivajo na delovanje encimov. Z vezavo na proteine lahko spremenijo njihovo konformacijsko strukturo, aktivnost in tudi funkcijo. V krvi lahko s proteini potujejo po telesu do organov, kot so jetra, ledvica, srce, vranica in možgani (Handy in sod., 2008b; Geiser in sod., 2005; Borm in sod., 2006). Lahko pa skozi jedrne pore (NPC; angl. nuclear pore kompleks) vstopijo v jedro in neposredno preko fizičnih interakcij povzročijo spremembo sekundarne strukture DNK, prelome molekul DNK in kromosomske spremembe, ki jih zaznamo z nastankom mikronukleusov (Panté in Kann, 2002; Li in sod., 2010a; Rahman in sod., 2002). Poleg tega lahko delci TiO₂ posredno delujejo na DNK in druge komponente celic z nastankom ROS in oksidativnih poškodb. Oksidativni stres je verjetno osnovni mehanizem toksičnosti nanodelcev TiO₂ (Sl. 4), kar so potrdile številne raziskave pri različnih testnih pogojih (Pregl. 4). Do nastanka ROS pride zaradi majhne velikost delcev TiO₂ in velike specifične površine ter drugih fizikalno-kemijskih lastnosti delcev (Oberdörster in sod., 2007; Nel in sod., 2006). Pri nekaterih nanodelcih in tudi pri Ti pride do sproščanja ionov prehodnih kovin, ki povzročajo pretvorbo kisikovih metabolnih produktov v celici v \cdot OH radikale. \cdot OH veljajo za ene glavnih povzročiteljev poškodb DNK (Singh in sod., 2009).



Slika 4: Mehanizmi delovanja delcev TiO₂ na celico, ki lahko povzročijo oksidativni stres ali vnetni odziv, ter posledično poškodujejo DNK in spremenijo izražanje genov (prirejeno po Singh in sod., 2009: 3901).

Tarče delovanja ROS so tudi plazemska membrana in lipidna peroksidacija nenasičenih lipidov, encimski kompleksi, mitohondrij in endoplazemski retikulum (Li in sod., 2010b; Unfried in sod., 2007). Zaradi vpliva delcev TiO₂ lahko pride do sprememb v delovanju mnogih procesov, kot so elektronska transportna veriga, mitohondrijski membranski potencial, regulacija količine Ca²⁺ (kalcijevi ioni) in celične signalizacije (Nel in sod., 2006; Park in sod., 2008). Celice se ob izpostavitvi delcem TiO₂ branijo z aktivacijo antioksidativnega sistema, pri čemer ima glavno vlogo glutation, ki je glavna obramba pred DNK poškodbami. Ko produkcija ROS preseže njihovo odstranjevanje, antioksidativna obramba ne zadostuje več in oksidativni stres v celici povzroči zmanjšano rast celic in motnje mitohondrijskega delovanja. Hkrati pa lahko delci TiO₂ povzročijo oksidativni stres z vplivom na antioksidativne obrambne sisteme in zmanjšajo učinkovitost odstranjevanja ·OH (Zou in sod., 2013; Petković in sod., 2011b).

Preglednica 4: Primeri raziskav, ki so pokazali vpliv delcev TiO₂ različnih kristalnih struktur in velikosti na oksidativni stres v različnih celicah in organizmih.

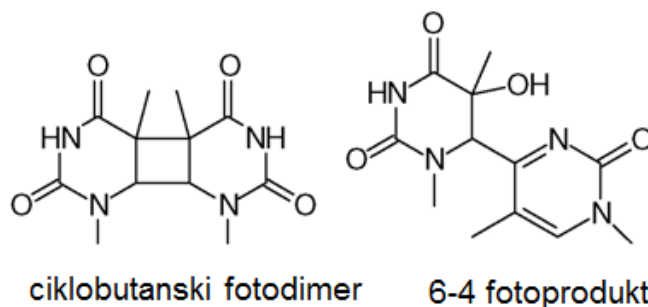
Vir	Kristalna struktura, velikost delcev	Testirana celična linija/organizem	Rezultati
Gurr in sod., 2005	TiO ₂ anataz (10, 20, > 200 nm) in TiO ₂ rutil (200 nm)	Bronhialne epiteljske celice (BEAS-2B)	- delci TiO ₂ (10 in 20 nm) so povzročili poškodbe DNK, lipidno peroksidacijo, nastanek mikronukleusov in nastanek H ₂ O ₂ in NO - TiO ₂ anataz (200 nm) z razliko od TiO ₂ rutil (200 nm) niso povzročili nastanka oksidativnih poškodb DNK
Park in sod., 2008	P25 Degussa TiO ₂ , (21 nm)	Bronhialne epiteljske celice (BEAS-2B)	- od koncentracije odvisno povečanje ROS, zmanjšanje znotrajcelične koncentracije GST in zmanjšanje preživetja celic - povečanje koncentracije mediatorjev vnetja ter nastanek apoptoze
Sayes in sod., 2006	100 % TiO ₂ anataz (10 nm) 60 % anataz in 40 % TiO ₂ rutil (5,2 nm)	Kožni fibroblasti (HDF) in pljučne epiteljske celice (A549)	- od časa in koncentracije odvisno zmanjšanje preživetja celic - TiO ₂ anataz so zmanjšali mitohondrijsko aktivnost in povzročili nastanek večje količine ROS v primerjavi s TiO ₂ rutil
Shukla in sod., 2011	99,7 % TiO ₂ anataz (5 nm)	Epidermalne celice (A431)	- nastanek ROS in oksidativnega stresa - nastanek mikronukleusov in povečanje lipidne peroksidacije
Trouiller in sod., 2009	P25 Degussa TiO ₂ , (21 nm)	Laboratorijske miške- <i>in vivo</i> (C57Bl/6Jp ^{un} /p ^{un})	- nastanek mikronukleusov, prelomov in delecij DNK v celicah kostnega mozga in krvi ter v embrijih brejih mišk - oksidativni stres in vnetni odziv, kar kaže na sistemski vpliv

*GST- glutation S-transferaza (angl. glutathione S-transferase)

Zadnje raziskave kažejo, da imajo z nanodelci povzročene reakcije z radikali pomembno vlogo v iniciaciji in napredovanju rakavih ter drugih obolenj. Oksidativni stres in nastali ROS imajo lahko za posledice mutacije, spremembe celične proliferacije, aktivacije transkripcijskih dejavnikov, spremembe izražanja onkogenov in tumor supresorskih genov, kot je p53, ter indukcijo apoptoze, delitve poškodovanih celic in karcinogenezo (Shi in sod., 1998; Nel in sod., 2006). Oksidativni stres lahko povzroči poleg celičnih poškodb in genotoksičnosti tudi vnetje in aktivacijo imunskega sistema. Aktivacija makrofagov povzroči sproščanje mediatorjev vnetja in nastanek ROS, kar posledično pripelje do vnetja in poškodb tkiva. Oksidativni stres je tako vpleten v patogenezo številnih bolezni, vključno s staranjem, arterosklerozo, karcinogenezo ter akutnim in kroničnim vnetjem (Skočaj in sod., 2011; Gurr in sod., 2005; Hoet in sod., 2004). Delci TiO₂ lahko spremenijo izražanje apoptotskih genov in njihovih proteinov in sprožijo apoptozo celic preko mitohondrijske poti (Li in sod., 2010b). Vloga mitohondrija pri apoptozi je povezana s povečano sintezo NO, izgubo membranskega potenciala, nastankom nefunkcionalnega mitohondrija, sproščanjem citokroma c in odprtjem napetostno odvisnega anionskega kanala zunanje mitohondrijske membrane (Cadenas, 2004; Park in sod., 2008).

Glede na čedalje večjo uporabo fotokatalitsko aktiviranega TiO₂ moramo upoštevati tudi potencialno škodljivo delovanje delcev TiO₂ v takšni obliki. Študije so pokazale, da je TiO₂ v prisotnosti UV svetlobe bolj toksičen za celice kot neobsevan TiO₂ ter povzroča večje poškodbe molekul DNK. Reeves in sod. (2008) so pokazali, da so toksični učinki anataznih delcev TiO₂ (5 nm) najverjetneje posledica nastanka [•]OH radikalov. Celice so izpostavili delcem TiO₂ in jih obsevali z UV svetlobo. Ugotovili so, da je prišlo do poškodb DNK in kromosomskih aberacij. Poškodbe delovanja delcev in sevanja pa so odvisne od koncentracije TiO₂ in intenzitete sevanja. Tudi Rahman in sod. (2002) so pokazali, da so UFP TiO₂ (≤ 20 nm) fotogenotoksični in povzročajo kromosomske spremembe, ki jih lahko zaznamo z nastankom mikronukleusov ter nastankom celične apoptoze. Ob izpostavljenosti anataznim delcem TiO₂ (0,45 μm) in UV-A svetlobi so Wamer in sod. (1997) opazili tudi hidroksilacijo gvaninov molekul RNK (angl. ribonucleic acid). Hkrati pa niso zaznali nobenih oksidativnih poškodb celične DNK, kar kaže na to, da so molekule RNK bolj občutljive na oksidativne poškodbe, verjetno zaradi njihove lokalizacije v citoplazmi (Wamer in sod., 1997).

Pri tovrstnih raziskavah težko določimo, kolikšen je dejanski škodljivi vpliv obsevanih delcev TiO₂, saj so tudi same celice izpostavljene UV svetlobi. Obsevanje celic z UV svetlobo ima namreč številne negativne vplive. V celicah povzroča bazne modifikacije, pirimidinske dimere, prelome verig ter nastanek fotoproduktov. Fotoprodukta, ki najpogosteje vodita v nastanek mutacij, sta 6-4 fotoprodukt (angl. pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproduct) in ciklobutanski pirimidinski fotodimer (CPD; angl. cyclobutane pyrimidine dimer) (Sl. 5), pri čemer se kovalentno spojita dva pirimidinska ostanka (timin ali citozin), ki sta na sosednjih mestih v isti verigi dvoverižne molekule DNK. UV svetloba pogosto povzroči tudi oksidacijo gvanina in nastanek 8-okso gvanina, ki je posledica oksidativnega stresa (Cadet in sod., 2005; Kielbassa in sod., 1997).



Slika 5: Kemični strukturi z UV svetlobo povzročenih fotoproduktov v celicah (prirejeno po Cadet in sod., 2005: 4).

Število raziskav, v katerih so delce TiO₂ pred-obsevali in s tem izključili neposreden vpliv UV svetlobe na celice, je majhno. Petković in sod. (2011a) so prvi dokazali povečano citotoksično in genotoksično delovanje z UV svetlobo pred-obsevanih anataznih delcev TiO₂ na celice HepG2 v primerjavi z neobsevanimi delci. Vpliv z UV-A in UV-B svetlobo pred-obsevanih delcev (obsevali 20 minut) TiO₂ so preučevali tudi Kim in An (2012) na bakterijah *E. coli* in *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*). V tem primeru delci TiO₂ niso vplivali na rast teh bakterij in niso imeli toksičnega učinka v primerjavi s kontrolo. Ravno nasprotno pa so ugotovili Tatsuma in sod. (2003), ki so z UV svetlobo obsevali film TiO₂-WO₃. Po končanem obsevanju je namreč v temi zaradi nastalega H₂O₂ prišlo do zmanjšanja preživetja bakterij *E. coli*. Vendar je bil v tem primeru v neposredni bližini TiO₂ prisoten volframov oksid (WO₃), ki je shranil energijo, saj so se ob obsevanju nastali e⁻ prenesli na WO₃ in kasneje povzročili nastanek radikalov (Tatsuma in sod., 2003).

Zelo malo pa je znanega o trajanju toksičnih učinkov pred-obsevanih delcev TiO₂ na celice. Fotoaktivirani delci TiO₂, ki so bili podnevi izpostavljeni sončni svetlobi, imajo potencial, da ponoči v temi delujejo škodljivo na organizme v zemlji (Kim in An, 2012). Po 12-urnem obsevanju enoceličnih evkariontskih organizmov *Tetrahymena pyriformis* (*T. pyriformis*) izpostavljenih nizki koncentraciji delcev TiO₂ anataz (25 nm) z vidno svetlobo in nato 6-urni inkubaciji v temi so zaznali povečano aktivnost SOD. Rezultati kažejo na to, da je bil antioksidativen sistem aktiven in so delci še vedno imeli toksičen potencial tudi po prenehanju obsevanja (Zou in sod., 2013). Vendar pa so potrebne nadaljnje raziskave za ugotavljanje škodljivega delovanja pred-obsevanih delcev, določitev mehanizmov v toksičnosti in časa škodljivega delovanja tudi po končanem obsevanju.

Razlike v rezultatih med posameznimi raziskovalnimi skupinami niso nujno povezane z različnimi uporabljenimi metodami, ampak so lahko vzrok različna velikost delcev, različne pripravljalne metode (npr. sonikacija), stopnja agregacije in pogoji inkubacije. Razlike v rezultatih so lahko tudi posledica razlik v metabolni aktivnosti, kapacitivnosti antioksidativnih encimov in popravljalnih mehanizmih celic (Reeves in sod., 2008). Poleg tega so delci TiO₂ v številnih publikacijah slabo karakterizirani. Pomanjkanje podatkov o fizikalno-kemijskih lastnostih delcev TiO₂ in heterogenost določenih parametrov vodi v neprimerljivost različnih študij. Določitev lastnosti delcev (velikost, distribucija velikosti, masna koncentracija, kemijska sestava, specifična površina, morfologija, površinska reaktivnost, zeta potencial, sposobnost tvorbe agregatov/aglomeratov itn.) je nujno potrebna ne le za opredelitev toksičnosti, ampak tudi za izboljšanje lastnosti nanomaterialov pri uporabi v različnih aplikacijah (Iavicoli in sod., 2011). Neprimerljivost študij in težavna interpretacija so težave, ki se pojavljajo na celotnem področju nanotoksikologije. Zato se v zadnjih letih veliko dela na področju razvoja standardnega protokola, tako na področju pripravljanja raztopine nanodelcev, kot tudi na področju standardnega protokola za izpostavitve testnega sistema. Standardizacija omenjenih postopkov bo zelo pripomogla k boljši primerjavi rezultatov različnih raziskovalnih skupin kot tudi lažji interpretaciji študij (Reeves in sod., 2008).

Kljub temu da so delci TiO₂ obravnavani kot inerten in varen material, številne omenjene raziskave potrjujejo, da imajo lahko negativne učinke na organizme *in vitro* in *in vivo*

(Trouiller in sod., 2009; Gurr in sod., 2005; Li in sod., 2010b). Na podlagi teh rezultatov je Mednarodna agencija za raziskave raka (IARC, iz ang. International Agency for Research on Cancer) leta 2006 preklasificirala nanodelce TiO₂ iz skupine nenevarnih materialov v skupino 2B karcinogenov, kar pomeni "možno karcinogeni za ljudi" pri inhalacijski izpostavljenosti (IARC, 2006). Prav tako je Ameriški Nacionalni inštitut za poklicno varnost in zdravje (NIOSH, iz ang. National Institute for Occupational Safety and Health) nanodelce TiO₂ opredelil kot možno karcinogene pri poklicni izpostavljenosti. NIOSH je zapisal priporočila in določil meje izpostavljenosti za FP (1.5 mg/m³) in UFP (0.1 mg/m³) pri povprečni izpostavljenosti 10 ur na dan in 40 ur na teden. To priporočilo predstavlja nivo, ki zmanjša tveganje za razvoj raka pljuč v obdobju zaposlitve na manj kot 1:1000 (NIOSH, 2005).

Nanotehnologija in uporaba delcev TiO₂ sta omogočili napredek na številnih področjih. Še vedno se odpira veliko možnosti uporabe in novih aplikacij, ki jim bomo priča že čez nekaj let. Hkrati pa obstaja tudi druga plat uporabe delcev, zaradi katere se postavljajo številna vprašanja, predvsem glede varne uporabe za ljudi, živali in tudi vpliv na okolje. Veliko je bilo že narejenega za ugotavljanje škodljivega delovanja delcev TiO₂, veliko pa bo še potrebno narediti, da bomo lahko natančno določili tudi škodljive učinke le-teh. Le na ta način se bomo lahko zaščitili pred njihovim toksičnim delovanjem in s tem obvarovali svoje zdravje.

3 MATERIALI IN METODE

Eksperimentalno delo je potekalo na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka na Nacionalnem inštitutu za biologijo v Ljubljani.

3.1 MATERIALI

3.1.1 Laboratorijska oprema

Preglednica 5: Uporabljena laboratorijska oprema navedena skupaj s proizvajalcem

LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Aparatura za gelsko elektroforezo POWER PAC 3000	BIO-RAD, ZDA
Avtomatske pipete in nastavki (0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl)	Biohit, Finska
Brezprašna komora	EHRET, Nemčija
Brizge (10 ml)	Becton, Dickinson and Company, ZDA
Bürker-Türkova ploščica	BLAU BRAND, Nemčija
Centrifugirke (1,9 ml, 15 ml, 50 ml)	Corning, ZDA
Centrifuga MINI SPIN	Eppendorf, Nemčija
Centrifuga PLC-322	Tehtnica d.d., Slovenija
Črno-bela kamera za slikanje jeder MARLIN	ALLIED Vision Technologies, Nemčija
Čitalec mikrotiterskih plošč	Synergy MX, BioTek, ZDA
Digestorij	Köttermann, Nemčija
Elektroforezna kadička SUB-CELL GT	BIO-RAD, ZDA
Filtri (0,22 µm)	Corning Incorporated, ZDA
Fluorescentni mikroskop ECLIPSE E800	NIKON, Japonska
Grelnik z mešalom ROTAMIX SHP-10	Tehtnica d.d., Slovenija
Hladilnik (4 °C)	Zanussi, Anglija
Inkubator	Sanyo, Japonska
Krovna stekelca	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Nemčija

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 5. Uporabljena laboratorijska oprema navedena skupaj s proizvajalcem

LABORATORIJSKA OPREMA	PROIZVAJALEC
Magnetna mešala	IKA, ZDA
Mikrotitrna plošča z 96 vdolbinicami	Corning Incorporated, ZDA
Mikrovalovna pečica MP1278	Gorenje, Slovenija
Peskana objektna stekelca	Surgipath, Združeno kraljestvo
pH meter	WTW, Nemčija
Pipetboy	IBS Integra Bioscience, Švica
Plastenke za shranjevanje (250 ml)	Corning Incorporated, ZDA
Plastenke za gojenje celičnih kultur (T75, T25)	Corning Incorporated, ZDA
Plošče za gojenje celic z 12 vdolbinicami (3513)	Corning Incorporated, ZDA
Računalniški program Comet Assay IV	Perspective instruments, Velika Britanija
Računalniški program GraphPad Prism 3.02	GraphPad Software, ZDA
Računalniški program Excel	Microsoft, ZDA
Računalniški program Magellan	GENios, Švica
Stripete	Corning Incorporated, ZDA
Svetlobni mikroskop BF-DSSS	REICHERT, ZDA
Tehtnica EXACTA 610 EB	Tehtnica d.d., Slovenija
Ultrazvočna kad Sonorex	Bandelin electronic, Nemčija
UV- inkubator s hlajenjem I-265 CK UV	Kambič, Semič, Slovenija
UV- žarnica ULTRA VITALUX 300W	Osram, Nemčija
Vacuboy	IBS Integra Bioscience, Švica
Vibracijski mešalnik MS 3 digital	IKA, ZDA
Vodna kopel (37 °C)	The Precision Scientific, Indija
Zamrzovalnik (-20 °C)	Gorenje, Slovenija
Zamrzovalnik (-80 °C)	AS (Angelantoni Scientifica), Belgija
Žarnica (G2A) HB-10104 AF	Nikon, Japonska

Poleg zgoraj naštetih laboratorijskih opreme pa smo uporabljali tudi steklene čaše, bučke Erlenmeyer, laboratorijske steklenice z zamaškom, steklene valje, plinski gorilnik, pincete, spatule, žlice z lopatico in škarje.

3.1.2 Kemikalije

Preglednica 6: Uporabljene kemikalije navedene skupaj s proizvajalcem in kataloško številko

KEMIKALIJA	PROIZVAJALEC	KAT. ŠT.
BaP (Benzo[a]piren)	SIGMA-ALDRICH, Nemčija	B1760
BSA (Goveji serumski albumin)	SIGMA, ZDA	A9418
Raztopina pufra s pH 7,0	FLUKA, Švica	33646
Raztopina pufra s pH 10,0	FLUKA, Švica	33649
D-Glukoza monohidrat	SIGMA-ALDRICH, Nemčija	16301
dH ₂ O (destilirana voda)	NIB, Slovenija	
DMSO (Dimetil sulfoksid ≥ 99,9 %)	SIGMA-ALDRICH, Nemčija	154938
Dulbecco's PBS 10-kratni (Fiziološka raztopina v fosfatnem pufri)	PAA, Avstrija	H15-011
EDTA (Etilendiaminotetraetanojska kislina, 99 %)	SIGMA, ZDA	E5134
EtdBr (Etidijev bromid)	Gibco BRL, Škotska	15585-011
EtOH (Etanol)	SIGMA, ZDA	E7148
FBS (Serum govejega zarodka)	SIGMA, ZDA	F-0392
HEPES (4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kislina ≥ 99,5 %)	SIGMA, ZDA	H4034
KCl (Kalijev klorid)	FLUKA, Švica	60130
KOH (Kalijev hidroksid)	SIGMA-ALDRICH, Nemčija	P5958
L-glutamin (200 mM)	PAA, Avstrija	M11-006
LMP Agaroz (Agaroz z nizko točko tališča)	Invitrogen, ZDA	15517-022
MEM (Minimalni esencialni medij)	SIGMA, ZDA	M5650
MEM NEAAS (100-kratna raztopina neesencialnih aminokislin)	SIGMA, ZDA	M7145
MeOH (metanol)	SIGMA, ZDA	M1775

se nadaljuje

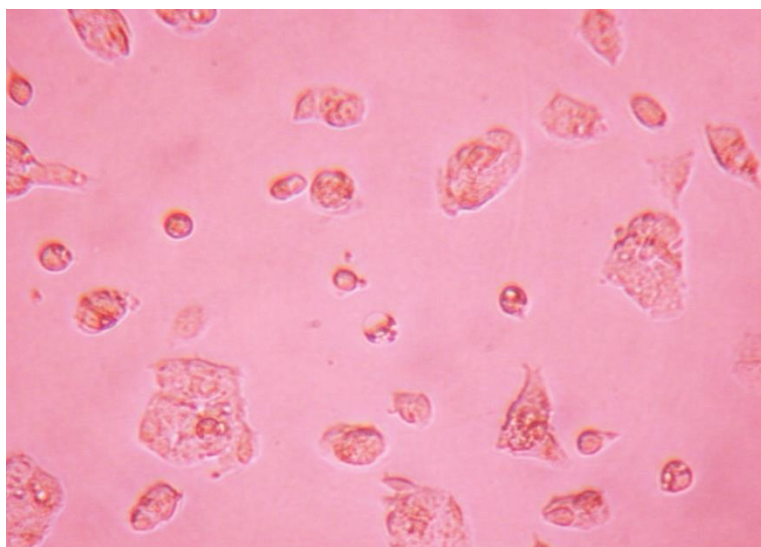
nadaljevanje preglednice 6. Uporabljene kemikalije navedene skupaj s proizvajalcem in kataložko številko

KEMIKALIJA	PROIZVAJALEC	KAT. ŠT.
MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid)	SIGMA, ZDA	M-5655
NaCl (Natrijev klorid)	MERCK, Nemčija	1.06404.1000
NaHCO ₃ (Natrijev hidrogen karbonat)	SIGMA-ALDRICH, Nemčija	S5761
NaOH (Natrijev hidroksid)	MERCK, Nemčija	1.06482.1000
NMP Agaroz (Agaroz z normalno točko tališča)	Invitrogen, ZDA	16500-100
Penicilin/Streptomicin 100-kratni	PAA, Avstrija	P11-010
tBOOH (tert-Butil hidroperoksid, 70 wt % vode)	ALDRICH, Nemčija	458139
TiO ₂ -B (Titanov (IV) oksid)	SIGMA, ZDA	T8141
TiO ₂ -N (Titanov (IV) oksid, nanodelci, < 25 nm, 99,7 % kovinska osnova)	SIGMA, ZDA	637254
Tris (2-amino-2-(hidroksimetil)-1,3-propandiol)	MERCK, Nemčija	1.08382.1000
TRITON X-100 (Polietilen glikol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil eter)	FLUKA, Švica	93420
Tripansko modro	SIGMA, ZDA	T-8154
Tripsin	SIGMA, ZDA	T-4174

3.1.3 Celična kultura HepG2

Celična linija HepG2 (Sl. 6) je bila leta 1972 izolirana iz primarnega hepatoblastoma 11 let starega argentinskega dečka (Aden in sod., 1979). Celice so epiteljskega tipa in izločajo različne proteine plazme, kot je albumin, transferin in plazminogen. Celice HepG2 se uporabljajo za preučevanje metabolizma v jetrih, študije citotoksičnosti in genotoksičnosti ksenobiotikov ter tarčne dostave zdravil (Altogen Biosystems, 2013). Citotoksičnost je definirana kot strupenost za celice, genotoksičnost pa je lastnost strupov, da okvarijo gene s poškodbo DNK (Slovenski medicinski slovar, 2014). Glede na to, da so jetra

najpomembnejši organ za metabolizem ksenobiotikov in drugih snovi pri sesalcih, se celice izolirane iz jeter najpogosteje uporabljajo za genotoksikološke študije. V te namene se na celicah HepG2 uporabljajo metode, kot sta mikronukleusni test in test komet (Knasmüller in sod., 1998).



Slika 6: Posnetek celic HepG2 (100-kratna povečava; fotografirala J. Nunić).

Celice HepG2 imajo številne prednosti pred drugimi *in vitro* celičnimi sistemi. Ohranile so aktivnosti številnih encimov biotransformacije faze 1 in 2, ki imajo pomembno vlogo pri aktivaciji/detoksifikaciji genotoksičnih prokarcinogenov. Proizvajajo encime faze 1, kot so izoencimi iz družine CYP (angl. cytochrome P450), katalaza, peroksidaza, NADPH citokrom C reduktaza in encime faze 2, to so GST, sulfotransferaza, N-acetiltransferaza ... (Knasmüller in sod., 1998). Celice HepG2 so sposobne detoksifikacije ksenobiotikov in predstavljajo dober modelni sistem za primerjavo z metabolizmom ksenobiotikov v človeškem telesu (Mersch-Sundermann in sod., 2004). Celice HepG2 izražajo tudi številne antioksidativne encime, kot so: SOD, katalaza in glutation peroksidaza, ki zagotavljajo obrambo pred ROS in oksidativnem stresu v celici (Lee in sod., 2002).

Primerjava izraženih genov med celično linijo HepG2 in primarnimi celicami izoliranimi iz jeter različnih moških osebkov je pokazala, da celice HepG2 izražajo približno 98 % genov znanih v primarnih jetrnih celicah. Poleg tega je bilo izražanje nekaterih genov v celicah

HepG2 močno povečano v primerjavi s primarnimi celicami jeter. Razlika med izraženimi geni v primarnih celicah jeter in celicah HepG2 je posledica transformacije in spremembe fenotipa celične linije HepG2. Identifikacija genov, ki so izraženi v primarnih jetrnih celicah večine osebkov, in razlike v izražanju genov so pomembne pri razumevanju različnih odzivov ljudi na zdravila in kemikalije (Harris in sod., 2004).

Ugotovljeno je bilo tudi, da lahko z genotoksičnimi testi na celicah HepG2 določimo različne razrede okoljskih karcinogenov. Le-ti pa predstavljajo zaneslivejše rezultate v primerjavi s konvencionalnimi *in vitro* testi s podganjimi jetrnimi homogenati, ki lahko dajo lažno negativne rezultate. Celice HepG2 so se izkazale za uporabne tudi v anti-mutagenih študijah, kjer lahko določimo mehanizme delovanja, ki jih s konvencionalnimi *in vitro* sistemi ne zaznamo (Knasmüller in sod., 1998). Zaradi vseh zgoraj naštetih prednosti uporabe celic HepG2 v različnih študijah in ugotovitvah, da so jetra glavna tarča škodljivega delovanja nanodelcev, smo za določanje toksičnosti TiO₂ uporabili testni sistem s celicami človeškega hepatoblastoma HepG2 (Li in sod., 2010a; Oberdörster in sod., 2005).

3.1.3.1 Gojenje celic HepG2

V naši študiji smo uporabili celice HepG2, ki so bile izolirane iz humanega hepatoblastoma (European Collection of Cell Cultures, Porton Down, Salisbury, Velika Britanija). Celice HepG2 smo imeli shranjene v tekočem dušiku (-196 °C, celice v 10 % DMSO). Po odmrznitvi smo jih gojili v 25 cm² (T-25) oziroma 75 cm² (T-75) platenkah za gojenje celičnih kultur v inkubatorjih pri 37 °C in 5 % CO₂ vlažni atmosferi. Medij (Pregl. 7) smo celicam menjali vsake 2 – 3 dni. Presajali smo jih najmanj enkrat na teden, ko so dosegle 70 – 80 % preraščenost površine platenke. Najprej smo odstranili medij, celice sprali z enkratnim pufrom PBS (Pregl. 8), in dodali 0,1 % tripsin (Pregl. 9). Platenko smo nato postavili v inkubator in jo po nekaj minutah nežno pretresli ter s svetlobnim mikroskopom preverili, da so se vse celice odlepili od podlage. Delovanje tripsina smo zaustavili z dodatkom svežega medija. Sledil je prenos suspenzije v centrifugirko in centrifugiranje 5 minut pri 800 obratih/minuto. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant in pelet resuspendirali v svežem mediju. Celično suspenzijo smo nato osemkrat previdno potegnili z brizgo skozi injekcijsko iglo (0,9x40 mm). S tem smo dobili suspenzijo posameznih celic, ki smo jih nasadili v novo platenko z ustrezno količino svežega medija.

Vse raztopine smo pred dodajanjem celicam segreli v vodni kopeli na 37 °C. Plastenke s celicami smo nato gojili v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂ atmosfera).

Preglednica 7: Sestavine za pripravo medija za gojenje celic HepG2 (50 ml)

SESTAVINE	KOLIČINA
MEM	43,5 ml
FBS	5 ml
NEAA	0,5 ml
L- glutamin	0,5 ml
Penicilin/streptomicin	0,5 ml

Preglednica 8: Sestavine za pripravo 1×PBS (100 ml)

SESTAVINE	KOLIČINA
Sterilna dH ₂ O	90 ml
Sterilen 10×PBS	10 ml

Preglednica 9: Sestavine za pripravo 0,1 % raztopine tripsina (1000 ml)

SESTAVINE	KOLIČINA
Tripsin	1 g
EDTA	0,1 g
NaCl	8 g
KCl	0,4 g
Glukoza monohidrat	1 g
NaHCO ₃	0,84 g
Fenol rdeče	10 mg
dH ₂ O	Dopolnimo do 1000 ml

*Sterilnost zagotovimo s filtracijo raztopine skozi filter z 0,22 µm porami.

3.1.3.2 Štetje celic

Celice smo šteli s pomočjo Bürker-Türkove ploščice, na katero smo nanegli celice pobarvane z barvilom tripansko modro. Tripansko modro je vitalno barvilo in lahko prodre le v mrtve celice, membrane živih celic pa so nepropustne za barvilo in po barvanju ostanejo svetle. Barvilo za barvanje celic pripravimo tako, da zmešamo 10 µl celične suspenzije s 40 µl barvila tripansko modro ter 10 µl dobljene mešanice naneseemo na Bürker-Türkovo ploščico. Nato preštujemo žive in mrtve celice v vseh 4 kvadratih (A, B, C, D) s površino 1 mm² in izračunamo povprečje. Pričakovana viabilnost celic je bila >95 %. Pri izračunu števila celic upoštevamo še dejavnik redčenja R, ki je v našem primeru 5 in volumen komore, ki je 0,1 µl ($K_p=10^4$).

Število celic smo izračunali po naslednji formuli:

$$\frac{(A+B+C+D) \times R \times K_p}{4} \quad \dots (8)$$

3.1.4 Karakterizacija delcev TiO₂

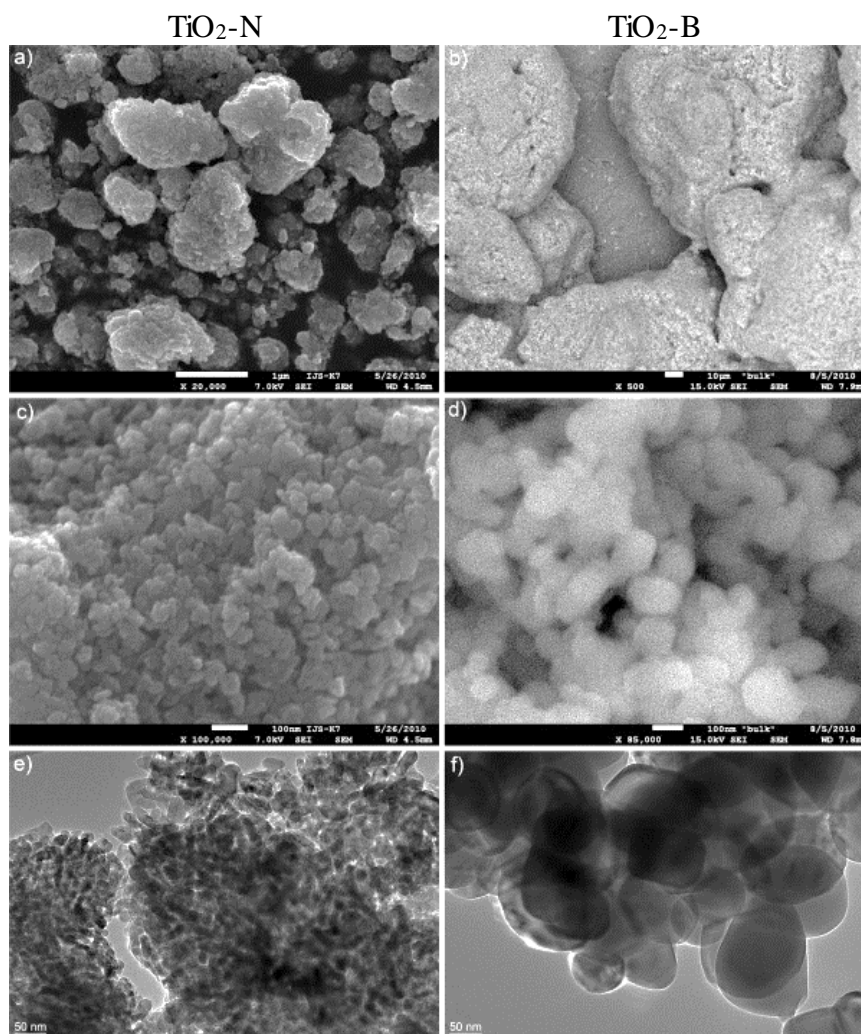
Pri raziskovalnem delu smo uporabili 2 velikosti anataznih delcev titanovega dioksida TiO₂-N in TiO₂-B. Lastnosti obeh delcev so predstavljene v Pregl. 10.

Preglednica 10: Lastnosti delcev TiO₂-N in TiO₂-B

	TiO ₂ -N	TiO ₂ -B
Informacije proizvajalca (Sigma-Aldrich)	nanodelci, anatazna kristalna struktura velikost delcev < 25nm	podmikronski delci, anatazna kristalna struktura velikost delcev 50 µm
Eksperimentalno izmerjene vrednosti		
Specifična površina (metoda BET*)	129,3 m ² /g	8,6 m ² /g
Velikost kristalov znotraj agregatov (FEG-SEM*)	18 nm	105 nm
Velikost agregatov (FEG- SEM)	~ 1 µm	~ 50 µm
Oblika delcev (TEM*)	sferični kristali	sferični kristali
Kristalna struktura (XRD*)	anatazna	anatazna

*Metoda BET (angl. Brunauer, Emmett and Teller) – določevanje specifične površine z adsorbicijo plinov; FEG-SEM (angl. field-emission-gun scanning electron microscopy) – elektronski mikroskop z izvorom elektronov na poljsko emisijo; TEM (angl. transmission electron microscopy) – presevni elektronski mikroskop; XRD (angl. X-Ray Diffraction) – rentgenska praškovna difrakcija.

Morfologija delcev TiO₂-N in TiO₂-B se močno razlikuje, kar je razvidno tudi s Sl. 7. Delci TiO₂-N so manjši, vendar združeni v čvrste agregate v primerjavi s TiO₂-B, katerih primarni delci so večji in tvorijo mehke aglomerate. Glede na to, da so delci TiO₂-N manjši, je zaradi tega njihova specifična površina večja v primerjavi z delci TiO₂-B.



Slika 7: Posnetki morfologije anataznih delcev TiO_2 -N in TiO_2 -B, posnetih z elektronskim mikroskopom z izvorom elektronov na poljsko emisijo FEG-SEM: A – TiO_2 -N (20000-kratna povečava), B – TiO_2 -B (500-kratna povečava), C – TiO_2 -N (100000-kratna povečava) in D – TiO_2 -B (85000-kratna povečava), in presevnim elektronskim mikroskopom TEM: E – TiO_2 -N in F – TiO_2 -B (fotografiral: Z. Samardžija).

Delci TiO_2 -N in TiO_2 -B imajo tudi zelo različne lastnosti, ko jih dispergiramo v vodi ali mediju (Pregl. 11). Opazimo lahko razlike med pH-jem vodne raztopine, v kateri so dispergirani delci TiO_2 -N ali TiO_2 -B, kar je posledica različne kemijske sestave površine delcev. Delci TiO_2 -N in TiO_2 -B pa se razlikujejo tudi v zeta potencialu in posledično stabilnosti v vodni raztopini. Vse te lastnosti pomembno vplivajo na biološko dostopnost in toksičnost delcev TiO_2 .

Preglednica 11: Lastnosti delcev TiO₂-N in TiO₂-B v raztopini

Lastnost	TiO₂-N	TiO₂-B
pH vodne raztopine	6,5	7,8
Zeta potencial v vodi s pH 7 (mV)	-20	-98
Električna prevodnost (mS/cm)	0,20	0,10
Izoelektrična točka v vodi	6,9	1,4
Zeta potencial v mediju (mV)	-8,7	-13,5
Stabilnost v vodni raztopini	Hitra sedimentacija	Stabilen več dni

Analiza prahov titanovega dioksida TiO₂-N in TiO₂-B z FEG-SEM in TEM ter analiza specifične površine sta bili narejeni na Odseku za nanostrukturne materiale na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Analiza kristalne faze delcev TiO₂ pa je bila narejena na Inštitutu tehničnih znanosti Srbske akademije znanosti in umetnosti v Beogradu v Srbiji.

3.1.4.1 Priprava delcev TiO₂

Ustrezno količino delcev TiO₂-N in TiO₂-B, ki smo jih uporabili v raziskovalnem delu, smo ločeno natehtali v steklenih čašah, ki smo jih nato zaščitili z aluminijasto folijo in s tem preprečili, da bi bili delci izpostavljeni UV žarkom sonca. Za tretiranje smo uporabili neobsevane in z UV svetlobo pred-obsevane delce TiO₂-N in TiO₂-B.

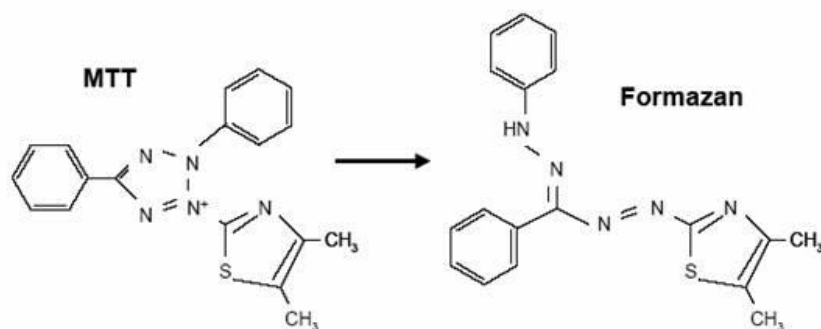
Stekleni čaši z delci TiO₂-N in TiO₂-B smo izpostavili UV-A svetlobi v UV-inkubatorju za 24 ur, pri čemer je bila temperatura v sterilizatorju 20 °C. Delce TiO₂ smo obsevali na Odseku za nanostrukturne materiale, na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Po končanem obsevanju smo celice HepG2 tretirali z obsevanimi delci takoj po obsevanju, oziroma smo delce shranili v temo za 1 dan oziroma 7 dni in smo celice HepG2 šele nato izpostavili obsevanim delcem. Delce TiO₂-N in TiO₂-B smo pred tretmajem resuspendirali v ustreznem volumnu enkratnega pufru PBS, da smo dobili založno koncentracijo 10 mg/ml. Nato smo delce 30 minut sonicirali v ultrazvočni kopeli z dH₂O pri frekvenci 60 kHz, napetosti 220 V in električnemu toku 0,5 A, da smo dobili homogeno suspenzijo. Iz založne koncentracije

TiO₂ 10 mg/ml smo nadaljnje redčitve (1, 10, 100 in 250 µg/ml) pripravili v mediju za gojenje celic (Pregl. 7).

3.2 METODE

3.2.1 Test MTT

Test MTT je kvantitativna kolorimetrična metoda za določanje vpliva testnih substanc na preživetje in proliferacijo sesalskih celic. Test je leta 1983 razvil Mosmann in kot glavne prednosti metode izpostavil hitrost, občutljivost in odsotnost radioizotopov. Druge metode so namreč vključevale štetje celic, merjenje po lizi sproščenega proteina označenega z ⁵¹Cr in vstavljenih radioaktivnih nukleotidov med celično proliferacijo (Mosmann, 1983). Test MTT je široko uporaben kot presejalna metoda za ugotavljanje citotoksičnosti različnih snovi (Wan in sod., 1994). Test MTT temelji na sposobnosti živih celic, da pretvorijo vodotopno tetrazolijevo sol 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (MTT, angl. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) v nevodotopne kristale formazana (Sl. 8) (Mosmann, 1983). Poznamo različna organska topila za raztapljanje formazana, kot sta etanol in izopropanol, vendar se je kot najbolj učinkovito izkazalo topilo DMSO (Twentyman in Luscombe, 1987).



Slika 8: Redukcija MTT reagenta z mitohondrijsko sukcinat dehidrogenazo v formazan (prirejeno po FAME Pharmaceuticals, 2010)

MTT je rumen substrat, ki zaradi neprepustnosti celične membrane vstopi v celice z endocitozo. Ob prisotnosti mitohondrijske sukcinat dehidrogenaze v živih celicah se spremeni v temnovijolične kristale formazana, ki se v celici zadržujejo v lizosomih ali endosomih. Nastali produkt formazan ni vodotopen in izstopi iz celice z eksocitozo ter ga lahko s pomočjo organskega topila raztopimo, da dobimo homogeno raztopino, kateri lahko

izmerimo optično gostoto (Mosmann, 1983; Liu in sod., 1997). Optično gostoto izmerimo s spektrofotometrom pri valovni dolžini 570 nm in referenčni valovni dolžini 690 nm. Absorbanca je premosorazmerna številu celic, raziskave pa so pokazale, da s to metodo lahko zaznavamo zelo majhno število živih celic. Žive celice z aktivnimi mitohondriji povzročijo nastanek kristalov formazana, količina formazana pa je odvisna od nivoja energetskega metabolizma v celici. Aktivirane celice proizvajajo več formazana kot počivajoče celice, kar omogoča merjenje aktivnosti celic tudi v odsotnosti proliferacije. Ker je to zelo hitra metoda, lahko v kratkem času pridobimo veliko število rezultatov in je tudi zaradi tega zelo uporabna in pogosto uporabljena metoda za testiranje toksičnosti različnih snovi (Mosmann, 1983).

3.2.2 Izvedba testa MTT

En dan pred izvedbo testa MTT smo celice HepG2 nasadili na mikrotitrne ploščice z 96 vdolbinicami z gostoto 40000 celic/ml. V posamezno vdolbinico smo tako nasadili 200 µl te suspenzije, kar je ustrezalo gostoti 8000 celic/luknjico. Ploščico smo po nasajanju pustili čez noč v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂ atmosfera), da so se celice pritrdile, naslednji dan smo nato nadaljevali s tretiranjem celic.

Redčitev delcev TiO₂-N in TiO₂-B smo pripravili, kot je opisano v poglavju 3.1.4. DELCI TiO₂. Nato smo celice izpostavili različnim koncentracijam neobsevanih in obsevanih delcev TiO₂-N in TiO₂-B (1, 10, 100 in 250 µg/ml) za 4, 24 in 48 ur. Pri vsakem poskusu smo naredili negativno kontrolo, kateri smo dodali le svež medij. Po končani inkubaciji smo v temi v vsako vdolbinico ploščice dodali 20 µl reagenta MTT s koncentracijo 5 mg/ml ter še 3 ure inkubirali celice v inkubatorju (37 °C, 5 % CO₂ atmosfera). Nato smo v digestoriju odstranili ves supernatant iz vseh vdolbinic ploščice ter dodali 200 µl DMSO in dobro resuspendirali s pipeto. Sledilo je merjenje absorbance s spektrofluorimetrom pri valovni dolžini 570 nm in referenčnem filtru 690 nm. Vsako koncentracijo vzorcev in negativno kontrolo smo za vse čase inkubacije naredili v petih paralelah in vsaj trikrat neodvisno ponovili.

S pomočjo programa Magellan smo rezultate prenesli v računalnik in jih shranili v Excelov dokument. Rezultate smo prikazali kot odstotek preživetja celic, ki so bile izpostavljene delcem TiO₂ v primerjavi z negativno kontrolo.

Odstotek preživetja celic smo izračunali po naslednji formuli:

$$\text{Odstotek preživetja} = \frac{A_{\frac{570}{690}} \text{ (vzorec)}}{A_{\frac{570}{690}} \text{ (kontrolna skupina)}} \times 100 \quad \dots (9)$$

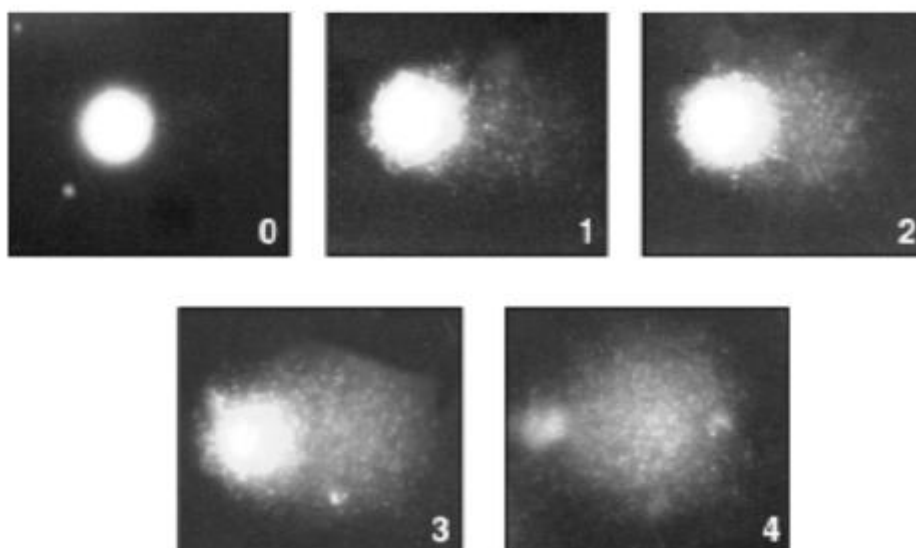
Za analizo razlik med tretiranimi in kontrolnimi celicami smo uporabili Studentov t-test, pri čemer smo kot statistično značilno razliko določili $p < 0,05$.

3.2.3 Test komet

Pomembna metoda za določanje genotoksičnosti je test komet, imenovan tudi test elektroforeze posameznih celic (SCGE, angl. single cell gel electrophoresis). Test komet sta leta 1984 razvila Östling in Johanson in je pod nevtralnimi pogoji omogočal detekcijo dvoverižnih prelomov DNK (DSB, angl. double-strand break). Alkalno različico so leta 1988 modificirali Singh in sodelavci, s katero je bilo omogočeno zaznavanje enoverižnih prelomov (SSB, angl. single-strand break) in dvoverižnih prelomov DNK, alkalno labilnih mest (ALS, angl. alkali labile sites) in prelomov molekule DNK, ki nastanejo kot vmesna stopnja v procesu nukleotidnega (NER, angl. nucleotide excision repair) ali baznega izrezovalnega popravljanja (BER, angl. base excision repair) poškodb DNK (Östling in Johanson, 1984; Singh in sod., 1988). Alkalni pogoji omogočajo bolj občutljivo zaznavanje poškodb DNK, pride pa tudi do razgradnje celične RNK, ki bi v nasprotnem primeru motila kvantifikacijo rezultatov (Singh in sod., 1988).

Alkalni test komet je občutljiva tehnika za določanje poškodb molekule DNK na nivoju posamezne evkarionske celice (Singh in sod., 1988). Celice najprej pomešamo z agarozo in nanesemo na objektna stekelca. Nato jih liziramo v raztopini s pH 10 in z visoko koncentracijo soli ter detergentov. Sledi inkubacija stekelc v elektroforetskem pufri s pH >

13, pri čemer pride do denaturacije in odvitja molekul DNK. Tudi elektroforeza poteka v alkalnih pogojih. Pri tem zlomljeni fragmenti negativno nabite DNK prosto potujejo v električnem polju proti anodi, kar na videz spominja na rep kometa, po čemer je test tudi dobil ime (Tice in sod., 2000; Collins in Dušinská, 2002). Za nastanek kometov obstaja več razlag. Ena od teh je, da superzvita DNK (angl. supercoil) med lizo celic, ko pride do odstranitve membran, citoplazme in večine jedrnih proteinov, ostane v obliki nukleoida, sestavljena iz zank superzvite DNK pritrjene na jedrni matriks. Ko je DNK superzvita, je tesno skupaj in se zelo malo premika v električnem polju. Že enojen prelom verige DNK zadostuje za sprostitvev superzvite DNK in tovrstna zanka se ob izpostavljenosti električne mu polju premika proti anodi. S povečanjem števila poškodb se poveča intenziteta repa in ne toliko dolžina repa, ki je določena z dolžino zank (Sl. 9) (Collins in sod., 1997b; Boiteux in sod., 1992).



Slika 9: Prikaz različnih stopenj poškodb DNK pri testu komet. Na sliki 0 jedro ni poškodovano, od slike 1 do 4 pa poškodbe naraščajo, zaradi česar je čedalje večji rep kometa, po čemer je tudi metoda dobila ime (Collins in Dušinská, 2002: 152).

Po končani izvedbi testa komet gelčke nevtraliziramo in analiziramo. Analiza lahko poteka takoj ali gelčke shranimo za nekaj dni v temnem, vlažnem prostoru (Collins in Dušinská, 2002). Pred analizo moramo gelčke obarvati s fluorescentnim barvilom, ki se vrine med bazne pare molekule DNK. Najpogosteje uporabljena barvila so etidijev bromid, propidium jodid, DAPI (angl. 4,6,-diamidino-2-phenylindol), SYBER green I in YOYO-1 (angl. benzoxazolium-4-quinolinum oxazole yellow homodimer). Obarvano DNK lahko nato

opazujemo s fluorescenčnim mikroskopom in ocenimo poškodbe DNK (Tice in sod., 2000; Collins in sod., 1995).

Najpogosteje uporabljena analiza je računalniška, čeprav obstaja tudi vizualno vrednotenje poškodb DNK. Rezultate testa lahko predstavimo kot dolžino repa oziroma dolžino potovanja DNK, ki je povezana z dolžino fragmenta DNK, odstotek DNK v repu in repni moment, ki je rezultat produkta dolžine in intenzitete repa kometa. Najpogosteje pa se uporablja odstotek DNK v repu, ki je linearno odvisen od števila poškodb DNK (Collins in sod., 1996; Tice in sod., 2000).

V zadnjih letih se je uporaba testa komet povečala in razširila na različna področja. V *in vitro* izvedbi lahko test uporabljamo za ugotavljanje genotoksičnosti, predvsem s sesalskimi celičnimi kulturami in človeškimi limfociti, lahko pa tudi s celičnimi kulturami, ki izvirajo iz drugih tkiv. V *in vivo* izvedbi lahko za analizo uporabimo katerokoli tkivo ali organ živali. Rezultati lahko pokažejo, katero je tarčno tkivo genotoksičnega delovanja določene testne substance (Tice in sod., 2000). Test komet se lahko uporablja tudi pri določanju hitrosti popravljanja DNK. Singh in sod. (1988) so uporabili limfocite, ki so jih izpostavili X-žarkom in H₂O₂ ter opazovali, v kolikšnem času se popravi večji del napak molekul DNK. Sposobnost popravila napak molekul DNK je odvisna od posameznika in njegovih genetskih in epigenetskih predispozicij. Gledamo pa lahko tudi vpliv antioksidantov na sposobnost popravljanja napak DNK (Collins in sod., 1997a). Metodo se lahko uporablja pri analizi populacijske izpostavljenosti toksičnim snovem. Dokazali so, da imajo delavci, ki so izpostavljeni organskim kemikalijam v primerjavi s kontrolnimi osebami, bistveno večji nivo poškodb DNK. Zaradi hitrosti in občutljivosti metode lahko na relativno enostaven način pridobimo veliko število podatkov. V odvisnosti od eksperimentalnega pristopa lahko pridobimo zelo različne podatke (Collins in sod., 1997a).

Test komet je pomembna tehnika za določanje poškodb DNK in odzivov celic na poškodbe ter ocenjevanje hitrosti popravljanja napak DNK (Collins in sod., 1997b). V primerjavi z drugimi testi za ugotavljanje genotoksičnosti so prednosti testa komet visoka občutljivost, ki omogoča ugotavljanje majhnega števila poškodb DNK, majhna količina celic v vzorcu, fleksibilnost, nizki stroški, uporaba majhne količine testne substance in relativno kratek čas

za dokončanje eksperimenta (Tice in sod., 2000). Seveda pa ima vsak test tudi omejitve in slabosti. S testom komet zaznamo nepopravljene prelome verig DNK in alkalna labilna mesta v živih celicah, ki ne gredo v apoptozo ali nekrozo. Omejitev testa komet pa je, da celice, ki gredo v nekrozo ali so v zgodnjih fazah apoptoze, lahko vsebujejo fragmentirano DNK, kar pomeni, da nekatere poškodbe, ki jih zaznamo pri kometu, niso poškodbe molekul DNK, ampak posledica apoptoze oziroma nekroze, vendar kljub temu prispevajo k repu kometa (Wang in sod., 2007).

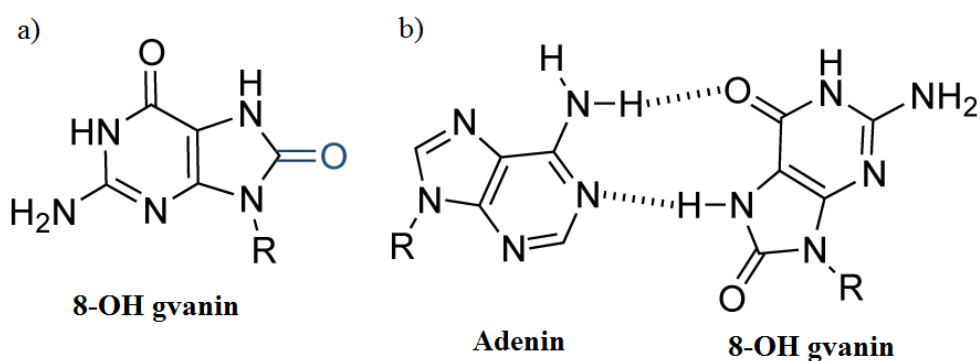
Poleg tega obstaja v primeru testiranja genotoksičnosti nanodelcev tudi verjetnost lažnih pozitivnih rezultatov. Nanodelci lahko poškodujejo DNK posredno preko ROS ali z neposrednimi interakcijami, v primeru ko delci vstopijo v celico. Ravno slednji način je problematičen, saj nanodelci tudi po končanem tretiranju ostanejo v celici v lizosomih in se med samim izvajanjem testa komet (*post-festum*) sprostijo ter povzročijo poškodbe DNK. Genotoksični učinek, ki ga odkrijemo s testom komet, moramo potrditi z dodatnimi testi in merjenjem nastanka ROS, lipidne peroksidacije, mediatorjev vnetja ali povečanega izražanja genov, ki se odzovejo na oksidativni stres, in apoptozo celic. Le na ta način lahko potrdimo pravilnost rezultatov testa komet (Rajapakse in sod., 2013).

3.2.4 Modificirani test komet

Alkalni test komet omogoča zaznavanje enojnih in dvojnih prelomov molekule DNK, ki so lahko hitro popravljene s popravljivimi celičnimi mehanizmi, najpogosteje z baznim in nukleotidnim izrezovalnim popravljanjem. Popravljene napake molekul DNK pa z alkalnim testom komet ne moremo zaznati. Poleg tega številni toksični dejavniki ne povzročijo neposrednih poškodb molekul DNK, ampak le oksidativne poškodbe. Pri modificiranem testu komet uporabimo popravljalne endonukleaze, ki na mestih oksidativnih poškodb povzročijo prelome, zaradi česar je modificirana različica testa komet veliko bolj občutljiva in specifična (Collins in sod., 1997b).

Modificirani test komet tako omogoča uspešno merjenje oksidativnih poškodb molekul DNK. Oksidativne poškodbe DNK so posledica delovanja radikalov, ki nastanejo zaradi ionizirajočega sevanja ali ROS (Collins in sod., 1995). Endogena produkcija prostih radikalov, ki nastanejo pri celičnem dihanju, je pogosto vzrok mutacij, ki lahko, če se zgodijo

v pravih genih, povzročijo nastanek raka. Antioksidanti učinkovito odstranjujejo endogene proste radikale, preden le-ti povzročijo poškodbo DNK (Collins in sod., 1995, 1996). Oksidirane baze DNK lahko izmerimo neposredno z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC, angl. high-performance liquid chromatography) ali posredno z modificiranim testom komet z uporabo popravljalnih endonukleaz. Za določanje nastanka oksidiranih baz se lahko uporabi encim endonukleaza III, s katerim zaznavamo oksidirane pirimidine, medtem ko se encim Fpg (angl. formamidopyrimidine glycosylase) uporablja za določanje oksidiranih purinov (Collins in sod., 1996). Ena glavnih vlog encima Fpg, ki je prisoten v bakterijah, je popravilo poškodb DNK, ki jih povzročijo prosti radikali (Boiteux and sod., 1992). Tudi kvasovke in sesalci imajo encime s podobno glikozilazno aktivnostjo, le da se encimi imenujejo Ogg (angl. 8-oxoguanine glycosylase) (Hazra in sod., 2000). Encim Fpg je specifičen za prepoznavanje odprtega imidazalnega obroča purinov in 8-hidroksipurinov. Encim Fpg izreže FapyAde (angl. 4,6-diamino-5 formamidopyrimidine), FapyGua (angl. 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) in 8-okso-7,8-dihidro-2'-deoksivanozin (8-OH gvanine) (Boiteux and sod., 1992). 8-OH gvanin je najbolj škodljiv in obstojen produkt oksidativnega stresa, ki se lahko med DNK replikacijo spari z adeninom in pride na takšnem mestu do transverzije para gvanin:citozin v par timin:adenin (Sl. 10) (Hazra in sod., 2000).



Slika 10: Prikaz 8-OH gvanina (a) in nastanek baznega para adenin: 8-OH gvanin (b), ki vodi do transverzije para gvanin:citozin v par timin:adenin (prirejeno po Brown T. In Brown T. (Jr.), 2014).

Popravljalni mehanizem encima Fpg temelji na baznem izrezovalnem popravljanju poškodb. Encim Fpg ima DNK glikozilazno aktivnost, s katero cepi N-glikozilazno vez, njegova AP-liazna aktivnost pa povzroči nastanek kovalentnega intermediata (Schiffova baza). Končni

produkt delovanja je prekinitev ene verige s fosforiliranim 3'- in 5'- koncem (Hazra in sod., 2000). Tovrstni encimi naredijo prelome na mestih poškodb molekule DNK, ki jih lahko zaznamo s testom komet. Uporaba encima Fpg in endonukleaze III ima aditiven učinek, ker encima prepoznavata različne napake DNK in povzročata prelome molekule DNK. Kljub temu, da je metoda kvantitativna, je potrebno previdno vrednotenje rezultatov, da jo lahko primerjamo z metodo HPLC in masno spektrometrijo (Collins in sod., 1996). Vedno pa je potrebno imeti kontrolne vzorce brez dodanih encimov, ki zagotavljajo podlago za primerjavo in zanesljivejše rezultate (Collins in Dušinská, 2002).

3.2.5 Izvedba modificiranega testa komet

En dan pred izvedbo poskusa smo celice nasadili na ploščico za gojenje celic z 12 vdolbinicami. V vsako vdolbinico smo dodali 1 ml suspenzije medija in celic z gostoto ~80000 celic/ml. Ploščice smo po nasajanju dali v inkubator (37 °C, 5 % CO₂ atmosfera) in naslednji dan celice tretirali z različnimi koncentracijami neobsevanih in obsevanih delcev TiO₂-N in TiO₂-B (1, 10, 100 in 250 µg/ml) za 4 in 24 ur pri 37 °C v atmosferi s 5 % CO₂. Pri vsakem poskusu smo naredili negativno kontrolo, kateri smo dodali le svež medij in pa pozitivno kontrolo. Pozitivna kontrola je bila pri 4-urnem tretiranju 0,1 mM *tBOOH* in pri 24-urnem tretiranju 50 µM BaP. *tBOOH* je analog vodikovega peroksida in povzroča oksidativne poškodbe molekul DNK, lipidno peroksidacijo ter poškodbe celic (Lin in sod., 2000). BaP pa spada v skupino policikličnih aromatskih ogljikovodikov, ki nastanejo pri nepopolnem izgorevanju. Izpostavljeni smo mu v vsakdanjem življenju pri vdihavanju cigaretne dima, izpušnih plinov, industrijskih procesih in odprtem ognju (U. S. EPA, 2011).

Po končanem tretiranju smo nadaljevali z izvedbo modificiranega testa komet. Celicam smo najprej odstranili medij z delci TiO₂-N in TiO₂-B in jih dvakrat sprali z enkratnim pufrom PBS (v vsako vdolbinico smo dodali 1 ml pufra). Nato smo v vsako vdolbinico dodali 400 µl 0,1 % tripsina in celice dali v inkubator (37 °C, 5 % CO₂ atmosfera), da so se odlepile od podlage. Ploščico smo še malo pretresli in pod svetlobnim mikroskopom preverili, da so vse celice odlepljene. Delovanje tripsina smo ustavili z dodatkom 800 µl medija in suspenzijo celic iz vsake vdolbinice z avtomatsko pipeto prenesli v svojo mikrocentrifugirko. Mikrocentrifugirke s celicami smo nato centrifugirali 5 minut pri 800 obratih/minuto.

V tem času smo pripravili peskana objektna stekelca, ki smo jih predhodno čez noč namakali v metanolu, in jih nato ožgali v plamenu. Na stekelca smo nanесли dvakrat po 80 μ l NMP agaroze (Pregl. 12), jo prekrili s krovnama stekelcema in dali v hladilnik na 4 °C, da se je prva plast agaroznega gela strdila. Med nanašanjem smo agarozo ves čas segrevali in mešali na mešalu.

Preglednica 12 : Priprava 1 % NMP in LMP agaroze

SESTAVINE	KOLIČINA
NMP agarozna ali LMP agarozna	0,2 g
1-kratni pufer PBS	20,00 ml

*Agarozo NMP/LMP raztopimo v enkratnem pufru PBS z mešanjem in segrevanjem do vrelišča v mikrovalovni pečici.

Po centrifugiranju smo iz posameznih mikrocentrifugirk odstranili medij in preostali pelet resuspendirali v 60 μ l medija. Celotni volumen iz posameznih mikrocentrifugirk smo razdelili in prenesli po 30 μ l v dve posamezni mikrocentrifugirki.

Objektnim stekelcem smo previdno odstranili krovna stekelca in raztopili LMP agarozo, ki ima nižjo točko tališča, in zato ne povzroči poškodb celic. Dodali smo 70 μ l LMP agaroze k 30 μ l suspenzije celic, dobro premešali in nanесли na prvo plast agaroznega gela ter pokrili s krovnim stekelcem in prenesli za 10 minut v hladilnik na 4 °C. V hladilniku se je agarozna strdila, tako da smo lahko odstranili krovna stekelca in dali vsa objektna stekelca z agaroznimi gelčki za 1 uro v raztopino za lizo (Pregl. 13) s pH 10 v hladilnik na 4 °C. Vse smo delali v temi, da ne bi povzročili dodatnih poškodb molekul DNK zaradi zunanjih vplivov.

Preglednica 13: Priprava raztopine za lizo celic (300 ml)

SESTAVINE	KOLIČINA
EDTA	0,363 g
NaCl	11,16 g
Tris	43,92 g
dH ₂ O dodamo do 300 ml	
Triton X-100 (dodamo tik pred uporabo)	3 ml

*Raztopini za lizo na koncu umerimo pH na 10 z 10 M NaOH oziroma 30 % HCl in do uporabe shranimo v hladilnik na 4 °C.

Po končani lizi smo stekelca previdno pobrali iz raztopine in jih prenesli na suho papirnato brisačo. Sledilo je spiranje stekelc z gelčki v pufriu ERB, ki smo ga pripravili, kot je opisano v Pregl. 14. Najprej smo zmešali 30 ml pufru z 270 ml ohlajene dH₂O. Stekelca z gelčki smo prenesli v manjšo kadičko in jih prelili z 1/3 pripravljenega pufru ERB. Kadičko smo pokrili in spiranje ponovili trikrat po 5 minut. Med tem časom smo pripravili encim Fpg, ki smo ga vzeli iz zamrzovalnika (-80 °C) in k 10 µl encima dodali 290 µl pripravljenega pufru ERB. Encim Fpg smo do nanosa na gelčke hranili v hladilniku na 4°C.

Preglednica 14: Priprava pufru ERB (600 ml)

SESTAVINE	KOLIČINA
HEPES (40 mM)	57,16 g
EDTA (0,5 mM)	1,14 g
BSA (0,2 mg/ml)	1,2 g
KCl (0,1 M)	44,74 g
dH ₂ O	dopolnimo do 600 ml

*Na koncu umerimo pH na 8 s 5 M KOH in razdelimo celotni volumen na 30 ml alikvote ter shranimo pri -20 °C.

Po končanem spiranju gelčkov s pufrom ERB smo stekelca z gelčki prenesli na suho papirnato krpo, da so se malo osušili in jih nato prestavili na vlažno papirnato krpo v kadičko.

Na desne gelčke na objektnih stekelcih smo nanесли 50 µl raztopine encima Fpg, na leve pa smo kot kontrolne vzorce brez dodanih encimov nanесли po 50 µl pufra ERB ter pokrili s krovnimi stekelci. Celotno kadičko smo prekrili z aluminijasto folijo in dali v inkubator (37 °C, 5 % CO₂ atmosfera) za 30 minut. V tem času je imel encim Fpg dobre pogoje za delovanje in je še dodatno razrezal verigo DNK.

Po končani inkubaciji smo prestavili kadičko z gelčki v hladilnik na 4 °C za nekaj minut, da so se gelčki strdili in smo lahko odstranili krovna stekelca. Stekelca smo nato prenesli v elektroforetsko banjico v hladilniku na 4 °C, kjer smo jih prelili z elektroforetskim pufrom (Pregl. 15) in pustili 20 minut v temi. Stekelca smo naložili eno zraven drugega, tako da so bili gelčki obrnjeni v isto smer. Prazna mesta v kadički smo zapolnili s praznimi stekelci in na ta način zagotovili homogenost električnega polja. V tem času je prišlo do odvijanja molekul DNK. Nato je potekala elektroforeza 20 minut v temi na 4 °C pri napetosti 25 V in toku 300 mA.

Preglednica 15: Priprava elektroforetskega pufra (1250 ml)

SESTAVINE	KOLIČINA
EDTA	6,5 ml
NaOH	37,5 ml
dH ₂ O	1206 ml

Po končani elektroforezi smo stekelca prestavili v kadičko s sveže pripravljenim ohlajenim pufrom za nevtralizacijo (Pregl. 16) ter inkubirali 15 minut v hladilniku na 4 °C. Na koncu pa smo stekelca dobro osušili in jih shranili v kadički na vlažni staničevini v hladilniku na 4 °C.

Preglednica 16: Priprava nevtralizacijskega pufra (300 ml)

SESTAVINE	KOLIČINA
Tris	14,532 g
dH ₂ O	300 ml

* Na koncu umerimo pH na 7,5 z 10 M NaOH oziroma 30 % HCl.

Pred slikanjem gelčkov smo najprej pobarvali jedra z 20 µl EtBr. Koncentracija EtBr je bila 5 µg/ml. Na vsakem gelčku smo poslikali 55 jeder, pri čemer smo se izogibali zunanjih robov. Jedra smo slikali pod fluorescenčnim mikroskopom (Nikon Eclipse E800, Japonska) s fluorescenčno svetlobo (Nikon HB-10104AF, Japonska) pri 400-kratni povečavi (objektiv: 40-kratna) s programom Comet IV (Perceptive Instruments, Združeno kraljestvo), ki je izmeril več različnih parametrov. Nas je zanimal predvsem odstotek DNK v repu kometa, ki ga izračunamo po formuli:

$$\% \text{ DNA v repu} = 100 \times \frac{\sum I_t}{\sum I_h} + \sum I_t \quad \dots (10)$$

I_h je intenziteta točke v glavi

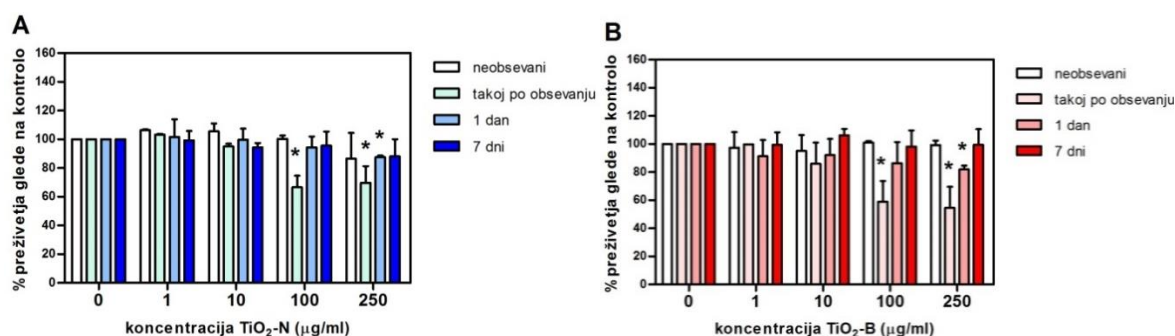
I_t je intenziteta točke v repu

Statistično analizo rezultatov smo naredili s programom GraphPad Prism 3.02. Za analizo razlike med celicami, ki smo jih izpostavili delcem TiO₂, in kontrolnimi celicami, smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis). Za primerjavo vrednosti median odstotka DNK v repu znotraj poskusov smo uporabili test Dunnett (*p < 0.05), ki prikazuje statistično značilno razliko glede na kontrolo. Naredili smo tri neodvisne poskuse za 4- in 24-urno tretiranje, za vse koncentracije delcev TiO₂ kot tudi za pozitivno in negativno kontrolo.

4 REZULTATI

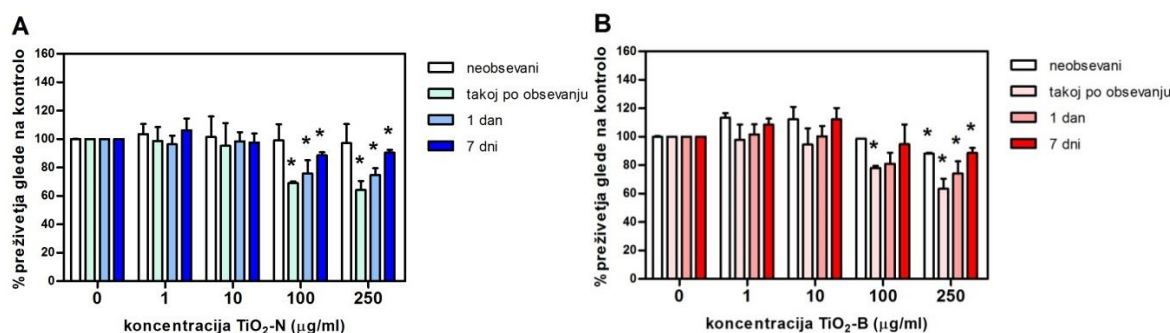
4.1 TEST MTT

Test MTT smo uporabili za določanje citotoksičnega delovanja delcev TiO₂-N in TiO₂-B na celice HepG2. Testirali smo neobsevane delce, delce takoj po obsevanju ter obsevane delce, ki so bili 1 oziroma 7 dni v temi.



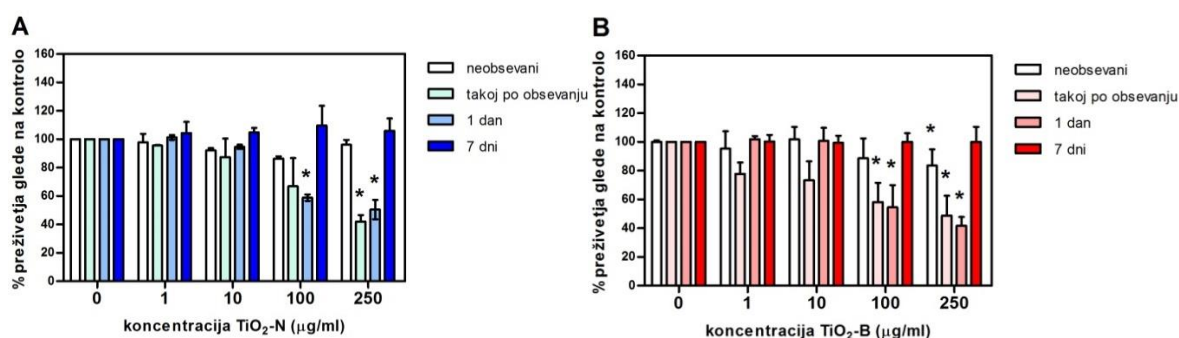
Slika 11: Vpliv različnih koncentracij TiO₂-N (A) in TiO₂-B (B) na preživetje celic HepG2 po 4 urah izpostavitve. Rezultati so podani kot odstotek preživetja celic HepG2 glede na kontrolno skupino (povprečje treh neodvisnih poskusov ± standardni odklon). * prikazuje statistično značilno razliko glede na kontrolo (Studentov t-test, $p < 0,05$).

Neobsevani TiO₂-N in TiO₂-B po 4-urnem tretiranju nista vplivala na preživetje celic HepG2. Po drugi strani pa sta TiO₂-N in TiO₂-B takoj po obsevanju statistično značilno ($p < 0,05$) zmanjšala preživetje celic HepG2 pri koncentracijah 100 in 250 µg/ml v primerjavi s kontrolo. Odstotek preživetja celic pri koncentraciji 250 µg/ml TiO₂-N je bil 69,61 % in pri koncentraciji 250 µg/ml TiO₂-B pa 54,58 %. Z UV-A svetlobo obsevani TiO₂-N in TiO₂-B, ki sta bila 1 dan v temi, sta statistično značilno zmanjšala preživetje celic HepG2 pri koncentraciji 250 µg/ml v primerjavi s kontrolo. Odstotek preživetja celic pri koncentraciji 250 µg/ml TiO₂-N je bil 87,58 % in pri koncentraciji 250 µg/ml TiO₂-B pa 81,94 %. Po drugi strani pa po izpostavitvi celic delcem TiO₂-N in TiO₂-B, ki so bili po obsevanju z UV-A svetlobo 7 dni v temi, nismo opazili vpliva na preživetje (Sl. 11).



Slika 12: Vpliv različnih koncentracij TiO_2 -N (A) in TiO_2 -B (B) na preživetje celic HepG2 po 24 urah izpostavitve. Rezultati so podani kot odstotek preživetja celic HepG2 glede na kontrolno skupino (povprečje treh neodvisnih poskusov \pm standardni odklon). * prikazuje statistično značilno razliko glede na kontrolo (Studentov t-test, $p < 0,05$).

Po 24-urni izpostavitvi neobsevanim nanodelcem TiO_2 -N ni prišlo do statistično značilnega zmanjšanja preživetja celic HepG2, medtem ko so neobsevani podmikronski delci TiO_2 -B zmanjšali preživetje celic na 88,1 %. Delci TiO_2 -N so takoj po obsevanju ter po 1 in 7 dneh v temi pri koncentracijah 100 in 250 $\mu\text{g/ml}$ zmanjšali preživetje celic. Delci TiO_2 -N so po 1 dnevu v temi pri koncentraciji 250 $\mu\text{g/ml}$ zmanjšali preživetje celic na 74,67 % in po 7 dneh v temi pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$ na 88,64 %. Delci TiO_2 -B so pri koncentraciji 250 $\mu\text{g/ml}$ takoj po obsevanju (63,44 % preživetje) in tudi po 1 dnevu (74,04 % preživetje) oziroma 7 dneh v temi (88,63 % preživetje) zmanjšali preživetje celic v primerjavi s kontrolo. Prav tako so delci TiO_2 -B takoj po obsevanju pri koncentracijah 100 in 250 $\mu\text{g/ml}$ zmanjšali preživetja celic HepG2. Največje zmanjšanje preživetja celic je bilo pri izpostavitvi celic HepG2 delcem TiO_2 -N in TiO_2 -B takoj po obsevanju pri koncentraciji 250 $\mu\text{g/ml}$ (64,21 % preživetje pri TiO_2 -N in 63,44 % preživetje pri TiO_2 -B) (Sl. 12).



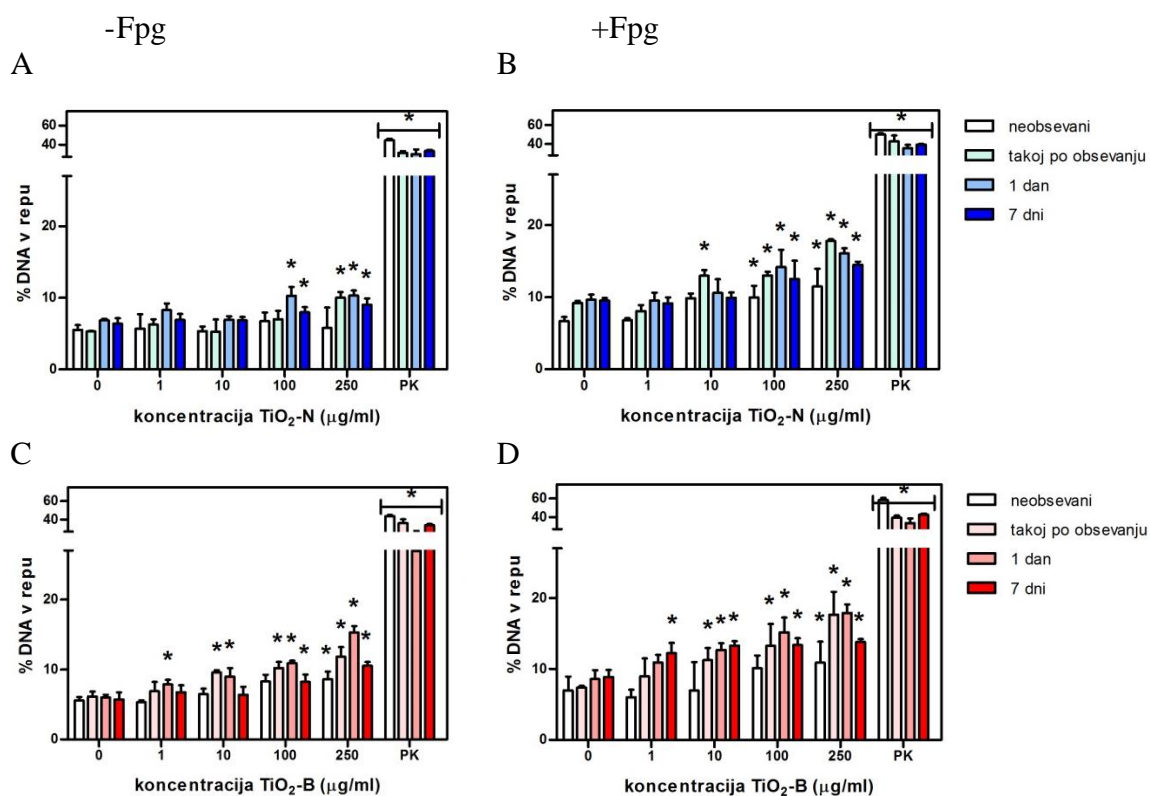
Slika 13: Vpliv različnih koncentracij TiO_2 -N (A) in TiO_2 -B (B) na preživetje celic HepG2 po 48 urah izpostavitve. Rezultati so podani kot odstotek preživetja celic HepG2 glede na kontrolno skupino (povprečje treh neodvisnih poskusov \pm standardni odklon). * prikazuje statistično značilno razliko glede na kontrolo (Studentov t-test, $p < 0,05$).

Neobsevani nanodelci TiO₂-N po 48-urnem obsevanju z UV-A svetlobo niso zmanjšali preživetja celic HepG2, ravno nasprotno pa so podmikronski delci TiO₂-B v koncentraciji 250 µg/ml znižali preživetje celic na 83,53 %. Delci TiO₂-N, ki so bili 1 dan v temi, so v koncentracijah 100 in 250 µg/ml zmanjšali preživetje, pri čemer je bilo pri koncentraciji 250 µg/ml 50,51 % preživetje celic HepG2. Delci TiO₂-B, ki smo jih uporabili takoj po obsevanju, in delci, ki so bili 1 dan v temi, so zmanjšali preživetje celic v koncentracijah 100 in 250 µg/ml. Največje zmanjšanje preživetja celic pa je bilo opaziti pri izpostavitvi delcem TiO₂-N takoj po obsevanju (42,1 % preživetje) in pri izpostavitvi TiO₂-B po 1 dnevu v temi (41,62 % preživetje) pri najvišji koncentraciji delcev (250 µg/ml). Delci TiO₂-N in TiO₂-B po 7 dneh v temi po končanem obsevanju niso vplivali na preživetje celic HepG2 (Sl. 13).

Iz dobljenih rezultatov testa MTT ne opazimo bistvenih razlik med vplivom nanodelcev TiO₂-N in podmikronskih delcev TiO₂-B na preživetje celic HepG2. Vidimo lahko, da neobsevani delci TiO₂-N ne vplivajo na preživetje celic in TiO₂-B zmanjšajo preživetje le pri najvišji testirani koncentraciji, medtem ko z UV-A svetlobo obsevani delci močno zmanjšajo preživetje celic. Največje zmanjšanje preživetja smo opazili pri izpostavitvi delcem TiO₂ takoj po obsevanju, nekoliko manjši vpliv pri delcih, ki so bili 1 dan v temi, in najmanj po 7 dneh v temi.

4.2 MODIFICIRANI TEST KOMET

Z modificiranim testom komet smo ugotavljali nastanek prelomov DNK in oksidiranih purinov v molekuli DNK. Uporabili smo encim Fpg, ki prepozna in reže oksidirane purine, in posledično povzroči nastanek dodatnih prelomov molekul DNK, ki odražajo oksidirane purine. Celice HepG2 smo za 4 in 24 ur izpostavili delcem TiO₂-N in TiO₂-B v koncentracijah 1, 10, 100 in 250 µg/ml, pri čemer smo uporabili neobsevane delce, delce takoj po obsevanju z UV-A svetlobo ter delce, ki so bili 1 oziroma 7 dni po obsevanju v temi.



Slika 14: Vpliv delcev TiO₂-N (A in B) in TiO₂-B (C in D) na nastanek prelomov DNK (-Fpg) in oksidiranih purinov (+Fpg) po 4 urah izpostavitve. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 0,1 mM tBOOH. Rezultati so podani, kot povprečje odstotka DNK v repu pri treh neodvisnih poskusih ±standardni odklon pri 50 analiziranih celicah pri vsakem poskusu. Za analizo podatkov smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis) in Dunnettov test (*p < 0.05) za določitev statistično značilne razlike glede na kontrolo.

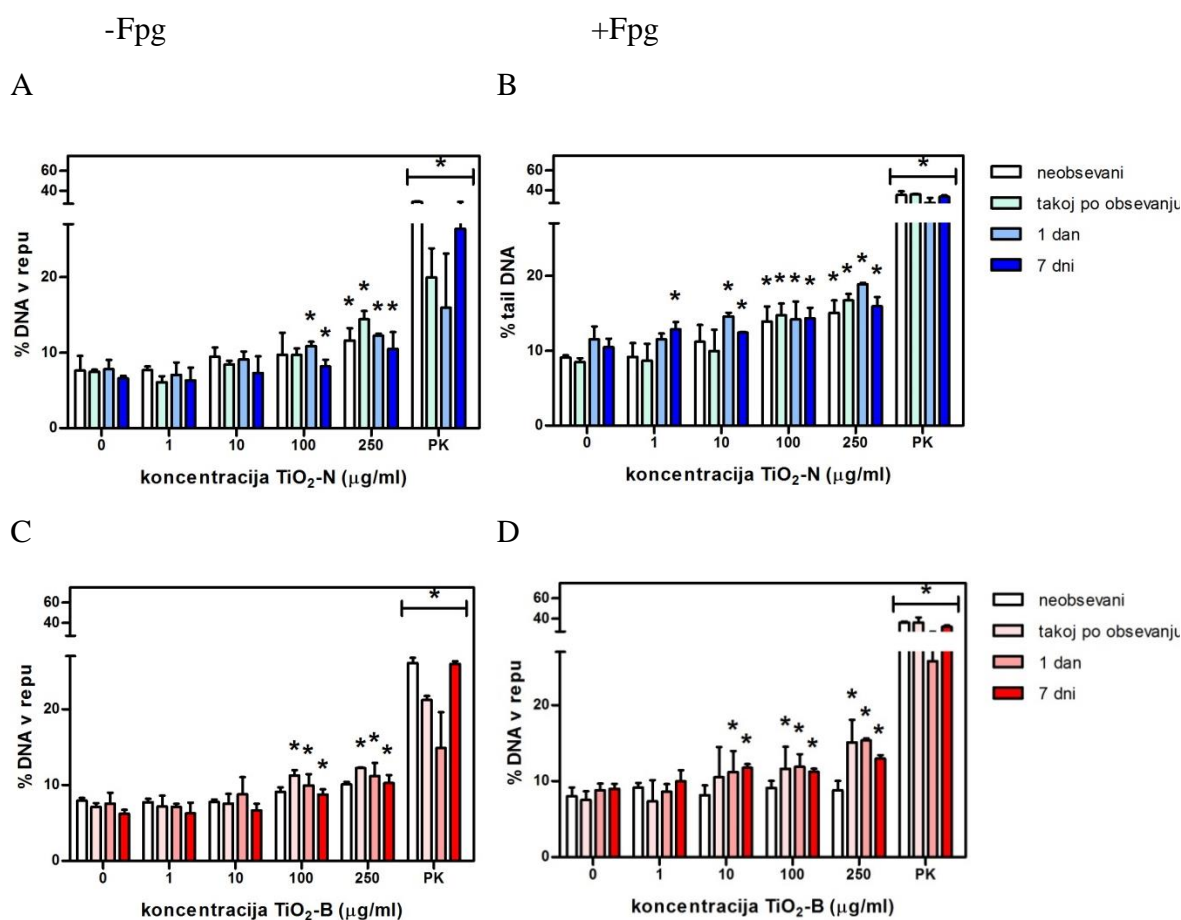
Po 4-urni izpostavitvi celic HepG2 neobsevanemu TiO₂-N nismo pri nobeni koncentraciji delcev opazili nastanka prelomov verig DNK (Sl. 14/A), medtem ko smo opazili od

koncentracije odvisen porast nastanka oksidiranih purinov (Sl. 14/B), ki je doseglo statistično značilno povečanje (* $p < 0,05$) pri koncentracijah 100 in 250 $\mu\text{g/ml}$ v primerjavi s kontrolami. Neobsevani TiO₂-B je pri koncentraciji 250 $\mu\text{g/ml}$ povzročil statistično značilno (* $p < 0,05$) povečanje števila prelomov DNK (Sl. 14/C) in tudi nastanek oksidiranih purinov (Sl. 14/D).

Pri celicah HepG2, ki so bile 4 ure izpostavljene delcem TiO₂-N takoj po obsevanju, smo opazili statistično značilno (* $p < 0,05$) povečanje odstotka DNK v repu kometa (Sl. 14/A), pri koncentraciji delcev 250 $\mu\text{g/ml}$ in od koncentracije odvisno povečanje oksidiranih purinov (Sl. 14/B) pri koncentracijah nad 10 $\mu\text{g/ml}$. Po drugi strani pa je 4-urna izpostavitve v celic delcem TiO₂-B takoj po obsevanju z UV-A svetlobo povzročila statistično značilno povečanje (* $p < 0,05$) prelomov verig DNK (Sl. 14/C) in oksidiranih purinov pri koncentracijah nad 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sl. 14/D).

Izpostavitvev delcem TiO₂-N, ki smo jih po obsevanju shranili za 1 dan v temo, je povzročila povečano število prelomov DNK (Sl. 14/A) in od koncentracije odvisen porast nivoja oksidiranih purinov (Sl. 14/B), ki je bil značilen le pri koncentracijah 100 in 250 $\mu\text{g/ml}$. Pri izpostavitvi celic HepG2 delcem TiO₂-B, ki smo jih po obsevanju shranili za 1 dan v temo, smo opazili od koncentracije odvisen odziv in nastanek poškodb DNK (Sl. 14/C) pri vseh koncentracijah delcev (1, 10, 100 in 250 $\mu\text{g/ml}$), medtem ko smo statistično značilno povečanje (* $p < 0,05$) oksidiranih purinov opazili pri koncentracijah nad 10 $\mu\text{g/ml}$ (Sl. 14/D).

Pri izpostavitvi celic HepG2 delcem TiO₂-N in TiO₂-B, ki smo jih po obsevanju shranili za 7 dni v temo, smo opazili nastanek prelomov DNK (Sl. 14/A in C) le pri najvišjih koncentracijah delcev (100 and 250 $\mu\text{g/ml}$). TiO₂-N, ki smo ga po obsevanju shranili za 7 dni v temo, je povzročil povečanje oksidiranih purinov (Sl. 14/B) pri najvišjih koncentracijah (100 in 250 $\mu\text{g/ml}$), medtem ko smo pri delcih TiO₂-B opazili od koncentracije odvisno statistično značilno (* $p < 0,05$) povečanje poškodb DNK (Sl. 14/D) pri vseh koncentracijah (1, 10, 100 in 250 $\mu\text{g/ml}$).



Slika 15: Vpliv delcev TiO₂-N (A in B) in TiO₂-B (C in D) na nastanek prelomov DNK (-Fpg) in oksidiranih purinov (+Fpg) po 24 urah izpostavitve. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 50 μM BaP. Rezultati so podani, kot povprečje odstotka DNK v repu pri treh neodvisnih poskusih ±standardni odklon pri 50 analiziranih celicah pri vsakem poskusu. Za analizo podatkov smo uporabili enosmerno analizo variance (ANOVA, Kruskal-Wallis) in Dunnettov test (*p < 0.05) za določitev statistično značilne razlike glede na kontrolo.

Izpostavitve celic HepG2 neobsevanem TiO₂-N za 24 ur je povzročila statistično značilno (*p < 0,05) povečanje števila prelomov verig DNK (Sl. 15/A) pri koncentraciji 250 μg/ml, medtem ko smo opazili od koncentracije odvisno povečanje nastanka oksidiranih purinov (Sl. 15/B), ki je bilo statistično značilno (*p < 0,05) pri koncentracijah 100 in 250 μg/ml v primerjavi s kontrolami. Po drugi strani pa neobsevani TiO₂-B ni povzročil statistično značilnega povečanja (*p < 0,05) števila prelomov DNK in nastanka oksidiranih purinov pri nobeni koncentraciji (Sl. 15/C in D).

Pri celicah HepG2, ki so bile izpostavljene TiO₂-N takoj po obsevanju, smo opazili povečan odstotek DNK v repu kometa (Sl. 15/A), ki je bilo statistično značilno (*p < 0,05) pri

izpostavitvi koncentraciji delcev 250 µg/ml. Nastanek oksidiranih purinov pri izpostavitvi celic delcem TiO₂-N pa smo opazili pri koncentracijah 100 in 250 µg/ml (Sl. 15/B). Izpostavitve celic TiO₂-B, ki smo ga uporabili takoj po obsevanju z UV-A svetlobo, je pri koncentracijah 100 in 250 µg/ml povzročila od koncentracije odvisno povečanje števila prelomov DNK (Sl. 15/C) in števila oksidiranih purinov (Sl. 15/D).

Izpostavitve celic HepG2 TiO₂-N in TiO₂-B, ki smo ga po obsevanju shranili za 1 in 7 dni v temi, je pri koncentracijah 100 in 250 µg/ml povzročilo statistično značilno (*p < 0,05) povečanje odstotka DNK v repu komet (Sl. 15/A in C). Pri izpostavitvi celic HepG2 obsevanemu TiO₂-N po 1 dnevu v temi smo opazili statistično značilen (*p < 0,05), od koncentracije odvisen porast nivoja oksidiranih purinov pri koncentracijah nad 10 µg/ml. Podobno je obsevani TiO₂-N, ki smo ga shranili za 7 dni v temo, povzročil nastanek oksidiranih purinov pri vseh koncentracijah delcev (Sl. 15/B). Izpostavitve celic delcem TiO₂-B, ki smo ga po obsevanju shranili za 1 in 7 dni v temo, je po 24-urni izpostavitvi povzročil statistično značilno povečanje oksidiranih purinov pri koncentracijah nad 10 µg/ml (Sl. 15/D).

Rezultati modificiranega testa komet kažejo na to, da nanodelci TiO₂-N in podmikronski delci TiO₂-B, ki smo jih pred-obsevali z UV-A svetlobo, povzročijo več poškodb DNK od neobsevanih delcev. Največ poškodb DNK smo opazili pri izpostavitvi celic HepG2 delcem TiO₂-N in TiO₂-B takoj po obsevanju, manj po 1 dnevu v temi, še manj po 7 dneh v temi in najmanj poškodb DNK pri izpostavitvi neobsevanim delcem.

5 RAZPRAVA

Uporaba nanodelcev se v različnih proizvodih povečuje, zato je zelo pomembno oceniti varnost njihove uporabe. Med najpogosteje uporabljenimi nanodelci so nanodelci TiO₂. Leti imajo edinstvene lastnosti, ki jih izkoriščajo številne aplikacije na najrazličnejših področjih, kot so npr. uporaba v prehrani, zdravilih, kozmetiki itn. V zadnjih letih je čedalje bolj zanimiva tudi fotokatalitska aktivnost TiO₂, česar posledica je nastanek reaktivnih radikalov, ki lahko razgrajujejo organske snovi. Danes se tudi te lastnosti TiO₂ izkoriščajo v različne namene, kot je npr. detoksifikacija vode in zraka, samočistilne in sterilizacijske površine ter preprečevanje rošenja stekel in ogledal (Fujishima in sod., 2000, 2008). Zaradi povečanega povpraševanja delež proizvedenih nanodelcev TiO₂ glede na ves proizveden TiO₂ narašča. Letna proizvodnja TiO₂ je leta 2009 presegala 4 milijone ton, pri čemer je proizvodnja nanodelcev TiO₂ predstavljala 2,5 % vse proizvodnje, predvideva pa se, da bo do leta 2015 dosegla kar 10 % vse proizvodnje TiO₂ (Robichaud in sod., 2009). To je lahko problematično, saj so iste lastnosti, zaradi katerih so nanodelci TiO₂ tako zanimivi, lahko odgovorne za njihove potencialne neželene toksične učinke. Toksičnost nanodelcev TiO₂ so raziskovali v številnih *in vitro* in *in vivo* študijah, vendar so rezultati večine nasprotujoči in jih je zaradi nezadostne karakterizacije fizikalno-kemijskih lastnosti nanodelcev TiO₂ težko razložiti. Poleg tega je tudi pomanjkanje raziskav na področju daljše izpostavljenosti delcem TiO₂, rakotvornosti, toksikokinetike, epidemiologije itn. (Shi in sod., 2013; Singh in sod., 2009). Predvsem pa ne poznamo toksikoloških lastnosti fotoaktiviranih delcev TiO₂ kot tudi ne trajanja učinka fotoaktivacije. Zato je bil namen našega magistrskega dela določitev in primerjava citotoksičnega in genotoksičnega delovanja neobsevanih in fotoaktiviranih (z UV-A pred-obsevanih) delcev TiO₂, katerim smo testni sistem, celice HepG2, izpostavili takoj po obsevanju oziroma po 1 ali 7 dneh v temi. Pri tem smo uporabili nanodelce TiO₂-N in podmikronske delce TiO₂-B. Citotoksičnost smo preverjali s testom MTT, test komet pa smo uporabili za določanje genotoksičnega vpliva delcev TiO₂, to je prelomov verig DNK ter tudi oksidativnih poškodb, ki smo jih določili z modificiranim testom komet.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da neobsevani nanodelci TiO₂-N ne vplivajo na preživetje celic HepG2, medtem ko so neobsevani podmikronski delci TiO₂-B pri najvišji testirani koncentraciji 250 µg/ml po 24- in 48-urni izpostavljenosti znižali preživetje celic

HepG2 za približno 14 % v primerjavi s kontrolnimi celicami. Podobno so ugotovili Lankoff in sod. (2012), saj nanodelci TiO₂ anataz/rutil (21 nm) niso bili citotoksični za celice HepG2. Prav tako Wang in sod. (2011) niso opazili zmanjšanja preživetja po tretiranju celic HepG2 z nanodelci TiO₂ velikosti 42 nm. Ravno nasprotno pa so ugotovili Park in sod. (2008), saj so nanodelci TiO₂, velikosti 21 nm zmanjšali preživetje bronhialnih epiteljskih celic (BEAS-2B). Literaturni podatki o vplivu neobsevanih delcev TiO₂ na preživetje celic kažejo na to, da velikost delcev TiO₂ in specifična površina nista najpomembnejša pokazatelja toksičnosti in da posledično manjši delci niso praviloma bolj toksični od večjih delcev TiO₂ (Guichard in sod., 2012). Poleg velikosti delcev in specifične površine na biološki učinek delcev TiO₂ pomembno vplivajo še oblika, naboj in agregacijske lastnosti (Handy in sod., 2008a). Čeprav so v naši raziskavi primarni kristali nanodelcev TiO₂-N manjši v primerjavi s podmikronskimi delci TiO₂-B, je razlog za opaženo večjo citotoksičnost večjih delcev TiO₂-B lahko razlika v njihovi obliki struktur (agregati, aglomerati) in koloidnih lastnostih v raztopini, to je zeta potencial in disperzibilnost. TiO₂-B in TiO₂-N imata v vodi zelo različen zeta potencial, medtem ko je razlika v mediju relativno majhna in predstavlja za TiO₂-B -13,5 mV in za TiO₂-N -8,7 mV, kar je posledica visoke ionske jakosti zaradi visokih koncentracij elektrolitov in prisotnih proteinov v mediju. Poleg tega delci TiO₂-B v raztopini tvorijo mehke aglomerate, medtem ko TiO₂-N tvorijo sicer manjše, ampak zelo čvrste agregate. Podobno so ugotovili tudi Gurr in sod. (2005), saj so delci nano velikosti v mediju tvorili agregate velike 1000 nm, medtem ko večji delci niso agregirali. Tudi Lankoff in sod. (2012) so ugotovili, da so delci TiO₂ anataz/rutil (21 nm) tvorili čvrste agregate, kar je vplivalo na vnos in interakcije delcev s celicami HepG2. Pri delcih TiO₂-N lahko opazimo tudi, da se hitreje usedajo na dno in so slabo dispergirani v primerjavi s TiO₂-B, ki so v raztopini stabilni več dni. Tovrstne lastnosti so pomembne pri biološkem učinku, saj so bolj dispergirani delci TiO₂-B v primerjavi z manj dispergiranimi delci TiO₂-N bolj razpršeni v mediju in dostopni za celice HepG2 ter lahko posledično povzročijo tudi več poškodb celic, med drugim tudi poškodbe celične membrane, ki vodijo v celično smrt in citotoksičnost delcev TiO₂-B.

Neobsevani nanodelci TiO₂-N so pri 4- in 24-urni izpostavitvi in koncentracijah delcev 100 in 250 µg/ml povzročili oksidativne poškodbe, medtem ko so bili podmikronski delci TiO₂-B genotoksični le pri 4-urni izpostavitvi najvišji koncentraciji delcev. 4- in 24-urna

izpostavljenost celic HepG2 delcem TiO₂-N, je povzročila več oksidativnih poškodb kot TiO₂-B. Podobno so ugotovili tudi Gurr in sod. (2005), saj je TiO₂ anataz (10 in 20 nm) povzročil oksidativne poškodbe DNK v odsotnosti svetlobe pri celicah BEAS-2B. Guichard in sod. (2012) so ugotovili, da so anatazni delci TiO₂ (14 nm) povzročili nastanek večjega števila ROS v primerjavi z večjimi anataznimi delci TiO₂ (160 nm), zaradi česar lahko posledično manjši delci TiO₂ povzročijo tudi več oksidativnih poškodb, kot večji delci TiO₂. Tudi Reeves in sod. (2008) so ugotovili, da so neobsevani anatazni delci TiO₂ (5 nm) genotoksični za celice kože rib (GFSk-S1) in povzročijo nastanek oksidiranih purinov. Razlog opažene večje genotoksičnosti delcev TiO₂-N je verjetno v razliki med velikostmi primarnih kristalov TiO₂-N in TiO₂-B ter posledično v velikosti specifične površine (129,3 m²/g za TiO₂-N in 8,6 m²/g za TiO₂-B). Z zmanjševanjem velikosti delca pride namreč do številnih strukturnih sprememb površine, spremenjenih električnih lastnosti in reaktivnih skupin na površini delca, ki lahko delujejo kot katalitično aktivna mesta, in povzročijo nastanek večjega števila ROS in oksidativnega stresa v primerjavi z večjimi delci (Oberdörster in sod., 2005; Nel in sod., 2006). Delci TiO₂-N v raztopini tvorijo čvrste agregate, vendar jih je verjetno nekaj še prostih in lahko zaradi majhnosti in posledično površinske reaktivnosti povzročijo nastanek večjega števila ROS in več oksidativnih poškodb kot delci TiO₂-B. TiO₂-N lahko zaradi njihove majhne velikosti tudi lažje prehajajo celično membrano in so v celici v citoplazmi in v veziklih, kjer lahko povzročijo nastanek ROS, ter tako lažje poškodujejo celične komponente od večjih delcev, ki ostanejo na zunanji strani celične membrane (Shukla in sod., 2011). Posledično so neobsevani delci TiO₂-N bolj genotoksični od delcev TiO₂-B. Hkrati pa so delci TiO₂-B v mediju bolj dispergirani od delcev TiO₂-N in so biološke dostopnejši ter lahko v stiku s celicami povzročijo poškodbe celične membrane. Zaradi tega delci TiO₂-B delujejo na celice HepG2 bolj citotoksično kot delci TiO₂-N, povzročijo pa tudi oksidativne poškodbe DNK, čeprav so večji od TiO₂-N in imajo manjšo specifično površino kot le-ti. Iz rezultatov nastanka oksidativnih poškodb DNK lahko sklepamo, da delci TiO₂ v celicah povzročajo nastanek oksidativnega stresa, katerega pomembna tarča so nukleinske kisline (Wamer in sod., 1997). Prisotnost delcev TiO₂ v celici povzroči povečanje aktivnosti celičnih antioksidativnih procesov in povečanje nivoja glutationa, ki odstranjuje škodljive ROS. Ko antioksidativna obramba ne zadostuje več, nastanejo oksidativne poškodbe DNK, kar vodi v genotoksičnost (Petković in sod., 2011a, 2011b).

Po drugi strani pa so obsevani delci TiO₂ obeh velikosti delovali citotoksično in so zmanjšali preživetje celic že po 4 urah izpostavitve, kar se s časom izpostavitve še povečuje. Rezultati se ujemajo z ugotovitvami Petković in sod. (2011a), ki so zaznali zmanjšanje preživetja celic že po 4 urah izpostavitve delcem TiO₂-N in TiO₂-B. Prav tako smo ugotovili, da se genotoksično delovanje delcev TiO₂ obeh velikosti po obsevanju zelo poveča. Po obsevanju TiO₂-N smo zaznali nastanek prelomov DNK le pri najvišji koncentraciji delcev in nastanek oksidativnih poškodb DNK že pri koncentraciji delcev 10 µg/ml, medtem ko so fotokatalitsko aktivirani podmikronski delci TiO₂-B po obsevanju z UV-A svetlobo pri koncentraciji delcev 10 µg/ml in 4-urni izpostavitvi povzročili nastanek prelomov in oksidativnih poškodb DNK. Glavni dejavnik fotoreaktivnosti in akutne celične toksičnosti je najverjetneje zmožnost TiO₂, da tvori radikale. Tudi brez svetlobe lahko TiO₂ tvori radikale, tvorba pa se še poveča, ko ga obsevamo z UV svetlobo (Sayes in sod., 2006; Nel in sod., 2006), zaradi česar so obsevani delci TiO₂-N in TiO₂-B povzročili več poškodb DNK od neobsevanih delcev. Po obsevanju TiO₂-N in TiO₂-B je obseg nastalih oksidativnih poškodb, ki jih povzročajo delci različnih velikosti, bolj primerljiv, saj fotokatalitični učinek prevladuje nad velikostjo delcev in njihov toksičen potencial glede na velikost ni več različen. V literaturi najdemo podatke, da je velikost delcev v celičnem mediju nasploh slab pokazatelj dejanske velikosti delcev in posledično tudi slab pokazatelj za napoved toksičnosti delcev (Adams in sod., 2006), kar je razvidno tudi iz naših rezultatov. Ugotovili smo tudi, da je obsevani TiO₂-N po 24 urah izpostavitve povzročil nekoliko več prelomov in tudi oksidativnih poškodb pri najvišjih koncentracijah delcev v primerjavi s 4-urno izpostavitvijo. Sklepamo lahko, da popravljalni mehanizmi niso uspeli popraviti nastalih poškodb DNK. Morebitni razlog je lahko, da delci TiO₂ vplivajo na antioksidativne obrambne sisteme in zmanjšajo učinkovitost odstranjevanja [•]OH radikalov (Zou in sod., 2013). Ravno nasprotno pa smo ugotovili pri TiO₂-B, kjer se po 24 urah prelomi verig pri najnižjih koncentracijah, ki so bili prisotni po 4 urah, ne pojavijo, prav tako pa se zmanjšajo tudi oksidativne poškodbe DNK. Zmanjšanje števila poškodb DNK je verjetno posledica delovanja popravljalnih mehanizmov, ki popravijo nastale poškodbe. Radikali povzročajo različne oksidativne poškodbe DNK, med drugim tudi 8-OH gvanine, FapyAde in FapyGua, ki jih prepozna encim Fpg in zaradi endonukleazne aktivnosti na teh mestih tudi reže. Različne poškodbe se popravljajo z različno kinetiko glede na vrsto poškodbe. Razpolovni čas potreben za odstranitev oksidativnih poškodb iz poškodovane DNK v humanih

fibroblastih pri 37 °C je za 8-OH gvanine 55 minut (Jaruga in Dizdaroglu, 1996). Razlike med genotoksičnim delovanjem delcev TiO₂-N in TiO₂-B kažejo na različen mehanizem škodljivega delovanja, ki pa je zaradi pomanjkanja raziskav na tem področju nepoznan.

V nadaljevanju magistrskega dela smo želeli določiti trajanje škodljivega učinka predobsevanih delcev TiO₂-N in TiO₂-B in ga tudi primerjati z rezultati neobsevanih in takoj po obsevanju. Zato smo delce po obsevanju z UV-A svetlobo shranili za 1 in 7 dni v temo. Ugotovili smo, da se citotoksičnost delcev TiO₂-N in TiO₂-B po 1 dnevu v temi ohrani in je manjša od citotoksičnosti delcev, ki smo jih izpostavili celicam takoj po obsevanju. Poleg tega, podobno kot pri izpostavitvi delcev celicam HepG2 takoj po obsevanju, nismo opazili velike razlike med citotoksičnostjo delcev TiO₂-N in TiO₂-B.

Kar se tiče genotoksičnega delovanja delcev TiO₂ po 1 dnevu v temi, smo ugotovili, da se je genotoksičnost delcev TiO₂-N in TiO₂-B ohranila. Delci TiO₂-N so pri nekaterih koncentracijah povzročili celo več prelomov DNK in oksidativnih poškodb kot delci takoj po obsevanju. Delci TiO₂-B pa so že pri najnižji koncentraciji po 4 urah izpostavitve povzročili nastanek prelomov DNK in oksidativne poškodbe, ki so bile po 24 urah izpostavitve večje od poškodb, ki smo jih zaznali po izpostavitvi delcem takoj po obsevanju. Opazili smo manjše razlike v genotoksičnosti med delci TiO₂-N in TiO₂-B, ki pa so kljub temu primerljive.

Delci TiO₂-N, ki smo jih po obsevanju za 7 dni spravili v temo in nato izpostavili celice HepG2, so pri koncentracijah 100 in 250 µg/ml le po 24-urni izpostavitvi zmanjšali preživetje celic za približno 10 %. Podobno so tudi delci TiO₂-B zmanjšali preživetje celic le po 24-urni izpostavitvi, vendar le pri najvišji koncentraciji delcev. Citotoksičnost delcev TiO₂-N in TiO₂-B po 7 dneh v temi je primerljiva z neobsevanimi delci. Hkrati pa smo s testom MTT, ki meri dehidrogenazno aktivnost živih celic, opazili povečanje metabolične aktivnosti celic HepG2 po 48-urni izpostavitvi delcev TiO₂-N. Verjetno je vzrok opaženega pojava nastanek celičnega stresa, povzročenega zaradi delcev TiO₂-N, ki lahko prehajajo celično membrano in delujejo na različne procese v celici.

Raven oksidativnih poškodb DNK, ki so jih povzročili obsevani delci po 7 dneh v temi, je manjša od ravni, ki so jo povzročili delci takoj po obsevanju oziroma delci, ki so bili 1 dan v temi, vendar nekoliko večja od ravni, ki so jo povzročili neobsevani delci TiO₂. Delci TiO₂-N so že po 4 urah izpostavitve povzročili prelome DNK in oksidativne poškodbe, ki so bile po 24 urah še izrazitejše, genotoksičnost pa smo opazili že pri najnižji koncentraciji delcev. Delci TiO₂-B pa so že pri najnižji koncentraciji po 4-urni izpostavitvi povzročili nastanek oksidativnih poškodb DNK, ki pa so bile po 24 urah izpostavitve statistično značilne pri koncentracijah večjih od 10 µg/ml. Ugotovitve se ujemajo z rezultati Xia in sod. (2006), ki so s pomočjo nanobiosenzorja v raztopini določili produkcijo H₂O₂. TiO₂ je še po 1 dnevu proizvedel veliko število H₂O₂, malo manj po 7 dneh, manjše a zaznavne količine pa še po 21 dneh (Xia in sod., 2006). Sposobnost produkcije radikalov na delcih TiO₂ s časom upada in posledično tudi število oksidativnih poškodb DNK. Hkrati pa rezultati kažejo na učinkovito odstranjevanje ROS in popravilo poškodb, ki kljub povečanemu številu oksidativnih poškodb in prelomov verig DNK ne vodijo v celično smrt. Nepoškodovan popravljalni sistem je pomembna komponenta celice, saj vzdržuje homeostazo in preprečuje hujše poškodbe komponent celic, ki bi v nasprotnem primeru vodile v citotoksičnost, apoptozo in nekrozo celic ali razvoj karcinogeneze.

Poškodbe DNK med obsevanimi TiO₂-N in TiO₂-B so kljub različnim velikostim primerljive, kar kaže na skupni mehanizem škodljivega delovanja delcev. Fotokatalitični učinek delcev se po končanem obsevanju ohrani in najverjetneje povzroči nastajanje ROS, ki imajo škodljive učinke na celice. Tudi Zou in sod. (2013) so po 12-urnem obsevanju enoceličnih organizmov *T. pyriformis* izpostavljenih nizki koncentraciji delcev TiO₂ z vidno svetlobo in nato 6-urni inkubaciji v temi še vedno zaznali povečano aktivnost antioksidativnih encimov. Vendar gre v tem primeru za hkratno obsevanje celic in delcev TiO₂, pri čemer ne moremo izključiti tudi neposrednega škodljivega delovanja UV svetlobe na celice. V našem primeru lahko izključimo neposredno delovanje UV svetlobe na celice HepG2, saj so bile celice TiO₂ izpostavljene šele po končanem obsevanju. Glede na dostopno literaturo je to prvi primer preučevanja podaljšanega škodljivega delovanja delcev TiO₂ po prenehanju obsevanja z UV-A svetlobo.

Zaključimo lahko, da se fotoreaktivnost delcev TiO₂ ohrani relativno dolgo po končanem obsevanju z UV-A svetlobo, saj so bili delci TiO₂-N in TiO₂-B po 1 dnevu v temi še citotoksični in genotoksični, medtem pa se je citotoksičnost delcev močno zmanjšala po 7 dneh v temi in je bila primerljiva učinku neobsevanih delcev. Pri tem pa se je genotoksičnost le delno zmanjšala, najmanj v primeru 24 h izpostavljenosti delcem TiO₂-N, ko smo genotoksičnost delcev TiO₂-N zaznali že pri najnižji koncentraciji delcev. Podobno so ugotovili tudi ob obsevanju TiO₂ filmov z UV svetlobo, pri čemer nastanejo hidrofilne površine. Tudi ko so TiO₂ film spravili za nekaj dni v temo, se je visoka hidrofilnost površine ohranila, po daljši hrambi v temi pa je površina postala spet hidrofobna (Fujishima in sod., 2000; Hashimoto in sod., 2005). Razloga, zakaj so delci TiO₂-N in TiO₂-B citotoksični in genotoksični še toliko časa zaradi pomanjkanja raziskav na tem področju ne poznamo. Potrebna pa bodo nadaljnja preučevanja in natančnejša določitev mehanizmov in trajanja škodljivega delovanja.

Ena izmed aplikacij TiO₂-N, za katero so naše ugotovitve zelo pomembne, je uporaba TiO₂ v sončnih kremah. Naloga delcev TiO₂ je zaščita kože pred škodljivimi UV žarki, hkrati pa so delci v stiku s celicami kože, kjer lahko ostanejo tudi več ur in dni po prenehanju izpostavljenosti sončni svetlobi. Raziskave so pokazale, da delci v primeru poškodovane in opečene kože prehajajo globlje v SC, poleg tega lahko delci TiO₂ ostanejo na koži dolgo časa tudi po spiranju. Koncentracija TiO₂ v sončnih kremah je 3 – 15 %, torej, če uporabimo 5 ml kreme, je to 150 – 750 mg. Pri 3 % TiO₂ v kremi to predstavlja koncentracijo 30 mg/ml (Monteiro-Riviere in sod., 2011; Shukla in sod., 2011). Mi smo pri preučevanju citotoksičnega in genotoksičnega vpliva delcev TiO₂ uporabili največjo koncentracijo 0,25 mg/ml, kar predstavlja tudi realno koncentracijo delcev, ki smo ji lahko izpostavljeni z uporabo sončnih krem. Obsevani delci TiO₂-N in tudi TiO₂-B pri koncentraciji 0,25 mg/ml so bili citotoksični in genotoksični za celice HepG2. Škodljivo delovanje pa se je ohranilo tudi po 1 dnevu v temi, zaradi česar njihova uporaba v sončnih kremah ni popolnoma varna. Z zavedanjem potencialne toksičnosti delcev raziskovalci razvijajo nove oblike in načine uporabe delcev TiO₂, pri katerih se zmanjša njihova toksičnost. Tako je TiO₂ za uporabo v sončnih kremah pogosto prevlečen z namenom, da se zmanjša njegova reaktivnost, medtem ko obdrži lastnosti absorpcije UV svetlobe. Pri ocenjevanju toksičnosti je potrebno oceniti tudi varnost prevleke, ki obdaja delce, saj le-ta vpliva na površinske lastnosti in posledično

interakcije z drugimi biološkimi molekulami in celicami, zato je nujno preučiti tudi obstojnost prevleke in možen vnos v celice (Nel in sod., 2006; Oberdörster in sod., 2007). Še en zelo pomemben aspekt je spiranje delcev po uporabi krem in drugih proizvodov ter nalaganje le-teh v tleh in vodah, kjer so podnevi izpostavljeni sončni svetlobi in ves čas, tudi ponoči, v stiku z različnimi organizmi. Iz tega razloga je bistvenega pomena proučiti podaljšano škodljivo delovanje delcev TiO₂ tudi po končanem obsevanju.

Nanotoksikologija bo imela pomembno vlogo pri trajnostnem in varnem razvoju nanotehnologije v prihodnosti. Razumevanje povezav med lastnostmi, ki določajo toksičnost, in biološkimi sistemi bo omogočila razvoj nanodelcev, ki bodo manj škodljivi za okolje in organizme. Magistrsko delo predstavlja nov, pomemben del preučevanja toksičnosti delcev TiO₂, ki do sedaj ni bil opažen. Podaljšano škodljivo delovanje delcev po končanem obsevanju glede na dostopno literaturo namreč še ni bilo preučevano. Naše ugotovitve na tem področju so presenetljive in hkrati zaskrbljujoče. Toksičnost delcev TiO₂ se je tudi po končanem obsevanju z UV-A svetlobo ohranila, delci pa so bili tako škodljivi še najmanj 1 dan. Naši rezultati napovedujejo nov pogled na toksičnost delcev TiO₂ in na področje, ki je še popolnoma neraziskano, ter poudarjajo pomembnost nadaljevanja raziskav na tem področju. Potrebno bo natančneje določiti čas toksičnega delovanja in mehanizme, ki povzročajo škodljive učinke na celice tudi po končanem obsevanju. V prihodnosti nas čakajo dosežki v razvoju nanotehnologije, ki nas bodo brez dvoma navduševali in hkrati vzbujali skrb, saj lahko pomembno vplivajo na naše zdravje, ki pa je najpomembnejša vrednota našega življenja.

6 SKLEPI

- Neobsevani nanodelci titanovega dioksida (TiO₂-N) niso vplivali na preživetje celic HepG2, medtem ko so delci titanovega dioksida podmikronske velikosti (TiO₂-B) zmanjšali preživetje celic HepG2 pri najvišji testirani koncentraciji. Neobsevani delci TiO₂-N in TiO₂-B so pri koncentracijah 100 in 250 µg/ml na celice HepG2 delovali tudi genotoksično, saj so povzročili oksidativne poškodbe in tudi prelome verig molekul DNK.
- Po pred-obsevanju z UV-A svetlobo se je citotoksičnost in genotoksičnost delcev TiO₂ obeh velikosti močno povečala. Največje citotoksične in genotoksične učinke smo opazili takoj po obsevanju. Po 1 dnevu v temi se je citotoksičnost in genotoksičnost delcev TiO₂-N in TiO₂-B ohranila in je bila primerljiva med delci obeh velikosti. Po 7 dneh v temi se je citotoksičnost delcev TiO₂ zmanjšala na vrednost citotoksičnosti neobsevanih delcev, genotoksičnost delcev TiO₂ pa se je ohranila in so delci po 7 dneh v temi povzročili več oksidativnih poškodb kot neobsevani delci TiO₂.
- Citotoksičnost in genotoksičnost z UV-A svetlobo aktiviranih delcev TiO₂-N in TiO₂-B ni odvisna le od velikosti delcev, saj so nanodelci in podmikronski delci TiO₂ povzročili primerljive poškodbe.
- Naše ugotovitve potrjujejo povečano reaktivnost anataznih delcev TiO₂ po pred-obsevanju z UV-A, kot tudi njihovo podaljšano škodljivo delovanje, ki ni odvisno od velikosti delcev. To je izjemno pomemben prispevek dosedanjim raziskavam toksičnosti TiO₂, ki poudarja pomembnost nadaljevanja raziskav na tem področju.
- Delovno hipotezo smo z našo raziskavo potrdili, saj se je citotoksičnost in genotoksičnost pred-obsevanih delcev TiO₂ določen čas po končanem obsevanju z UV-A svetlobo ohranila.

7 POVZETEK

Uporaba nanotehnologije se povečuje, saj imajo nanodelci zaradi izjemnih lastnosti veliko uporabnost v različnih aplikacijah. V industriji je zaradi učinkovite fotokatalize, visoke stabilnosti in nizke cene pogosto uporabljen material titanov dioksid (TiO₂). Delce TiO₂ uporabljamo za čiščenje vode in zraka, uporabljajo se tudi v proizvodnji kozmetike, hrane, v farmacevtskih izdelkih itn. Vedno pogosteje pa ugotavljamo, da so ravno te lastnosti, ki omogočajo tako široko uporabo nanodelcev TiO₂, tudi vzrok številnim škodljivim vplivom na celice. Znano je tudi, da se toksičnost nanodelcev TiO₂ močno poveča, če jih obsevamo z UV svetlobo. Čeprav testiranja potencialnih negativnih učinkov TiO₂ na zdravje ljudi potekajo že nekaj let, naše znanje o njihovih morebitnih toksičnih učinkih ostaja omejeno. Kljub velikemu številu objavljenih raziskav v večini le-teh delci niso ustrezno karakterizirani, zaradi česar je vprašljiva interpretacija rezultatov, onemogočena pa je tudi primerljivost različnih raziskav. Poleg tega pa je zelo malo znanega o toksičnosti fotoaktiviranih delcev in tudi o trajanju učinka. Zato je bil cilj magistrskega dela določitev in primerjava citotoksičnega in genotoksičnega delovanja neobsevanih in z UV-A predobsevanih (foto-aktiviranih) anataznih nanodelcev (TiO₂-N) in podmikronskih delcev (TiO₂-B) kot tudi določitev trajanja potencialnega učinka fotoaktivacije. Citotoksičnost smo ugotavljali s testom MTT, genotoksičnost s testom komet, kot testni sistem pa smo uporabili človeške jetrne celice HepG2. Celice smo izpostavili neobsevanim delcem, pred-obsevanim delcem takoj po obsevanju in pred-obsevanim delcev, ki so bili 1 dan oziroma 7 dni v temi. Ugotovili smo, da so neobsevani delci TiO₂-N in TiO₂-B genotoksični za celice HepG2 (predvsem TiO₂-N), delci TiO₂-B pa so pri najvišji testirani koncentraciji tudi citotoksični. Toksičnost delcev obeh velikosti se je po obsevanju z UV-A svetlobo močno povečala. Citotoksičnost in genotoksičnost delcev je bila največja takoj po obsevanju, primerljivi so bili tudi citotoksični in genotoksični učinki po 1 dnevu v temi. Po 7 dneh v temi se je citotoksičnost delcev TiO₂ zmanjšala na vrednost citotoksičnosti neobsevanih delcev, genotoksičnost delcev TiO₂ pa se je ohranila in so delci po 7 dneh v temi povzročili več oksidativnih poškodb kot neobsevani delci TiO₂. Iz dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da se toksično delovanje delcev TiO₂ po obsevanju z UV-A močno poveča ne glede na velikost delcev ter da se povečana reaktivnost ohrani najmanj 1 dan tudi po končanem obsevanju. Zaključimo lahko, da delci TiO₂-N niso bolj toksični od delcev TiO₂-B in hkrati potrdimo

hipotezo o podaljšanem toksičnem delovanju delcev TiO₂-N in TiO₂-B. Rezultati naše naloge so pomembni in zaskrbljujoči, ker podmikronski delci TiO₂ veljajo kot varni za uporabo, hkrati pa je izpostavljenost ljudi in drugih živih bitij fotokatalitsko aktiviranim delcem TiO₂ zelo obsežna. Tako naše ugotovitve spremenijo dosedanje védenje o potencialni toksičnosti TiO₂, so izjemnega pomena za ocenjevanje ter omejevanje tveganja za ljudi in poudarjajo pomembnost nadaljevanja raziskav na tem področju.

8 VIRI

- Adams L.K., Lyon D.Y., Alvarez P.J.J. 2006. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂ and ZnO water suspensions. *Water Research*, 40, 19: 3527-3532
- Aden D.P., Fogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowles B.B. 1979. Controlled synthesis of HBS Ag in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282: 615-616
- Altogen Biosystems. 2013. HepG2 transfection reagent (Hepatocellular carcinoma). Las Vegas, Altogen Biosystems.
<http://www.altogen.com/hepg2.php> (junij 2013)
- Benedix R., Dehn F., Quaas J., Orgass M. 2000. Application of titanium dioxide photocatalysis to create self-cleaning building materials. *Lacer*, 5: 157-168
- Boiteux S., Gajewski E., Laval J., Dizdaroglu M. 1992. Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (Formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*, 31, 1: 106-110
- Borm P.J.A., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Wolfgang K., Lademann J., Krutmann J., Warheit D., Oberdorster E. 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology*, 3, 11: 35 str.
- Brezová V., Gabčová S., Dvoranová D., Staško A. 2005. Reactive oxygen species produced upon photoexcitation of sunscreens containing titanium dioxide (an ERR study). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 79, 2: 121-134
- Brown T. in Brown T. (Jr.). 2014. *Nucleic Acids Book*. United Kingdom, ATD bio.
<http://www.atdbio.com/content/15/Mutagenesis-and-DNA-repair> (februar, 2014)
- Caballero L., Whitehead K.A., Allen N.S., Verran J. 2009. Inactivation of *Escherichia coli* on immobilized TiO₂ using fluorescent light. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 202: 92-98
- Cadenas E. 2004. Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Molecular Aspects of Medicine*, 25: 17-26
- Cadet J., Sage E., Douki T. 2005. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571: 3-17
- Chen J.L. in Fayerweather W.E. 1988. Epidemiologic study of workers exposed to titanium dioxide. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 30, 12: 937-942

- Chung K.H., Jung H.Y., Lee Y.W., Lee K.Y. 2010. Preparation of TiO₂-loaded nanocapsules and their sun protection behaviors. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 16: 261-266
- Collins A.R. in Dušinská M. 2002. Oxidation of cellular DNA measured with the comet assay. *Oxidative Stress Biomarkers and Antioxidant Protocols, Methods in Molecular biology*, 186: 147-159
- Collins R.C., Ai-guo M., Duthie S.J. 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research/DNA Repair*, 336, 1: 69-77
- Collins A., Dušinská M., Franklin M., Somorovská M., Petrovská H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Rašlová K., Vaughan N. 1997a. Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 30, 2: 139-146
- Collins A.R., Dušinská M., Gedik C.M., Štětina R. 1996. Oxidative damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*, 104, 3: 465-469
- Collins A.R., Dobson V.L., Dušinská M., Kennedy G., Štětina R. 1997b. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 375, 2: 183-193
- Doungdong D., Ramsden J., Grätzel M. 1982. Dynamics of interfacial electron-transfer processes in colloidal semiconductor systems. *Journal of American chemical society*, 104, 11: 2977-2985
- FAME Pharmaceuticals. 2010. The test of the anti-tumoural effectiveness of the preparation Biocrush® in vitro. Burma, FAME
<http://www.famepharma.com/scientific-biocrush.htm> (junij 2013)
- Feng X., Zhai J., Jiang L. 2005. The fabrication and switchable superhydrophobicity of TiO₂ nanorod films. *Angewandte Chemie International Edition*, 44, 32: 5115-5118
- Foster H.A., Ditta I.B., Varghese S., Steele A. 2011. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Applied Microbiology and biotechnology*, 90, 6: 1847-1868
- Fox M.A. 1983. Organic heterogeneous photocatalysis: chemical conversions sensitized by irradiated semiconductors. *Accounts of Chemical Research*, 16, 9: 314-321
- Fujishima A., Rao T.N., Tryk D.A. 2000. Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 1, 1: 1-21
- Fujishima A., Zhang X., Tryk D.A. 2008. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports*, 63: 515-582

- Geiser M., Casaulta M., Kupferschmid B., Schulz H., Semmler-Behnke M., Kreyling W. 2008. The role of macrophages in the clearance of inhaled ultrafine titanium dioxide particles. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38: 371-376
- Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N., Schürch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Hof V.I., Heyder J., Gehr P. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environmental Health Perspectives*, 113, 11: 1555-1560
- Guichard Y., Schmit J., Darne C., Gaté L., Goutet M., Rousset D., Rastoix O., Wrobel R., Witschger O., Martin A., Fierro V., Binet S. 2012. Cytotoxicity and genotoxicity of nanosized and microsized titanium dioxide and iron oxide particles in Syrian hamster embryo cells. *The Annals of Occupational Hygiene*, 56, 5: 631-644
- Gurr J.R., Wang A.S.S., Chen C.H., Jan K.Y. 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213: 66-73
- Hahn A., Fuhlrott J., Loos A., Barcikowski S. 2012. Cytotoxicity and ion release of alloy nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 14: 686-696
- Handy R.D., Kammer F., Lead J.R., Hassellöv M., Owen R., Crane M. 2008b. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17, 4: 287-314
- Handy R.D., Owen R., Valsami-Jones E. 2008a. The ecotoxicology of nanoparticle and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17, 5: 315-325
- Harris A.J., Dial S.L., Casciano D.A. 2004. Comparison of basal gene expression profiles and effects of hepatocarcinogens on gene expression in cultured primary human hepatocytes and HepG2 cells. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 549: 79-99
- Hart G.A. in Hesterberg T.W. 1998. In vitro toxicity of respirable-size particles of diatomaceous earth and crystalline silica compared with asbestos and titanium dioxide. *Journal of Occupational & Environmental Medicine*, 40,1: 29-42
- Hashimoto K., Irie H., Fujishima A. 2005. TiO₂ photocatalysis: a historical overview and future prospects. *Japanese Journal of Applied Physics*, 44, 12: 8269-8285
- Hazra T.K., Izumi T., Venkataraman R., Kow Y.W., Dizdaroglu M., Mitra S. 2000. Characterization of a novel 8-oxoguanine-DNA glycosylase activity in *Escherichia coli* and identification of the enzyme as endonuclease VIII. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 36: 27762-27767

- Hoet P.H.M., Brüske-Hohlfeld I., Salata O.V. 2004. Nanoparticles - known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology*, 2, 12: 1-15
- Hsiao I.L. in Huang Y.J. 2011. Effects of various physicochemical characteristics on the toxicities of ZnO and TiO₂ nanoparticles toward human lung epithelial cells. *Science of the Total Environment*, 409, 7: 1219-1228
- 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., Pairon 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: 142-149
- IARC. 2006. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, International Agency for Research on Cancer: 452 str.
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol93/> (julij 2013)
- Iavicoli I., Leso V., Fontana L., Bergamaschi A. 2011. Toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles: a review of *in vitro* mammalian studies. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 15: 481-508
- Ireland J.C., Klostermann P., Rice E.W., Clark R.M. 1993. Inactivation of *Escherichia coli* by titanium dioxide photocatalytic oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 5: 1668-1670
- Jaruga P. in Dizdaroglu M. 1996. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucleic Acids Research*, 24, 8: 1389-1394
- Jassby D., Budarz F.J., Wiesner M. 2012. Impact of aggregate size and structure on the photocatalytic properties of TiO₂ and ZnO nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 46, 13: 6934-6941
- Jiang J., Oberdörster G., Biswas P. 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11: 77-89
- Karlsson H.L., Gustafsson J., Cronholm P., Möller L. 2009. Size-dependent toxicity of metal oxide particles-A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology Letters*, 188, 2: 112-118
- Kielbassa C., Roza L., Epe B. 1997. Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*, 18, 4: 811-816
- Kim S.W. in An Y.J. 2012. Effect of ZnO and TiO₂ nanoparticles preilluminated with UVA and UVB light on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95, 1: 243-253

- Klotz L.O. in Sies H. 2003. Defence against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicology Letters*, 140-141: 125-132
- Knasmüller S., Parzefall W., Sanyal R., Ecker S., Schwab C., Uhl M., Mersch-Sundermann V., Williamson G., Hietsch G., Langer T., Darroudi F., Natarajan A.T. 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 402: 185-202
- Konaka R., Kasahara E., Dunlap W.C., Yamamoto Y., Chien K.C., Inoue M. 1999. Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and superoxide anion. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 3/4: 294-300
- Lankoff A., Sandberg W.J., Wegierek-Ciuk A., Lisowska H., Refsnes M., Sartowska B., Schwarze P.E., Meczynska-Wielgosz S., Wojewodzka M., Kruszewski M. 2012. The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response on HepG2, A549 and THP-1 cells. *Toxicology Letters*, 208, 3: 197-213
- Lee Y.Y., Kim H.G., Jung H.I., Shin Y.H., Hong S.M., Park E.H., Sa J.H., Lim C.J. 2002. Activities of antioxidant and redox enzymes in human normal hepatic and hepatoma cell line. *Molecules and Cells*, 14, 2: 305-311
- Li N., Duan Y., Hong M., Zheng L., Fei M., Zhao X., Wang J., Cui Y., Liu H., Cai J., Gong S., Wang H., Hong F. 2010b. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticles. *Toxicology Letters*, 195: 161-168
- Li N., Ma L., Wang J., Zheng L., Liu J., Duan Y., Liu H., Zhao X., Wang S., Wang H., Hong F., Xie Y. 2010a. Interaction between nano-anatase TiO₂ and liver DNA from mice in vivo. *Nanoscale Research Letters*, 5: 108-115
- Lin C.C. in Lin W.J. 2011. Sun protection factor analysis of sunscreens containing titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis*, 19, 1: 1-8
- Lin W.L., Wang C.J., Tsai Y.Y., Liu C.L., Hwang J.M., Tseng T.H. 2000. Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by *t*-butyl hydroperoxide in rat liver. *Archives of Toxicology*, 74, 8: 467-472
- Liu Y., Peterson A.D., Kimura H., Schubert D. 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemistry*, 69, 2: 581-593
- Livraghi S., Paganini M.C., Giamello E., Selloni A., Valentin C.D., Pacchioni G. 2006. Origin of photoactivity of nitrogen-doped titanium dioxide under visible light. *Journal of the American Chemical Society*, 128, 49: 15666-15671

- Mersch-Sundermann V., Knasmüller S., Wu X.J., Darroudi F., Kassie F. 2004. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, 198: 329-340
- Miyagi T., Kamei M., Mitsunashi T., Ishigaki T., Yamazaki A. 2004. Charge separation at the rutile/anatase interface: a dominant factor of photocatalytic activity. *Chemical Physics Letters*, 390: 399-402
- Monteiro-Riviere N.A., Wiench K., Landsiedel R., Schulte S., Inman A.O., Riviere J.E. 2011. Safety evaluation of sunscreen formulations containing titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in UVB sunburned skin: an *in vitro* and *in vivo* study. *Toxicological sciences*, 123, 1: 264-280
- More B.D. 2007. Physical sunscreens: On the comeback trail. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 73, 2: 80-85.
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63
- Namiki N., Cho K., Fraundorf P., Biswas P. 2005. Tubular reactor synthesis of doped nanostructured titanium dioxide and its enhanced activation by coronas and soft x-rays. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44, 14: 5213-5220
- National Nanotechnology Initiative. 2014. Benefits and applications. Združene države Amerike, United States National Nanotechnology Initiative.
<http://www.nano.gov/you/nanotechnology-benefits> (Februar, 2014)
- Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311, 5761: 622-627
- NIOSH. 2005. NIOSH current intelligence bulletin: Evaluation of health hazard and recommendations for occupational exposure to titanium dioxide. Združene države Amerike, The National Institute for Occupational Safety and Health: 158 str.
<http://www.cdc.gov/niosh/review/public/tio2/pdfs/tio2draft.pdf> (september 2013)
- Oberdörster G. 2002. Toxicokinetics and effects of fibrous and nonfibrous particles. *Inhalation Toxicology*, 14, 1: 29-56
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113, 7: 823-839
- Oberdörster G., Stone V., Donaldson K. 2007. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*, 1, 1: 2-25

- Ostiguy C., Lapointe G., Ménard L., Cloutier Y., Trottier M., Boutin M., Antoun M., Normand C. 2006. Nanoparticles actual knowledge about occupational health and safety risks and prevention measures. IRRST, 86 str.
www.irsst.qc.ca (junij 2013)
- Östling O. in Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 1: 291-298
- Panté N. in Kann M. 2002. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of ~39 nm. *Molecular Biology of the Cell*, 13, 2: 425-434
- Park E.J., Yi J., Chung K.H., Ryu D.Y., Choi J., Park K. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology Letters*, 180, 3: 222-229
- Petković J., Kuzma T., Rade K., Novak S., Filipič M. 2011a. Pre-irradiation of anatase TiO₂ particles with UV enhances their cytotoxic and genotoxic potential in human hepatoma HepG2 cells. *Journal of Hazardous Materials*, 196: 145-152
- Petković J., Žegura B., Filipič M. 2011b. Influence of TiO₂ nanoparticles on cellular antioxidant defence and its involvement in genotoxicity in HepG2 cells. *Journal of Physics: Conference Series*, 304, 1: 1-9
- Popov A.P., Priezhev A.V., Lademann J., Myllylä R. 2005. TiO₂ nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens. *Journal of Physics Department: Applied Physics*, 38, 15: 2564-2570
- Rahman Q., Lohani M., Dopp E., Pemsel H., Jonas L., Weiss D.G., Schiffmann D. 2002. Evidence that ultrafine titanium dioxide induces micronuclei and apoptosis in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Environmental Health Perspectives*, 110, 8: 797-800
- Rajapakse K., Drobne D., Kastelec D., Marinsek-Logar R. 2013. Experimental evidence of false positive comet test results due to TiO₂ particle-assay interactions. *Nanotoxicology*, 7, 5: 1043-1051
- Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N.J.F., Jha A.N. 2008. Hydroxyl radicals (·OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 640: 113-122
- Remškar M. 2009. Nanodelci in nanovarnost. Ministrstvo za zdravje, Urad Republike Slovenije za kemikalije, Ljubljana: 104 str.
www.kemijskovaren.si/files/nano_knjiga.pdf (april, 2013)

- Robichaud C.O., Uyar A.E., Darby M.R., Zucker A.G., Wiesner M.R. 2009. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO₂ production as a basis for exposure assessment. *Environmental Science & Technology*, 43, 12: 4227-4233
- Sayes C.M., Wahi R., Kurian P.A., Liu Y., West J.L., Ausman K.D., Warheit D.B., Colvin V.L. 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological Sciences*, 92, 1: 174-185
- Sayre R.M., Kollias N., Roberts R.L., Baqer A., Sadiq I. 1990. Physical sunscreens. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 41, 2: 103-109
- Serpone N., Lawless D., Khairutdinov R., Pelizzetti E. 1995. Subnanosecond relaxation dynamics in TiO₂ colloidal sols (particle sizes $R_p = 1.0-13.4$ nm). Relevance to heterogeneous photocatalysis. *The Journal of Physical Chemistry*, 99, 45: 16655-16661
- Sha B., Gao W., Han Y., Wang S., Wu J., Xu F., Lu T. 2013. Potential application of titanium dioxide nanoparticles in the prevention of osteosarcoma and chondrosarcoma recurrence. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13, 2: 1208-1221
- Shi X., Castranova V., Halliwell B., Vallyathan V. 1998. Reactive oxygen species and silica-induced carcinogenesis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 1, 3: 181-197
- Shi H., Magaye R., Castranova V., Zhao J. 2013. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*, 10, 15: 1-33
- Shukla R.K., Sharma V., Pandey A.K., Singh S., Sultana S., Dhawan A. 2011. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in Vitro*, 25, 1: 231-241
- Singh N., Manshian B., Jenkins G.J.S., Griffiths S.M., Williams P.M., Maffei T.G.G., Wright C.J., Doak S.H. 2009. NanoGenotoxicity: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30: 3891-3914
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 1: 184-191
- Skočaj M., Filipič M., Petković J., Novak S. 2011. Titanium dioxide in our life everyday life; is it safe? *Radiology and Oncology*, 45, 4: 227-247
- Slora. 2013. Osnovni epidemiološki podatki o raku. SLORA: Slovenija in rak, register raka RS. Ljubljana, Onkološki inštitut Ljubljana.
<http://www.slora.si/rak-v-sloveniji> (november 2013)

- Slovenski medicinski slovar. 2014. Ljubljana, Medicinska fakulteta Univerze v Ljubljani, Zdravniška zbornica Slovenije: 1298 str.
- Smyth J.R. in Bish D.L. 1988. Crystal Structures and Cation Sites of the Rock-Forming Minerals. Boston, Allen and Unwin: 332 str.
- Tang J., Durrant J.R., Klug D.R. 2008. Mechanism of photocatalytic water splitting in TiO₂. Reaction of water with photoholes, importance of charge carrier dynamics, and evidence for four-hole chemistry. *Journal of American Chemical Society*, 130: 13885-13891
- Tatsuma T., Takeda S., Saitoh S., Ohko Y., Fujishima A. 2003. Bactericidal effect of an energy storage TiO₂-WO₃ photocatalyst in dark. *Electrochemistry Communications*, 5, 9: 793-796
- Thomas G.E. in Stamnes K. 1999. Radiative transfer in the atmosphere and ocean. Cambridge: Cambridge University press, 517 str.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 206-221
- Trouiller B., Reliene R., Westbrook A., Solaimani P., Schiestl R.H. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *The Journal of Cancer Research*, 69, 22: 8784-8789
- Twentyman P.R. in Luscombe M. 1987. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, 56, 279-285
- Tyner K.M., Wokovich A.M., Godar D.E., Doub W.H., Sadrieh N. 2011. The state of nano-sized titanium dioxide (TiO₂) may affect sunscreen performance. *International Journal of Cosmetic Science*, 33, 3: 234-244
- Unfried K., Albrecht C., Klotz L.O., Mikecz A., Grether-Beck S., Schins R.P.F. 2007. Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1, 1: 52-71
- Uredba (ES) št. 1223/2009 Evropskega parlamenta in sveta z dne 30. novembra 2009 o kozmetičnih izdelkih. 2009. Uradni list, L342: 59 str.
- U. S. EPA. 2011. Persistent bioaccumulative and toxic (PBT) chemical program, Benzo(a)pyrene. Združene države Amerike, Environmental protection agency. <http://www.epa.gov/pbt/pubs/benzo.htm> (februar 2013)
- Wamer W.G., Yin J.J., Wei R.R. 1997. Oxidative damage to nucleic acids photosensitized by titanium dioxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 23, 6: 851-858

- Wan H., Williams R., Doherty P., Williams D.F. 1994. A study of the reproducibility of the MTT test. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5: 154-159
- Wang Y., Aker W.G., Hwang H., Yedjou C.G., Yu H., Tchounwou P.B. 2011. A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells. *Science of the Total Environment*, 409, 22: 4753-4762
- Wang J.J., Sanderson B.J.S., Wang H. 2007. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 628, 2: 99-106
- Wolfgang L. 2004. Technology application of nanomaterials-chance and risks. Technology analysis. Düsseldorf, Future Tehnologies Division No. 54, 119 str.
<http://www.innovationsbegleitung.de/11.pdf> (maj 2013)
- Xia T., Kovochich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T., Sioutas C., Yeh J.I., Wiesner M.R., Nel A.E. 2006. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. *Nano Letters*, 6, 8: 1794-1807
- Yang Yang Zhang's Weblog. 2010. TiO₂ nanoparticles for photocatalytic applications. WordPress & the Atahualpa Theme by BytesForAll.
<http://yangyang.blog.usf.edu/?p=3> (maj 2013)
- Zou X., Xu B., Yu C.P., Zhang H.W. 2013. Imbalance between oxidative and antioxidative systems: Toward an understanding of visible light-induced titanium dioxide nanoparticles toxicity. *Chemosphere*, 93, 10: 2451-2457

ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Gregorju Serši za prevzem mentorstva in hiter ter natančen pregled magistrskega dela in za vse popravke, ki so pripomogli k njegovemu izboljšanju.

Posebna zahvala je namenjena somentorici dr. Jani Nunić za vso potrpežljivost, dobro voljo in pomoč pri laboratorijskem delu ter za vse nasvete, ideje in pomoč pri nastajanju magistrskega dela.

Zahvaljujem se prof. dr. Metki Filipič, ki mi je omogočila opravljanje magistrskega dela v Laboratoriju za gensko toksikologijo in biologijo raka na Nacionalnem inštitutu za biologijo. Zahvaljujem se tudi za hiter in natančen pregled magistrskega dela ter za vse nasvete in predloge.

Recenzentki prof. dr. Damjani Drobne se zahvaljujem za pregled magistrskega dela in vse strokovne opombe in predloge.

Hvala tudi dr. Katji Rade in dr. Barbari Horvat z Instituta Jožef Stefan za pomoč pri uporabi sterilizatorja in pri obsevanju delcev TiO₂.

In na koncu še zahvala vsem, ki so kakorkoli pomagali pri nastajanju magistrskega dela. Prav posebno se zahvaljujem mojim najbližjim, ki so mi ves čas študija stali ob strani in me spodbujali – hvala, brez vas mi ne bi uspelo!