

Univerza v Ljubljani



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anže TESTEN

**VPLIV ALBUMINA NA FOTOTOKSIČNOST  
NANOCEVK  $\text{TiO}_2$**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2014

Univerza v Ljubljani



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anže TESTEN

**VPLIV ALBUMINA NA FOTOTOKSIČNOST NANOCEVK  $\text{TiO}_2$**

MAGISTRSKO DELO  
(Magistrski študij – 2. stopnja)

**EFFECT OF ALBUMIN ON PHOTOTOXICITY OF  $\text{TiO}_2$   
NANOTUBES**

M. Sc. Thesis  
(Master Study Programms)

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnje Molekulska biologija. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v Laboratoriju za biofiziko in EPR centru Inštituta Jožef Stefan na Odseku za fiziko trdne snovi.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je dne 18. 10. 2013 odobrila naslov in temo magistrskega dela ter za mentorico imenovala prof. dr. Damjano Drobne, za somentorja asist. dr. Tilna Kokliča in za recenzenta prof. dr. Janeza Štrancarja.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Kristina SEPČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Janez ŠTRANCAR  
Inštitut Jožef Stefan, Odsek za fiziko trdne snovi, Laboratorij za biofiziko in EPR center

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

Član: asist. dr. Tilen KOKLIČ  
Inštitut Jožef Stefan, Odsek za fiziko trdne snovi, Laboratorij za biofiziko in EPR center

Datum zagovora:

Magistrsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem besedilu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Anže Testen

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2  
DK UDK 620:549.514.6(043.2)=163.6  
KG nanocevke/titanov dioksid/albumin/fototoksičnost/MCF7/EPR/MTS/sedimentacija  
AV TESTEN, Anže, dipl. biol. (UN)  
SA DROBNE, Damjana (mentorica)/KOKLIČ, Tilen (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske biologije  
LI 2014  
IN VPLIV ALBUMINA NA FOTOTOKSIČNOST NANOCEVK TiO<sub>2</sub>  
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)  
OP VIII, 70 str., 2 pregl., 24 sl., 96 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI Z neslutnim razmahom nanotehnologije in nanomedicine ter vedno večjo produkcijo novih nanodelcev z novimi, potencialno revolucionarnimi lastnostmi, postaja vprašanje razmerja med pozitivnimi in negativnimi vplivi le-teh na okolje in človeka vedno bolj pereče. Ob pomanjkanju konsenza o standardiziranih testih in opazovanih biomarkerjih smo v tem delu z uporabo različnih testov preučevali fototoksičnost nanocevke iz titanovega dioksida (TiO<sub>2</sub>-NT). TiO<sub>2</sub> je znan kot fotokatalitični material, ki ob obsevanju z UV svetlobo v prisotnosti vode producira radikale. Vpliv fotovzbujenih TiO<sub>2</sub>-NT na viabilnost rakavih MCF-7 celic smo testirali z MTS in resazurinskim testom ter dobljene rezultate preverili z barvanjem s Tripan Modrim in neposrednim štetjem, zmožnost proliferacije pa smo ocenili s klonogeničnim testom. Ugotovimo, da sta kolorimetrična test zanesljiva le pri nizkih koncentracijah nanomateriala. Rezultati kažejo, da dodatek 1 mg/ml nanomateriala zmanjša preživetje celic za polovico, dodatno obsevanje pa povzroči le zamik v rasti, ki je reverzibilno ob odstranitvi stresorja. V prisotnosti serumskih proteinov je posedanje nanomateriala upočasnjeno, vendar je sedimentacija še vedno očitna, zato njen vpliv ocenimo z obrnjeno konfiguracijo tretiranja celic. Serumski proteini prav tako povsem zavrejo generacijo fotovzbujenih radikalov, verjetno zaradi nastanka proteinske (albuminske) korone. S kombinacijo fluorescenčne mikroskopije in mikroskopije v svetlem polju smo ugotovili, da sta celični stres in stopnja internalizacije nanomateriala povezana.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2  
DC UDK 620:549.514.6(043.2)=163.6  
CX nanocevke/titanov dioksid/albumin/fototoksičnost/MCF7/EPR/MTS/sedimentacija  
AU TESTEN, Anže  
AA DROBNE, Damjana (mentorica)/KOKLIČ, Tilen (somentor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programm of molecular biology  
PY 2014  
TI EFFECT OF ALBUMIN ON PHOTOTOOXICTY OF TiO<sub>2</sub> NANOTUBES  
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)  
NO VIII, 70 p., 2 tab., 24 fig., 96 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB With unprecedented surge of nanotechnology and nanomedicine and with constantly increasing production of new nanoparticles with novel, potentially revolutionary properties, the question of the ratio between beneficial and detrimental effects of particles on the environment and on the humans becomes ever more pressing. Taking into account the lack of consensus on the use of standardized assays and on observed biomarkers the presented work utilized different assays and experiments to determine phototoxicity of titanium dioxide nanotubes (TiO<sub>2</sub>-NT). TiO<sub>2</sub> is known for its photocatalysis and radical production, when exposed to UV radiation in the presence of water. Effect of photoexcited TiO<sub>2</sub> material was characterized using MTS and resazurin assay. Acquired results were reexamined using direct counting with Tryphan blue for cell number and Clonogenic assay for proliferation potential. We determined that colorimetric assay were only usable with low concentration of nanomaterial. In addition the results indicated that concentration of 1 mg/ml halved the number of cells and that radiation only reversely delayed cell division cycle. The sedimentation of the material was greatly reduced in the presence of serum proteins but still extensively examined with inverted configuration. Serum proteins also almost completely inhibited formation of photoradicals, probably due to formation of protein (albumin) corona. With combination of fluorescence and bright field microscopy we finally established correlation between cell stress and the amount of internalized nanomaterial.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VI</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 STRUKTURA, LASTNOSTI IN UPORABA TiO <sub>2</sub> .....	3
2.2 BIO-NANO INTERAKCIJE .....	6
2.2.1 Nanotoksičnost.....	6
2.2.2 Biokorona – zapostavljen fenomen .....	9
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>11</b>
3.1 MATERIALI .....	11
3.1.1 Gojitveni mediji, pufri in kemikalije .....	11
3.1.2 Laboratorijska oprema .....	11
3.1.3. Nanomaterial.....	12
3.1.4 Gojenje MCF-7 celic.....	12
3.2 METODE.....	13
3.2.1 MTS – preživetveni test.....	13
3.2.2 Klonogenični test – test proliferacije .....	16
3.2.3 UV – VIS spektroskopija – test sedimentacije .....	19
3.2.4 Gašenje fluorescence – test albumin-nano interakcije.....	19
3.2.5 EPR – test aktivnosti nanomateriala .....	20
3.2.6 Obrnjena konfiguracija gojenja celic – test vpliva sedimentacije .....	23
3.2.7 Resazurinski test – preživetveni test .....	25
3.2.8 DCF test – test celičnega stresa .....	28
3.2.9 Test mitohondrijskega membranskega potenciala .....	31
<b>4 REZULTATI Z RAZPRAVO .....</b>	<b>32</b>
4.1 MTS TEST – KOLORIMETRIČNI TEST PREŽIVETJA .....	32
4.2 MTS TEST – RAZČLENITEV .....	37
4.3 PROTEINSKA KORONA IN NJEN VPLIV NA POSEDANJE IN AKTIVNOST DELCEV .....	39
4.4. VPLIV SEDIMENTACIJE .....	43
4.5 MEHANIZEM STRUPENOSTI – VPLIV INTERNALIZACIJE DELCEV IN CELIČNI STRES .....	46
<b>5 SKLEPI .....</b>	<b>59</b>
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>60</b>

## KAZALO SLIK

Sl. 1: Kristalinične strukture TiO <sub>2</sub> .....	3
Sl. 2: Fotokataliza .....	4
Sl. 3: Nanomaterial .....	12
Sl. 4: MTS test .....	13
Sl. 5: Test MTS-2 .....	15
Sl. 6: Klonogenični test .....	18
Sl. 7: EPR .....	21
Sl. 8: Obrnjena konfiguracija 1 .....	23
Sl. 9: Obrnjena konfiguracija 2 .....	24
Sl. 10: Obrnjena konfiguracija 3 .....	24
Sl. 11: Obrnjena konfiguracija .....	25
Sl. 12: Resazurinski test .....	26
Sl. 13: DCF test .....	28
Sl. 14: DCF test 2 .....	30
Sl. 15: MTS – Kolorimetrični test viabilnosti celic .....	33
Sl. 16: Razčlenitev kolorimetričnega MTS testa .....	37
Sl. 17: Interakcija in vpliv serumskih proteinov na nanomaterial .....	40
Sl. 18: Resazurinski test .....	44
Sl. 19: Vpliv sedimentacije na internalizacijo .....	49
Sl. 20: DCF ozadje .....	50
Sl. 21: Celični stres – vpliv obrnjene konfiguracije .....	52
Sl. 23: Celični stres – vpliv serumskih proteinov .....	54
Sl. 24: Izvencelični mitohondriji .....	56

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Pregled uporabljenih kemikalij .....	11
Pregl. 2: Uporabljena laboratorijska oprema .....	11



## SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AP-1	aktivator protein 1
APMS	3-(2-aminoethylamino)propylmethyldimethoxysilane
ATCC	Ameriška zbirka tipskih kultur (ang: american type culture collection)
DCF	diklorofluorescein
DMEM	celični medij Dulbecco's modified Eagle medium
DMPO	5,5-dimetil-1-pirolin N-oksidi
DMPO-O <sub>2</sub> • <sup>-</sup>	DMPO-adukta superoksidnega radikala
DMPO-OH•	DMPO-adukta hidroksilnega radikala
DMSO	dimetil sulfoksid
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
FBS	fetusni goveji albumin
FDT	fotodinamična terapija
FRET	Försterjev resonančni energijski transfer
KOH	kalijev hidroksid
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
O <sup>2*</sup>	singletni kisik
OH•	hidroksilni radikal
PBS	fosfatni pufer
PCTFE	poliklorotrifluoroetilen
PET	fotoinducirani elektronski transfer
PMS	fenazin metosulfat
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
TEM	transmisijski elektronski mikroskop
TiO <sub>2</sub> -NT	nanocevke titanovega dioksida (v besedilu večkrat »nanomaterial«)
UVA	ultravijolična svetloba z valovno dolžino 315–400 nm
UV-Vis spektroskopija	spektroskopija v vidnem in ultravijoličnem spektru
WT	divji tip gena (ang. Wild type)

## 1 UVOD

Dandanes tako zaželena kot tudi zastrašujoča predpona nano (νᾶνος; nánnos) je v antični grščini pomenila skrat. In tako, kot so se ta mitična bitja izmikala človeškemu odkritju, tako so nas nanodelci do sredine prejšnjega stoletja obdajali skoraj povsem neopazno. In to kljub temu da so ti delci, veliki le milijoninko milimetra, bili v uporabi od časov Mezopotamije dalje kot sestavni deli okrasne bleščeče lončevine, nakita in kasneje barvnega stekla.

Najbližje njihovem odkritju je leta 1857 prišel Michael Faraday, ko je s fosforjem reduciral zlatov klorid in tako zelo verjetno sintetiziral sploh prvi umetni nanokoloid ter pravilno sklepal, da so njegove optične lastnosti posledica »neznansko majhnih« delcev zlata v raztopini (Faraday, 1857).

Pa vendar lahko o pravem začetku moderne dobe nanotehnologije govorimo šele dobro stoletje kasneje, natančneje od 29. december 1959, ko je Richard Feynman na srečanju Ameriškega fizikalnega društva s svojim slavnim predavanjem »Na dnu je še dovolj prostora – povabilo za vstop na novo področje fizike« (Feynmann, 1960) predstavil svojo preroško vizijo raziskovanja vsega nano (čeprav takrat še brez te predpone). Med drugim je v predavanju predvidel prihod nove generacije mikroskopov z atomsko ločljivostjo, manipulacijo posameznih atomov, gostejša vezja računalniških čipov, ki bi poganjala hitrejše računalnike in celo »zdravnika, ki ga pogoltneš«. Zadnji so postali realnost šele v zadnjem času z razmahom teranostičnih nanodelcev (Y. Li in sod., 2014).

Čeprav je zgodba začetka nanotehnologije s Feynmanom izjemno navdihujoča, pa je realnost vendarle daleč. Glede na citiranost njegovega predavanja in uporabo predpone nano v znanstvenih objavah, lahko ugotovimo, da se je pravo zanimanje za raziskave na nano nivoju začelo namreč šele sredi 80-ih let, po odkritju vrstičnega tunelskega mikroskopa. Feynman je bil takrat na novo odkrit in kot izjemno priljubljen znanstvenik in Nobelov nagrajenec uporabljen za nadaljnjo promocijo novo nastajajoče discipline (Toumey, 2008).

Nanodelci se danes zaradi svojih posebnih lastnosti uporabljajo že v skoraj vseh industrijskih panogah, od agrikulture, metalurgije in tekstilne industrije do energetike. Posebnega pomena pa je v zadnjem času deležna nanomedicina, ki cilja na čimbolj specifično interakcijo med sintetiziranimi nanodelci in subceličnimi komponentami, makromolekulami, ki bi jih lahko tretirali tudi kot bionanodelce (Smithies in sod., 2014). Fenomeni, ki pridejo do izraza na nano skalah, so zato revolucionirali celotna področja medicine, med drugim neinvazivno diagnostiko in slikanja, dostavo aktivnih učinkovin, gensko terapijo ter onkologijo.

Hitrost raziskav na nano področju pa razgalja tudi drugo pomembno plat medalje. Ob zdajšnji izjemni proizvodnji nanodelcev za medicinske namene je izjemno težko zagotoviti, da nobeden od novih delcev ne bo izkazoval stranskih učinkov oziroma strupenosti, ne samo do pacientov, temveč tudi do naključno izpostavljenih, raziskovalcev ter do okolja. Zato je vitalnega pomena čimprej vzpostaviti in definirati potencialno strupenost novo-sintetiziranih delcev (Linkov in sod., 2008; Oberdorster, 2010). Idealna rešitev tega problema pa bi bil sistem, kjer bi ob testu biokompatibilnost nanomateriala dobili še informacijo potencialne terapevtske vrednosti.

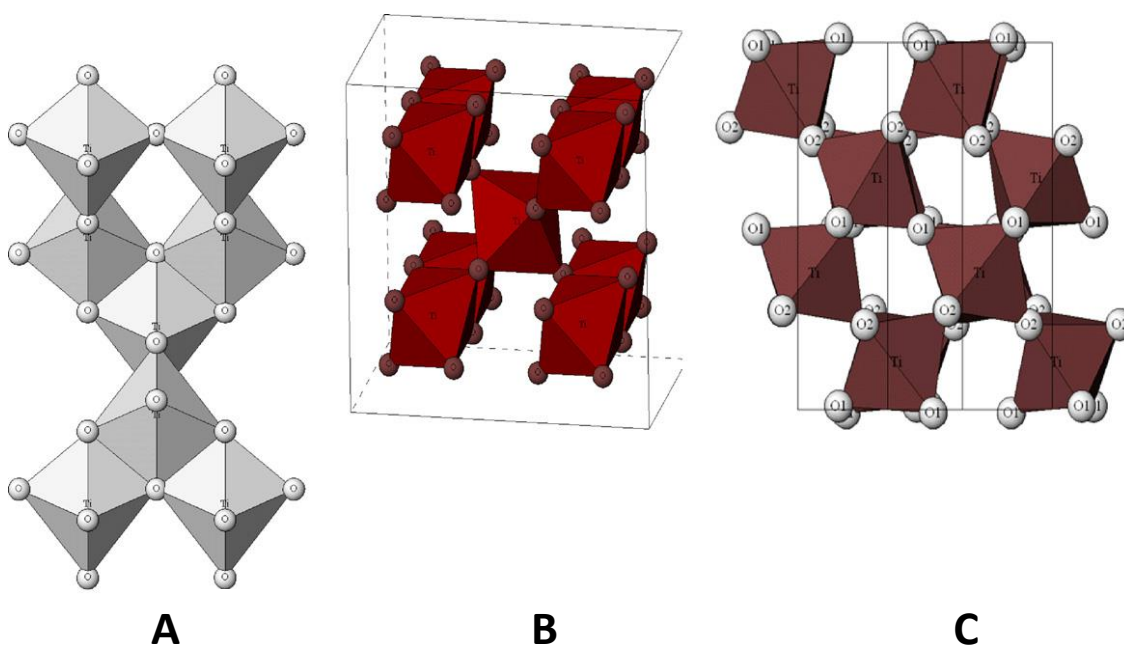
Namen tega dela je bil tako ovrednotiti fizikalne lastnosti nanocevk titanovega dioksida (TiO<sub>2</sub>-NT) ter nato testirati njihovo biokompatibilnost oziroma potencialno citotoksičnost in interakcije s prisotnimi biomolekulami, predvsem serumskimi proteini. Ob enem pa bi preizkusili še uporabnost tega fotoaktivnega materiala kot anorganskega fotosenzibilizatorja pri aplikaciji fotodinamične terapije (FDT) na modelne rakaste celice.

Predvidevamo, da je sam material biološko inerten in kot tak biokompatibilen v terapevtsko zanimivih koncentracijah, medtem ko pri izpostavitvi dolgovalovnemu elektromagnetnemu valovanju v ultravijoličnem (UVA) območju pride do produkcije aktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki so odgovorne za naknadno celično smrt.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 STRUKTURA, LASTNOSTI IN UPORABA TiO<sub>2</sub>

Titanov dioksid (TiO<sub>2</sub>) je v naravi dostopen oksid titana, ki ga v večini najdemo vezanega v eni od treh najbolj pogostih mineralnih oblik: anatazi, rutilu in brukitu. V vseh treh kristaliničnih strukturah so atomi titana (Ti<sup>4+</sup>) koordinirani s šestimi kisikovimi atomi (O<sup>2-</sup>), ki tako tvorijo TiO<sub>6</sub> oktaeder (Nolan in sod., 2009). Razlika je, da si pri anatazni obliki oktaedri delijo kote in tako tvorijo tetragonalno strukturo, medtem ko je tetragonalna struktura pri rutilu posledica delitve robov med oktaedri. Pri brukitu si oktaedri delijo tako kote kot robove, kar pripelje do ortorombične strukture (slika 1) (Gong in Selloni, 2007). Vir vseh treh mineralov je v veliki večini ilmenitna ruda. Le-ta vsebuje več kot 90 % titanata v rutilni obliki, ostali dve kristalinični obliki pa prideta v ravnovesje z rutilom ob segrevanju nad 600 °C (Hu in sod., 2003).

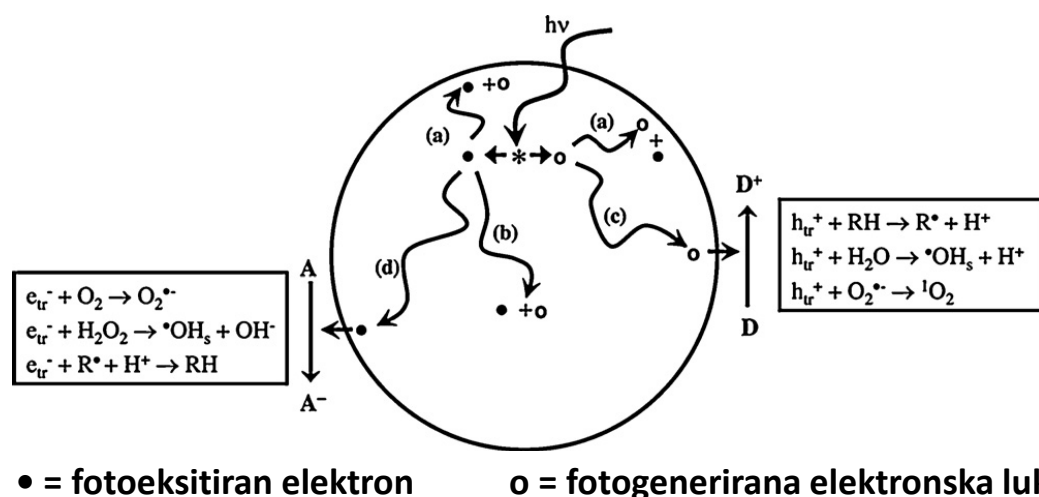


**Slika 1: Kristalinične strukture TiO<sub>2</sub>**

Modelni prikaz kristalinične strukture anataze (A), rutila (B) ter brukita (C).

Povzeto po (Pelaez in sod., 2012)

Lastnost, zaradi katere je titanat postal deležen svetovne pozornosti, pa je zagotovo fotokataliza. Mejniki na tem področju je objava iz leta 1972, kjer je prvič opisana fotoliza vode z elektrodo iz TiO<sub>2</sub> (A. Fujishima in Honda, 1972). Fotokataliza oziroma katalizirana fotoliza je proces, kjer pride do pospešitve reakcije, ko elektromagnetno valovanje z zadostno energijo oziroma točno določeno valovno dolžino, interagira s prisotnim materialom, navadno polprevodnikom in tako proizvede ROS, ki sodelujejo v nadaljnji reakciji (Mills in Le Hunte, 1997). Da se taka reakcija kategorizira kot fotokataliza, morata poteci vsaj dve sočasni reakciji, ki omogočata končni nastanek reaktivnih spojin. Prva vključuje oksidacijo vode, ki je disociativno adsorbirana na polprevodnik, s strani fotogenerirane elektronske luknje, druga pa redukcijo končnega elektronskega receptorja (navadno kisika) s strani fotoeksitiranega elektrona. Ti sočasni reakciji vodita do dveh produktov; hidroksilnega in superoksidnega radikala (Pelaez in sod., 2012) (slika2).



**Slika 2: Fotokataliza**

Shematski prikaz dogajanja na izpostavljeni površini TiO<sub>2</sub> nanodelca ob UV eksitaciji.

Povzeto po (Ochiai in sod., 2011)

S konceptom elektron-luknja na kvanten način opišemo par mobilnih nosilcev naboja, ki nastaneta ob fotoeksitaciji in kot taka nepogrešljiva pri fotokatalizi, delovanju polprevodnikov ter celo svetlobo emitirajočih (LE) in laserskih diod. Pri fotoeksitaciji se

naboj elektrona in fotogenerirane luknje (torej manjka elektrona) prenaša prek kaskade kompleksnih interakcij elektronov (Tamaki in sod., 2006).

Poudariti je treba, da je fotokataliza v resnici generacija katalizno aktivnih zvrsti z asistenco fotona in ne direktna kataliza s strani svetlobe, fotokatalitične reakcije pa lahko še nadaljerazčlenimo na katalitične in sintezne fotoreakcije. Pri prvih se fotoeksitacija zgodi najprej na adsorbirani molekuli, ki nadalje interagira s substratom katalize, ki je v osnovnem stanju, medtem ko je pri sinteznih fotoreakcijah najprej fotoeksitiran substrat katalize, ki nato nadalje reagira z adsorbirano molekulo v osnovnem stanju (Testino in sod., 2007).

Začetek fotokatalize spodbudimo s svetlobo z energijo, ki lahko omogoči elektronu prehod iz valenčnega v prevodni pas. Za rutil ta energija znaša 3.0 eV, medtem ko za brukit in anatazo 3.2 eV. Za dosego teh energij potrebujemo svetlobo valovne dolžine pod 387 nm, kar pomeni svetlobo v UV spektru (Tachikawa in sod., 2004).

Zaradi zgoraj naštetih fotokatalitičnih lastnosti je TiO<sub>2</sub> našel uporabo v številnih nišah, kjer je potreba po močnem oksidantu. Prva je bila aplikacija TiO<sub>2</sub> v, za tisti čas revolucionarne, samočistilne površine. Danes je možno že skoraj vse materiale, od tekstila, plastike, fasad, stekla in aluminija prevleči z TiO<sub>2</sub> filmi, ki ob obsevanju s sončno ali umetno svetlobo, tvorijo radikale in tako razgrajujejo polutante in ostale organske snovi v stiku s filmom (Akira Fujishima in sod., 2008). Omenjeni fenomen dopolnjuje še ena lastnost, ki se aktivira ob obsevanju in sicer fotoinducirana superhidrofilnost. Hidrofilnost površine merimo s kontaktnim kotom med kapljo vode in površino. Ob obsevanju TiO<sub>2</sub> se kontaktni kot namreč zmanjša na 0 °, kar pomeni, da imamo opravka s superhidrofilnim materialom. Za samočistilne površine to pomeni, da lahko že deževnica odnese večino adsorbiranih organskih molekul (Akira Fujishima in sod., 2008).

Poleg samočistilnih površin se fotokatalitične lastnosti TiO<sub>2</sub> uporabljajo še v ekologiji. Razširjena je uporaba TiO<sub>2</sub> kot prevleka za čistilne filtre zraka, kjer so njegove prednosti pred drugimi filtri predvsem v tem, da plinske kontaminante razgradi na mestu in jih ne skladišči, kot ostali sistemi (Ao in Lee, 2005), ter čistilce vode, kjer se mreže in filtri

prevlečeni z TiO<sub>2</sub> uporabljajo tako za kemijske polutante, kot tudi bakterijsko onesnaženje vode (Ochiai in sod., 2011).

## 2.2 BIO-NANO INTERAKCIJE

### 2.2.1 Nanotoksičnost

Še nedolgo nazaj je veljalo, da je TiO<sub>2</sub> prah povsem biokompatibilen oziroma inerten in kot tak ne povzroča patoloških sprememb na pljučih, čeprav se v njih akumulira v dokaj velikih količinah (Ophus in sod., 1979).

Danes pa je že znano, da je nano TiO<sub>2</sub> toksičen za večino celičnih linij. Glavni mehanizem strupenosti v teh sistemih naj bi potekal prek produkcije ROS po fotoaktivaciji materiala. S poskusi na modelnih ovarijskih celicah kitajskega hrčka (CHOC) so pokazali, da so različne kristalinične oblike TiO<sub>2</sub> različno toksične (Uchino in sod., 2002) pri izpostavitvi UV sevanju in da je glavni vir poškodb fotogeneriran hidroksilni radikal (Dodd in Jha, 2009). V skoraj vseh primerih je najbolj toksična kristalinična anatazna oblika zaradi največje energijske razlike med valenčnim in prevodnim pasom in večje mobilnosti prenašalcev naboja (fotoeksitiranih elektronov in fotogeneriranih lukenj), ki se odražata v večji produkciji ROS (Skocaj in sod., 2011). Po drugi strani pa naj bi nanomaterial produciral ROS tudi brez fotoeksitacije. Detektirali so na primer oksidativne poškodbe humanih bronhialnih epiteljskih celic (BEAS-2B) zaradi mešanice nanoanataze in rutila brez obsevanja (Gurr in sod., 2005). Na tem mestu je potrebno omeniti, da ROS niso samo indikator patološkega stanja, temveč so tudi zelo pomembni sekundarni sporočevalci v fiziološkem stanju in so začetniki in prenašalci mnogih kaskad, povezanih z delitvijo in proliferacijo, vnetnimi odzivi in celično smrtjo (Robichaud in sod., 2009). Začetek apoptoze torej ne pomeni nujno veliko oksidativnih poškodb, temveč interferenco z eno od mnogih kaskad povezanih s celično smrtjo in proliferacijo ali pa predstavlja vklop proinflamatornih kaskad, kar se pokaže na prisotnosti tumorskih nekrotičnih faktorjev in aktivaciji regulatornih kinaz, reguliranih z zunanjim signalom (ERK1/2) (Kang in sod., 2008). Faktor, ki odloča o končnem odzivu (apoptoza ali vnetje), je verjetno koncentracija,

saj je bilo pokazano, da večja produkcija ROS vodi v apoptozo, medtem ko manjša povzroča vnetja.

Poleg splošnega citotoksičnega vpliva pa lahko TiO<sub>2</sub> nanodelci delujejo tudi genotoksično, kar je bilo pokazano na več vrstah celic in organizmov a hkrati zaključeno, da je genotoksičnost posledica zgoraj omenjene produkcije ROS, ki neposredno poškoduje DNK ali pa se vmešavajo v mehanizme njene duplikacije in ekspresije (32,38,40,43,44). Po drugi strani pa obstajajo dokazi o neposredni interakciji med TiO<sub>2</sub> nanodelci in DNK. Večkrat so nanomaterial opazili v jedru (Geiser in sod., 2005), pred kratkim pa so tudi pokazali, da se nano TiO<sub>2</sub> lahko veže med nukleotidne bazne pare oziroma na nukleotide same, s čimer fizično spremeni strukturo DNK in onemogoči podvajanje, pri višjih koncentracijah pa celo cepi verigo samo (N. Li in sod., 2009).

Čeprav je jasno, da je v večini primerov TiO<sub>2</sub> nanomaterial toksičen, pa je sama stopnja strupenosti močno odvisna od fizikalno-kemičnih lastnosti posameznih nanodelcev. Najbolj očitna je zagotovo velikost. Sama definicija nanodelcec omejuje vsaj eno dimenzijo pod 100 nm. Velikost nanodelcem tako inherentno daje drugačne lastnosti kot makromaterialu. Stoletja je veljalo, da ima material svoje lastnosti zaradi kemične sestave in ne zaradi fizikalnih lastnosti, kakršna je zagotovo velikost. A ko zmanjšujemo dimenzijo delca na velikost gruče atomov, postane vpliv atomov in njihov interakcij izjemno pomemben za same interakcije delca (Okazaki in Gotoh, 2005). To se kaže tudi v toksikologiji, saj je jasno pokazano, da imajo nanodelci mnogo bolj uničujoče učinke kot jih imajo večji delci pri enaki koncentraciji kemijsko povsem enak snovi (Uchino in sod., 2002). Prav tako ne gre zanemariti geometrije delca. Pri TiO<sub>2</sub> v smislu fotokatalitičnosti prednjačijo prav nanocevke, ki imajo največje razmerje med površino in volumnom in tako največji fotokatalitični potencial (N. Li in sod., 2009).

Velikokrat zanemaren parameter pri ocenjevanju strupenosti pa je tudi potencialna agregacija nanomateriala. Le-ta je odvisna od ionske moči raztopine in lahko spremeni efektivno velikost delcev za več velikostnih razredov. Za Degusso P25 je bilo pokazano, da je njen efektivni dinamični radij v deionizirani vodi 542 nm, medtem ko je v DMEM



mediju 3500 nm (HyeWon Kim in sod., 2009). Glede na to, da je deklarirana velikost posameznega delca P25 okoli 26 nm, več kot očitno v različnih okoljih različno agregira.

Posebno nišo pa je zaradi tolikokrat že omenjene fotoaktivnosti, TiO<sub>2</sub> našel v onkologiji in sicer kot anorganska različica organskih fotosenzibilizatorjev pri foto-dinamični terapiji tumorjev. Fotodinamična terapija je onkološka metoda, pri kateri vbrizgajo organski senzibilizator, ki se razporedi po celem telesu, vendar zaradi večje poroznosti tumorskega ožilja in posledično večje akumulacije ostane dlje časa v tumorskih tvorbah (Dolmans in sod., 2003). Po nekaj dneh nato lokalno apliciramo lasersko svetlobo, ki eksitira akumulirano barvilo, ta pa katalizira produkcijo singletnega kisika (O<sup>2\*</sup>), ki potem terminalno poškoduje okoliško tumorsko tkivo (J. Chen in sod., 2002). Uporabljena barvila so navadno iz porfirinske ali klorofilne družine (Allison in sod., 2004), za katere pa velja dokaj kratek razpolovni čas in hitro izpiranje iz tkiva. Zato se menjava organskih barvil s TiO<sub>2</sub>, ki je sposoben produkcije hidroksilnih in superoksidnih radikalov, zdi privlačna možnost, ki že kaže prepričljive rezultate (Kalbacova in sod., 2008; Rozhkova in sod., 2009).

Na koncu lahko ugotovimo, da je nanotoksikologija razgibano in po številu publikacij izjemno produktivno področje, a zaradi izjemno hitrega razvoja tudi precej divergentno. Skoraj vsaka publikacija namreč predstavi svoj pogled na strupenost posameznih materialov, ki so ocenjeni z množico različnih testov viabilnosti, občutljivih na različne biomarkerje. Le-ti so spet opazovani na različnih modelnih celičnih linijah z dokazano različnimi odzivi na enake delce (Thevenot in sod., 2008), kar je verjetno pogojeno tudi z zelo različno internalizacijo (dos Santos in sod., 2011). Prav tako večina raziskav preučuje kratkotrajne, akutne efekte izpostavitve, medtem ko so študije dolgotrajne izpostavljenosti redke (Kocbek in sod., 2010; Valant in sod., 2012b). Zato so v zadnjem času vloženi precejšnji napor, da se uskladijo načini raziskovanja nanotoksičnosti, s čimer bi dela pridobila na informativnosti (Valant in sod., 2012a).

### 2.2.2 Biokorona - zapostavljen fenomen

Med področji, ki bi si zagotovo zaslužila večje pozornost in pomembnost zaradi velikega vpliva, ki ga imajo na celostno interakcijo nanodelcev z biološkimi sistemi, zagotovo izstopa fenomen proteinskega ovoja okoli nanodelcev oziroma biokorona, ki je v veliki večini publikacij povsem zanemarjena, čeprav ima iz strani celice verjetno največjo vlogo pri interakciji, internalizaciji in s tem tudi strupenosti (Monopoli in sod., 2011).

Površine vseh materialov, ključno z nanodelci, imajo vedno višjo prosto energijo, kot del materiala, ki leži pod njo. V kompleksih bioloških tekočinah, to pomeni, da se bodo biomolekule pospešeno in selektivno adsorbirale na površino (Monopoli in sod., 2012). Nastali bio-ovoj oziroma korona tako zniža prosto energijo ter poskrbi za dispergirano, zaradi česar bi jo morali upoštevati kot primarno lastnost delca, saj mu daje novo intrinzično identiteto, tako kot npr. njegova velikost, masa ali naboj (Laurent in sod., 2012).

Formacija korone se začne takoj ob izpostavitvi biološkemu mediju in navadno rezultira v dveh različnih proteinskih plasteh – trdni in mehki koroni. Trdna korona je ireverzibilno vezana na površino delca, medtem ko se mehka reverzibilno veže, glede na koncentracijo in ostale dejavnike v mediju (Milani in sod., 2012). Zanimivo je, da je med 3700 plazemskimi proteini, med gradnike trdne korone vključenih samo par deset, pa še te ne spadajo med najbolj pogoste. Očitno ob prisotnosti proteinov z večjo vezavno afiniteto le-ti močno prevladajo nad proteini, ki v plazmi prevladujejo po koncentraciji (Lundqvist in sod., 2008).

Ker korona spremeni interakcijo nanomateriala s celico, očitno igra pomembno vlogo tudi pri internalizaciji. Nanodelci se neglede na način prehajanja membrane najprej adsorbirajo na celično membrano (Thurn in sod., 2011). Lahko si predstavljamo, da je tako prehod delca s korono zelo drugačen od tistega brez nje. Pokazali so, da prisotnost proteinske korone močno zmanjša delež adsorbiranih delcev, kar neposredno vpliva na delež internalizacije (Lesniak in sod., 2013). Vendar se vpliv korone tu ne konča. Interakcija med trdno korono in delci je tako močna, da korona ostane nepoškodovana med samo

endocitozo in nadalje tudi v celici preprečuje potencialno kvarne učinke delcev (F. Wang in sod., 2013a). Vendar tu korona pride v stik z lizosomi in ostalimi celičnimi mehanizmi proteinske degradacije, ki se vežejo na samo korono in jo razgradijo. To pripelje lizosome v neposredni kontakt z delci, kar pa privede do poškodb lizosomske mebrane, razlitja vsebine in posledično do apoptoze.

Terapevtska vrednost korone pa leži prav v tem, da z njeno manipulacijo lahko nadziramo količino prevzetega materiala ter celo znotraj celično internalizacijo (Lesniak in sod., 2013). To vodi že v prve poizkuse dizajnerskih bio-koron, ki so namenjene prav tarčni dostavi terapevtski delcev oziroma učinkovin (Mahon in sod., 2012).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Gojitveni mediji, pufri in kemikalije

Preglednica 1: Pregled uporabljenih kemikalij

KEMIKALIJA	PROIZVAJALEC
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega
DCF	Sigma
DMEM Glutamax*	Gibco
Etanol	Merck
FBS	PAA
KOH	Sigma
PBS	Gibco
Penicilin/Streptomici	Sigma
Resazurin	Sigma
Tripsin EDTA	PAA

\* Kadar govorimo o čistem celičnem mediju se smatra čisti DMEM Glutamax, če pa govorimo o obogatenem celičnem mediju, se smatra DMEM Glutamax z 10 % dodanega FBS in 1 % dodatka Penicilina/streptomicina.

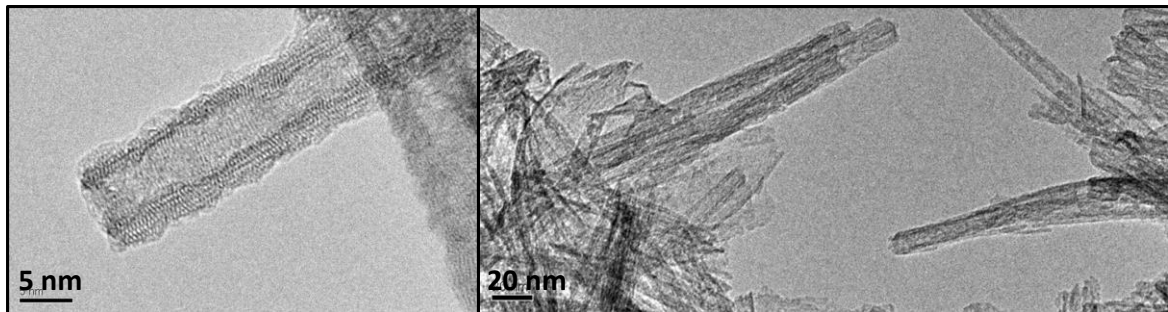
##### 3.1.2 Laboratorijska oprema

Preglednica 2 : uporabljena laboratorijska oprema

OPREMA	PROIZVAJALEC
Analitska tehnica	Mettler Toledo
Avtoklav	Kambič
EPR	Bruker
Inkubator	Binder
Laminarij	Gelaire
Sondni sonikator	Misonix
Stresalnik	Tehtnica Železniki
UV-Vis spektrometer	Perkin-Elmer
Vodna kopelj s sonikatorjem	Branson
Vodna kopelj za temperiranje	Julaba
Zmrzovalna omara (-80 °C)	Sayo

### 3.1.3. Nanomaterial

Uporabljene titanovo-dioksidne nanocevkke (TiO<sub>2</sub>-NT) je sintetizirala dr. Polona Umek (F5, IJS) iz anatazne oblike TiO<sub>2</sub> s hidrotermalno metodo.



**Slika 3 : Nanomaterial**

Mikrografija TiO<sub>2</sub> nanocevk posneta z elektronskim transmisijskim mikroskopom (TEM).

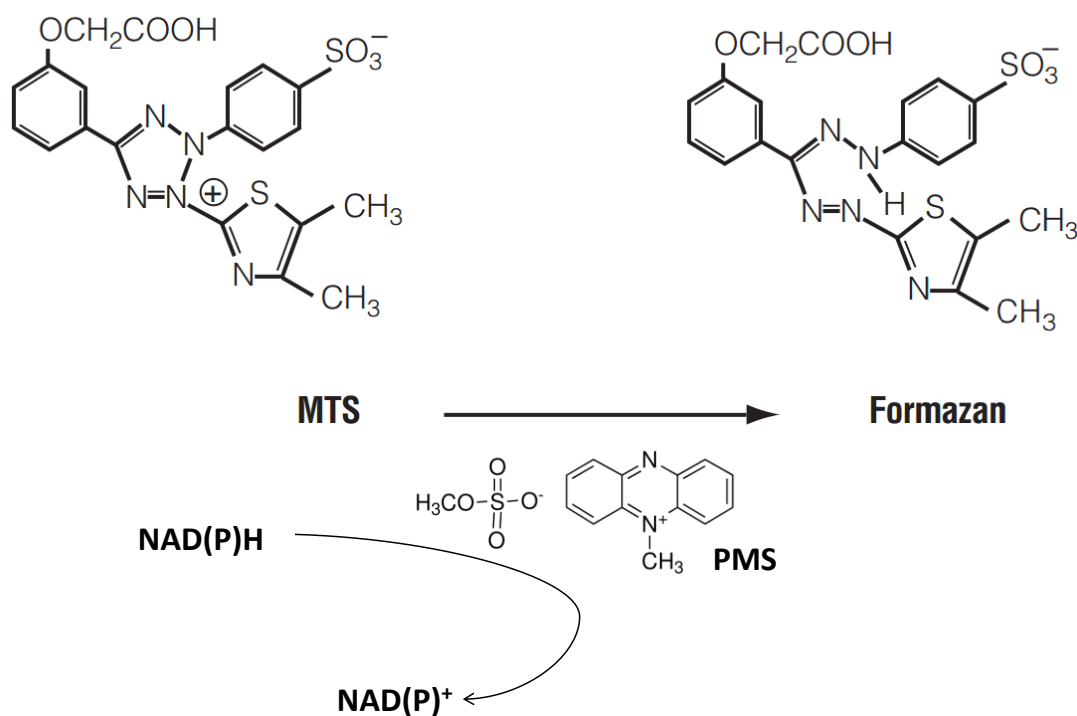
### 3.1.4 Gojenje MCF-7 celic

MCF-7 linija celic duktalnega adenokarcinoma dojke je bila nabavljena pri ATCC. Pred začetkom vsakega eksperimenta so bile celice sveže odmrznjene in gojene do tretje pasaže, ko so bile uporabljene za eksperimente. Za gojenje smo uporabljali obogaten DMEM Glutamax celični medij, ki smo ga menjali vsak drugi dan. Celice so bile presajene, ko so dosegle ~80 % konfluentnost.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 MTS – preživetveni test

MTS test (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium) je novejša različica najbolj znanega tetrazolijevega preživetvenega testa, MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dipeniltetrazol bromid). Glavna prednost novega testa je vodotopen končni produkt, za razliko od MTT, kjer se je reduciran produkt izkristaliziral in zato moral biti naknadno raztopljen v organskem topilu, navadno v DMSO-ju oziroma v SDS-u raztopljen v šibki hidroklorovi kislini. To se zgodi, ker je pozitiven naboj na tetrazolijevem jedru uravnotežen z negativno nabito sulfatno skupino na fenolnem obroču, kar tvori t.i. »notranjo sol«. Če to združimo z raho kislino karboksimetoksi skupino na drugem fenolnem obroču, ugotovimo, da MTS zelo težko, če sploh, prehaja celične membrane. V pomoč pri tem je MTS-u sicer celosten lipofilni profil, ki bi lahko premagal šibek negativni naboj in tako pospeševal omejen membranski prehod.



Slika 4: MTS test

Shematski prikaz redukcije tetrazolijevega testa MTS ob pomoči elektronskega prenašalca PMS.

Ker težko prehaja membrano, se MTS ne more reducirati v citoplazmi oziroma v mitohondrijih, temveč zato potrebuje intermediatni elektronski akceptor, ki sprejme elektron na mestu, kjer poteka celična redukcija in ga prinese do/čez membrano kjer posredno reducira MTS molekulo. Ta elektronski akceptor se ponavadi doda naknadno, mi pa smo uporabljali »vse-v-enem« raztopino, ki je že vsebovala prenašalec - v našem primeru PMS (fenazin metosulfat). MTT test prenašalca ne potrebuje, medtem ko pri MTS-u in ostalih topnih tetrazolijevih soleh redukcija ne poteče brez njega (oziramo samo minimalna količina, ki jo pospešuje membranski potencial).

Donor elektrona za redukcijo je v največji meri NAD(P)H, proces pa katalizirajo oksidoreduktaze, največji prispevek med njimi pa ima mitohondrijska različica oksidoreduktaz znana kot NADH:ubikvinon oksidoreduktaza oziroma Kompleks I mitohondrijske dihalne verige. Preprost koncept za tetrazolijevimi testi je: več celic, več aktivnih Kompleksov I, več NADH, več redukcije testne molekule in formacije produkta, ki močno absorbira pri 490 nm (formazan). V fizioloških pogojih pa je koncentracija NADH seveda odvisna še od kopice drugih faktorjev, tako da z gotovostjo lahko trdimo samo, da je MTS test dober indikator koncentracije NADH v citoplazmi, več o aktivnosti posameznih komponent pa težko trdimo.

#### 3.2.1.1 MTS – izvedba

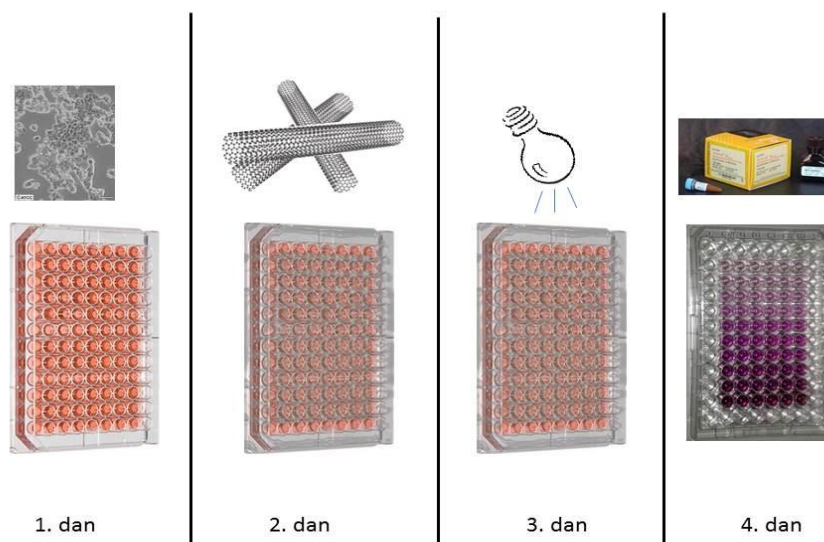
Za MTS preživetveni test smo uporabljali MCF-7 celice četrte pasaže, gojene v 75 mm gojitvenih stekleničkah. Na prvi dan eksperimenta smo odstranili obogaten DMEM medij in celice sprali s PBS pufrom. Po dodatku tripsina in 5 min inkubaciji na 37 °C, smo tripsin nevtralizirali z obogatenim DMEM medijem in odlepljene, suspendirane celice v odvzetem prešteli s pomočjo obrnjenega svetlobnega mikroskopa in hemocitometra. Vzorec je bil ustrezno rečen, po navadi 5- do 8-krat, odvisno od gostote celic v prvotni gojitve steklenički. Celice so bile vedno preštete v vsaj štirih hemocitometričnih kamricah, katerih število celic je bilo višje od 100. Po izračunu povprečja celic na kamrico smo izračunali število celic v začetnem vzorcu (gojitveni steklenički) po formuli:

$$X = X_1 \times R \times 10^4 \quad \dots(1)$$

Kjer je  $X$  število celic v začetnem vzorcu (gojitvena steklenička),  $X_1$  povprečje števila celic v kamricah hemocimetra in  $R$  faktor (red) rečitve vzorca za štetje (navadno 5-8).

Po preštetju nasadimo točno 5000 celic v vsak bazenček 96-mikrotiterske plošče in pustimo inkubirati na 37 °C za 24 h.

Drugi dan previdno, z zaščitno masko, natehtamo nanomaterial in ga suspendiramo v 1M KOH (pH 11) pri koncentracijo 10 mg/ml. Vzorec soniciramo v sonikatorju z »mikro sondo« na ledeni kopeli pri frekvenci 90 kHz 20 min z 10 s VKLOP intervalom in 5 s IZKLOP intervalom. Za vsak primer je bila suspenzija še avtoklavirani pri 121 °C za 25 min. Suspenzija je bila nato redčena na prej določene koncentracije (1-1000 µg/ml) z obogatenim DMEM medijem in dodana z multikanalno pipeto dan prej nasajenim celicam, katerim je bil prej odstranjen star medij. Kontrolni populaciji celic je bil dodan enak volumen čistega 1 M KOH brez nanodelcev. Sledila je 24 urna inkubacija.



**Slika 5: Test MTS-2**

Potek in postavitev eksperimenta testiranja citotoksičnosti.

Tretji dan so bile celice, namenjene UV obsevanju, postavljene pod nosilec, v katerega je bilo vpetih 16 svetlobo emitajočih (LE) diod z valovno dolžino 360 nm. Obsevanje je trajalo 24 ur z 15 min VKLOP intervalom in 3h IZKLOP intervalom.



Zajem in analiza podatkov sta bili opravljene četrni dan. Temperirana »vse-v-enem« raztopina MTS testa (CellTiter 96® AQueous One Solution), z že dodanim reagentom za sklapljanje elektronov PMS (fenazinovim metasulfatom), je bila dodana celicam v takem razmerju, da je predstavljala 20 % celotnega volumna. Celice so bile nato inkubirane nadaljne 4 ure na 37 °C. Po štirih urah smo na bralniku mikrotiterskih plošč TECAN M1000 izmerili absorbanco nastalega produkta pri valovni dolžini 490 nm in referenčni valovni dolžini 670 nm. Prav tako so bile preverjene valovne dolžine vseh možnih kontrolnih kombinacij in ozadij, ki bi pokazale potencialne interference med testom in nanodelci.

Absorbanca je bila zajeta z licenčno INFINITE M1000 PRO programsko opremo. Podatki so bili obdelani z MS Excel2010, Systat SigmaPlot13 in OriginLab OriginPro8 programsko opremo. Test je bil ponovljen najmanj 3-krat (500 µg/ml) in največ 9-krat (100 µg/ml).

### **3.2.2 Klonogenični test – test proliferacije**

Klonogenični test temelji na dejstvu, da se je vsaka rakava celica v klasičnih celičnih linijah sposobna deliti nešteto krat ob stalnem dotoku hranil in jo tako lahko smatramo kot »rakavo matično celico«. Rezultat tega je rakava kolonija. Če celice nasadimo dovolj narazen, da se ne stikajo, potem lahko trdimo, da je vsaka makroskopska kolonija rakavih celic sestavljena iz celic, ki so vse potomke ene same rakave matične celice. S tem ugotovimo, koliko od nasajenih celic je ohranilo proliferacijski potencial.

#### **3.2.2.1 Klonogenični test – izvedba**

Prvi del eksperimenta je bil identičen postopku opisanem v poglavju 3.2.1.1 (MTS – izvedba) z razliko, da so bile namesto 96-mikrotiterskih plošč uporabljene 25 mm gojitvene stekleničke ter samo najvišja koncentracija TiO<sub>2</sub>-NT, 1 mg/ml, ki je bila dodana direktno v gojitvene stekleničke. Sam eksperiment so tako sestavljale 4 gojitvene stekleničke z nasajenim celicami ( $1,2 \times 10^6$ ), vsaka za eno konfiguracijo (kontrola,

obsevana kontrola, dodan nanomaterial, dodan in obsevan nanomaterial). Eksperiment je bil ponovljen 3-krat.

Četrty dan, po končanem UV tretiranju, so bili celice tripsinizirane, centrifugirane, razredčene v svežem obogatenem DMEM mediju in nato barvane z barvilom Tripan Modro in sicer v volumskem razmerju (v/v) 50 % barvila in 50 % celičnega vzorca 3 min. Barvan vzorec je bil nato naložen v kamrice hemocitometra, kjer smo prešteli število mrtvih (modrih) in živih celic, ter tako dobili osnovni podatek viabilnosti.

Samo informacijo števila celic pa smo uporabili tudi za sam klonogenični test. Tretirane celice vsake izmed prej omenjenih štirih konfiguracij, smo nasadili v bazenčke treh plošč s po šestimi bazenčki in sicer po 100 celic ene konfiguracije v vseh 6 bazenčkov prve plošče, 200 celic v vseh 6 bazenčkov druge plošče in nenazadnje 300 celic iste konfiguracije v vseh 6 bazenčkov tretje plošče. Vsem 12-im ploščam je bil nato dodan obogaten DMEM medij.



**Slika 6: Klonogenični test**

Druga ponovitev klonogeničnega testa, prešteta. Na sliki 3 gostote nasaditve kontrolnih celic in 3 gostote nasaditve z  $\text{TiO}_2$ -NT tretiranih in UV obsevanih celic.

Plošče so se 14 dni inkubirale pri  $37^\circ\text{C}$ , medij smo menjavali vsak tretji dan. Po 14-ih dneh, ko so bile nastale celične kolonije že z lahkoto opazne s prostim očesom, smo jih pobarvali s barvilom Kristal Vijolično in prešteli makroskopsko, ter s pomočjo obrnjenega svetlobnega mikroskopa. Po štetju smo kolonije fiksirali z metanolom, ohlajenim na  $-80^\circ\text{C}$ , za primer ponovnega štetja.

Podatki so bili obdelani z MS Excel2010, Systat SigmaPlot13 in OriginLab OriginPro8 programsko opremo. Test je bil ponovljen 3-krat.

### 3.2.3 UV–VIS spektroskopija – test sedimentacije

Uporaba spektrofotometra ultravijolične in vidne svetlobe za ocenitev posedanja materiala, je ena najbolj osnovnih laboratorijskih tehnik. Temelji na principu prepustnosti ( $T = I/I_0$ ), intenzitete svetlobe, ki jo zaznamo na detektorju ( $I$ ), po tem ko začetni žarek ( $I_0$ ) potuje skozi vzorec s suspendiranim materialom.

Posedanje je največkrat prikazano kot % absorbance v času, pri čemer je absorbanca:

$$A = -\log(\%T/100 \%) \quad \dots(2)$$

#### 3.2.3.1 UV–VIS spektroskopija – izvedba

Za test sedimentacije smo izmerili posedanje štirih različnih vzorcev sestavljenih iz dveh koncentracij nanodelcev (100 in 1000  $\mu\text{g/ml}$ ), pripravljenih v dveh izvedbah, eni s popolnim obogatenim DMEM medijem in drugi s čistim DMEM medijem, brez dodanega FBS. Koncentracije so bile dnevno sveže pripravljene s prej soniciranim (90 kHz, 20 min) nanomaterialom. Izbrana koncentracija s končnim volumnom 1 ml je bila prepipetirana v plastično UV-prepustno kiveto (enake optične lastnosti kot kvarčna kiveta, vendar za enkratno uporabo) ter vstavljena v spektrofotometer. Meritev sedimentacije je potekala nepretrgoma 24 h pri valovni dolžini 400 nm.

Podatki so bili obdelani z MS Excel2010, Systat SigmaPlot13 in OriginLab OriginPro8 programsko opremo. Vsak od 4-ih vzorcev je bil pomerjen trikrat, narisano je bilo povprečje vseh meritev.

### 3.2.4 Gašenje fluorescence – test albumin-nano interakcije

Gašenje fluorescence je znižanje intenzitete opazovane fluorescence zaradi interakcije med fluorofori. Ravno zaradi tega nam sicer tako moteč in nezaželen pojav v našem primeru izda interakcije med fluorofori in okoliškimi molekulami. Do gašenja lahko pride zaradi statičnega kompleksa molekule s fluoroforjem, kar zmanjšuje verjetnost za prehod v

ekscitirano stanje. Lahko pa do gašenja pride tudi zaradi trkov, med katerimi pride do Dexterjevega elektronskega prenosa (prostorsko prekrivanje elektronskih orbit fluoroforja in molekule), FRETa oziroma Försterjevega resonančnega prenosa energije (nesevalni prenos energije zaradi interakcije dipolov) ter začasnega formiranja ekscipleksov (t.i. kratkoživih dimerov z ekscitiranim atomom s popolnoma zasedeno valenčno orbitalo).

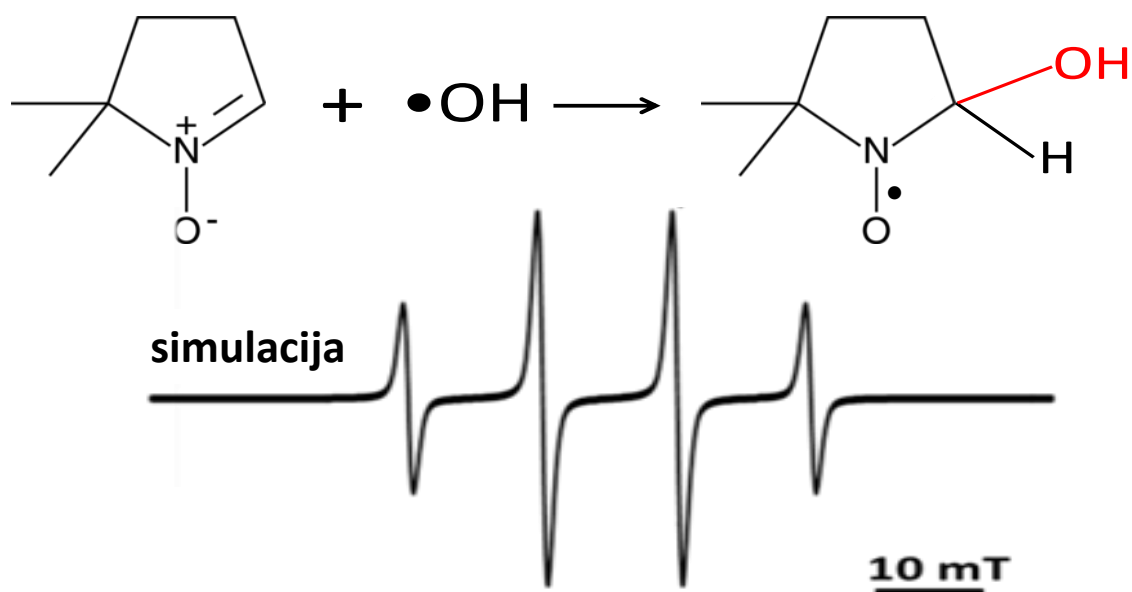
#### 3.2.4.1 Gašenje fluorescence – izvedba

Za ocenitev interakcije serumskih proteinov in nanomateriala, smo uporabili TiO<sub>2</sub> nanocevke, ki so imele preko APMS linkerja vezan fluorofor Alexa488. Nanocevke smo suspendirali v vodi in nato prenesli suspenzijo v črne 96-mikrotiterske plošče, namenjene merjenju fluorescence in sicer 100 µl suspenzije na bazenček. Vzorce smo potem titrirali s postopnim dodajanjem 2 µl FBS in konstantnim merjenjem širokega emisijskega spektra (280-660 nm) ob eksitaciji s svetlobo valovne dolžine 250 nm. Titracija je potekala do končnega volumna 150 µl. Meritve so potekale na TECAN1000 fluorescenčnem bralniku mikrotiterskih plošč in sicer 8 bazenčkov naenkrat.

Podatki so bili obdelani z MS Excel2010, Systat SigmaPlot13 in OriginLab OriginPro8 programsko opremo. Narisano je povprečje treh eksperimentov, vsak je imel 8 paralelk.

#### 3.2.5 EPR – test aktivnosti nanomateriala

Elektronska paramagnetna resonanca je spektroskopska metoda preučevanja prostih elektronov v zunanjem magnetnem polju obsevanih z elektromagnetnim valovanjem v mikrovalovnem območju. Temelji na prehodu spinskega (magnetnega) momenta prostega elektrona v magnetnem polju v višje energijsko stanje zaradi absorpcije elektromagnetnega valovanja.



**Slika 7: EPR**

Reakcija spinskega lovilca DMPO in hidroksilnega radikala, ki rezultira v formacijo spinskega adukta DMPO-OH•. Spodaj EPR simulacija njegovega spektra

Ta tehnika je najbolj natančna in zanesljiva metoda merjenja in indentifikacije prostih elektronov v vzorcih, s tem pa tudi prostih radikalov, ionov prehodnih kovin in drugih spojin s paramagnetnimi centri, ki so vitalnega pomena za fiziološko homeostazo. Ker so vzbujena energijska stanja zelo kratkoživa in v živih sistemih takoj reagirajo s sosednjimi molekulami, jim pri EPR metodi največkrat podaljšamo življenjski čas tako, da dodamo nitronske spinske lovilce. Le-ti kovalentno vežejo molekule s prostim elektronom, pri čemer nova molekula obdrži paramagnetni značaj radikala (preide v nitroksid) in ima poleg tega še znatno daljši življenjski čas, kar zadostuje za zajem EPR spektra.

### 3.2.5.1 EPR – izvedba

Fotokatalitično aktivnost nanocevk v fizioloških pogojih smo testirali s kvantifikacijo nastalih prostih radikalov z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR), bolj natančno, merili smo spremembo intenziteta DMPO-adukta hidroksilnega radikala glede na odsotnost oziroma prisotnost FBS. Poleg prisotnosti serumskih proteinov smo preverjali še vpliv sedimentacije na produkcijo radikalov, s katero smo oponašali »staranje« vzorca, kar

pomeni da smo vzorec inkubirali 1 h na temnem prostoru. S tem smo dopustili, da se je ves nestabiliziran material posedel na dno.

Ko že omenjeno, testirali smo dva parametra, zato smo potrebovali 4 vzorce: vzorec FBS+ (staran in nestaran) ter FBS- (staran in nestaran). Vzorce smo pripravljali v bazenčkih na skrbno očiščenih polietilen terefatnih (PET) ploščicah. Vzorec je bil sestavljen iz čistega oziroma obogatenega DMEM medija, kateremu so bile dodane že prej sonicirane TiO<sub>2</sub> nanocevke v 1 M KOH. Končni volumen bazenčka na tej stopnji je bil 18 µl. Polovica vzorcev je bila nato inkubirana v temi 1 h, medtem ko je polovica vzorcev takoj prešla v drugo fazo.

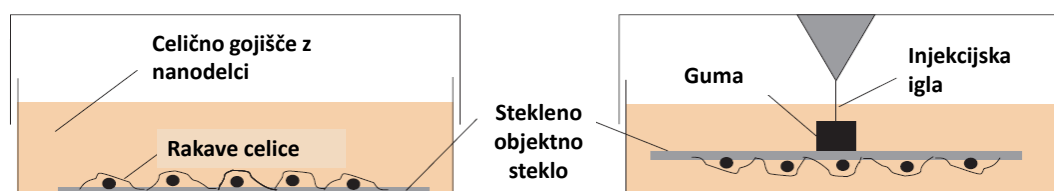
V drugi fazi smo posamezne bazenčke na PET ploščici obsevali z UV LED diodo z valovno dolžino 360 nm za 5 min. Še pred tem smo vsem vzorcem dodali 2 µl (20 % v/v; končni volumen 20 µl) 1 M spinskih lovilcev 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksida (DMPO), ki se z nastalimi radikali kovalentno veže v bolj stabilne produkte, katerih življenjski časi so dovolj dolgi, da jih lahko zaznamo z EPR. Po 5 min obsevanju smo vzorec nemudoma posrkali v stekleno kapilaro (1,5 mm x 100 mm) in jih previdno vstavili v EPR resonator, ki je bil prej uglašen s kontrolnim vzorcem. Ko že omenjeno, spremljali smo signal DMPO-OH• adukta (slika 7), ki je naj bi bil indikator OH• produkcije, vendar velja omeniti še, da je vir merjenega signala lahko tudi kompleks DMPO in superoksida (DMPO-O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>), ki pa nadalje spontano razpade v merjeni DMPO-OH• kompleks. Superoksid je tudi produkt fotokatalitične aktivnosti materiala, tako da njegovega pripevek k signalu ne smatramo kot artefakt.

EPR spektri so bili zajeti na ELEXSYS E500 9.6 GHz EPR spektrometru z licenčno BRUKER XEPR programsko opremo. Podatki so bili obdelani z MS Excel2010, Systat SigmaPlot13, OriginLab OriginPro8 in EPRSim programsko opremo. Vsak vzorec je imel 10 ponovitev, narisano je normalizirano povprečje intenzitete spektrov, ki je bilo izračunano iz povprečja višine vrhov ponovitev.

### 3.2.6 Obrnjena konfiguracija gojenja celic – test vpliva sedimentacije

Zaradi očitnega posedanja pri vseh dosedanjih eksperimentih pri najvišji koncentraciji 1 mg/ml, smo se odločili ovrednotiti ta fenomen. Kot omenjeno že v pregledu literature, se v zadnjem času pri toksikoloških testih vse več pozornosti namenja tudi individualnim kemo-fizikalnim lastnostim posameznih delcev, med drugim tudi posedanju zaradi agregacije/aglomeracije ter vplivu organskih molekul v sistemu.

Po nam dostopnih podatkih se je do sedaj samo ena raziskovalna skupina poizkušala izogniti posedanju in ovrednotiti zgolj vpliv difundirajočih aktivnih nanodelcev (Cho in sod., 2011). Izdelali so platformo za gojenje celic in ocenitev internalizacije zlatih nanodelcev, ki je zaobšla sedimentacijo z obrnjenim gojenjem in tretiranjem celic.



**Slika 8: Obrnjena konfiguracija 1**

Do sedaj edina iz literature znano konfiguracija testiranja količine internalizacije nanodelcev, ki popolnoma zaobide sedimentacijo. Prirejeno po (Cho in sod., 2011).

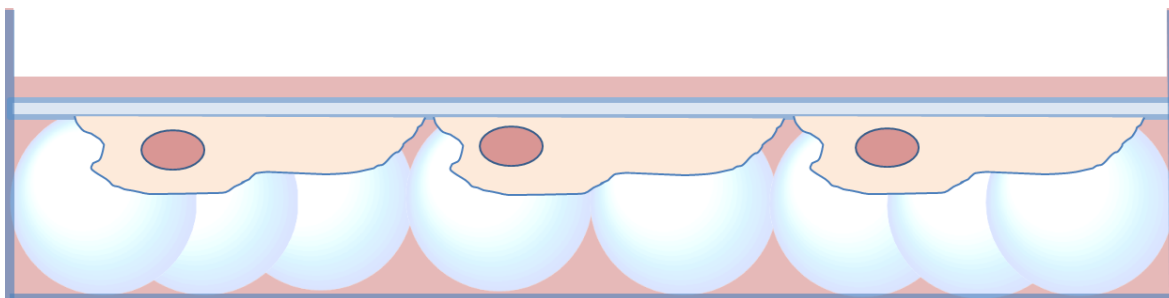
Zgoraj predstavljena postavitve se je izkazala za učinkovito, vendar težavno in časovno zahtevno. Zato smo izdelali poenostavljeno in ekonomsko bolj učinkovito konfiguracijo, ki pa še vedno učinkovito zaobide sedimentacijo.

#### 3.2.6.1 Obrnjena konfiguracija gojenja celic – izvedba

Eksperiment je potekal v enakem vrstnem in časovnem redu kot MTS test (1. sajenje celic, 2. dodatek materiala, 3. obsevanje, 4. zajem rezultatov) vendar smo zaradi lažje izvedbe uporabljali drugačno laboratorijsko plastiko in steklovino. Prvi dan smo nasadili 30.000 celic iz četrte pasaže v plošče z 24 bazenčki (notranji premer bazenčka: 15,4 mm), v katere so bili že prej vstavljeni poliklorotrifluoroetilenski (PCTFE) celični nosilci



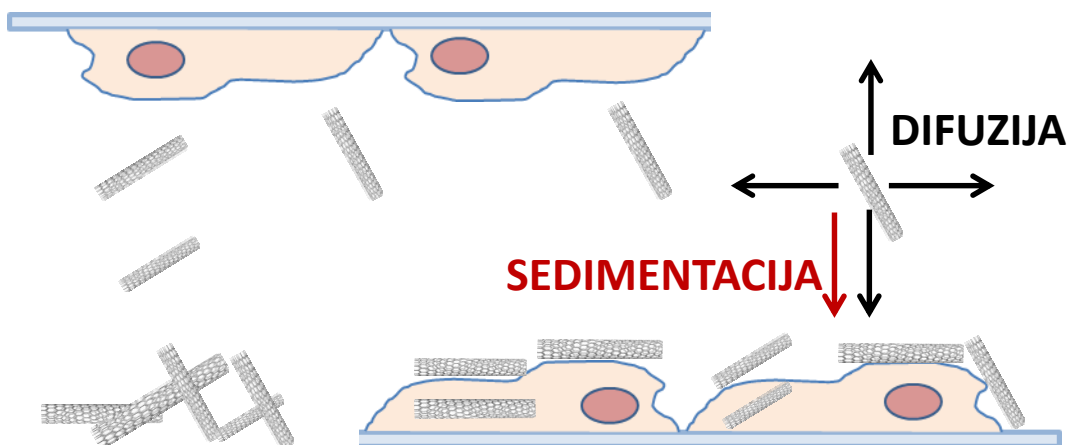
prevlečeni s poli-L-lizinom (premer: 12 mm). Celice so bile dodane v svežem obogatenu DMEM mediju, do končnega volumna 700 µl in inkubirane na 37 °C za 24h.



**Slika 9: Obrnjena konfiguracija 2**

Uporabljena obrnjena konfiguracija, ki nam je omogočila tretiranje celic z nanomaterialom, brez vpliva posedanja.

Drugi dan so bili celični nosilci, zdaj z že pritrjenimi MCF-7 celicami, prestavljeni v novo ploščo z 24 bazenčki, v bazenčke na podstavek iz 9-ih steklenih kroglic premera 5 mm, postavljenih v konfiguracijo »prstana«, ob robu samega bazenčka (slika9). Bazenčkom, ki so bili tako pripravljene za obrnjeno konfiguracijo, smo dodali še obogaten oziroma čist DMEM medij z dodatkom soniciranih in avtoklaviranih TiO<sub>2</sub>-NT oziroma brez le-teh (vse kombinacije). Končni volumen je bil 700 µl. Po dodatku medija, smo celične nosilce iz prvega dne sprali z temperiranim PBS in jih prenesli na obrnjeno konfiguracijo. Tako smo zagotovili, da se bo ves potencialno prisoten nanomaterial nahajal pod celicami in ne na vrhu celičnega nosilca.



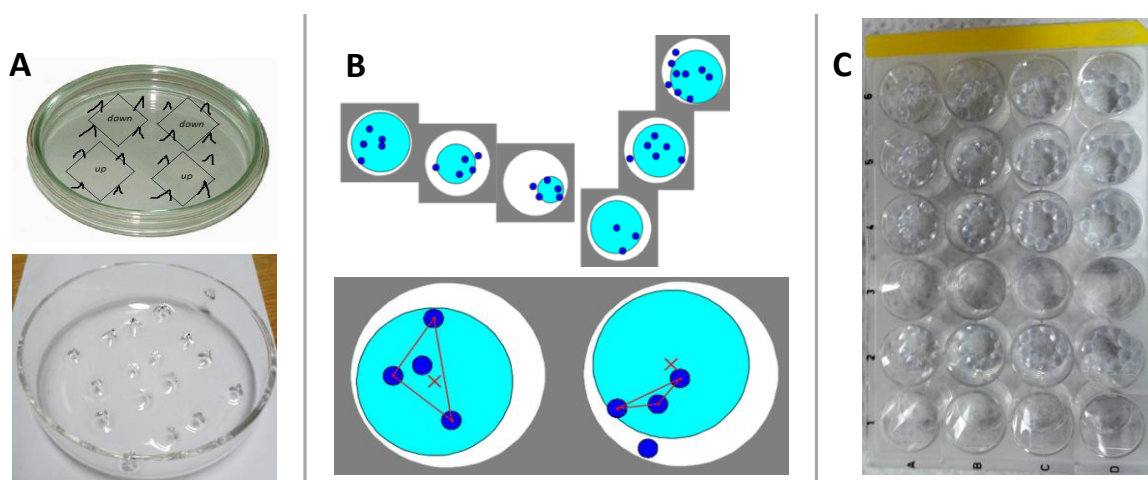
**Slika 10: Obrnjena konfiguracija 3**

Schema sil, ki vplivajo na delce, ter njihovo obnašanje v celičnem mediju.

Celični nosilci kontrol, ki niso bili namenjeni obrnjeni ampak klasični konfiguraciji (celice na dnu bazenčka, obrnjene navzgor), so bili prav tako sprani s PBS in nato prestavljeni v nove, prazne bazenčke, katerim je bil nemudoma za tem dodan določen medij (FBS+/-, TiO<sub>2</sub>-NT +/-). Končni volumen je bil zopet 700 µl. Tako smo zagotovili, da se bo ves potencialno prisoten nanomaterial posedel na celice in ne pod celični nosilec (slika10). Vse plošče smo nato inkubirali 24 h pri 37 °C.

Tretji dan smo izbrane plošče obsevali 24h z UVA svetlobo valovne dolžine 360 nm.

Četrty dan smo izvedli zajem rezultatov z resazurinskim oziroma DCF testom.



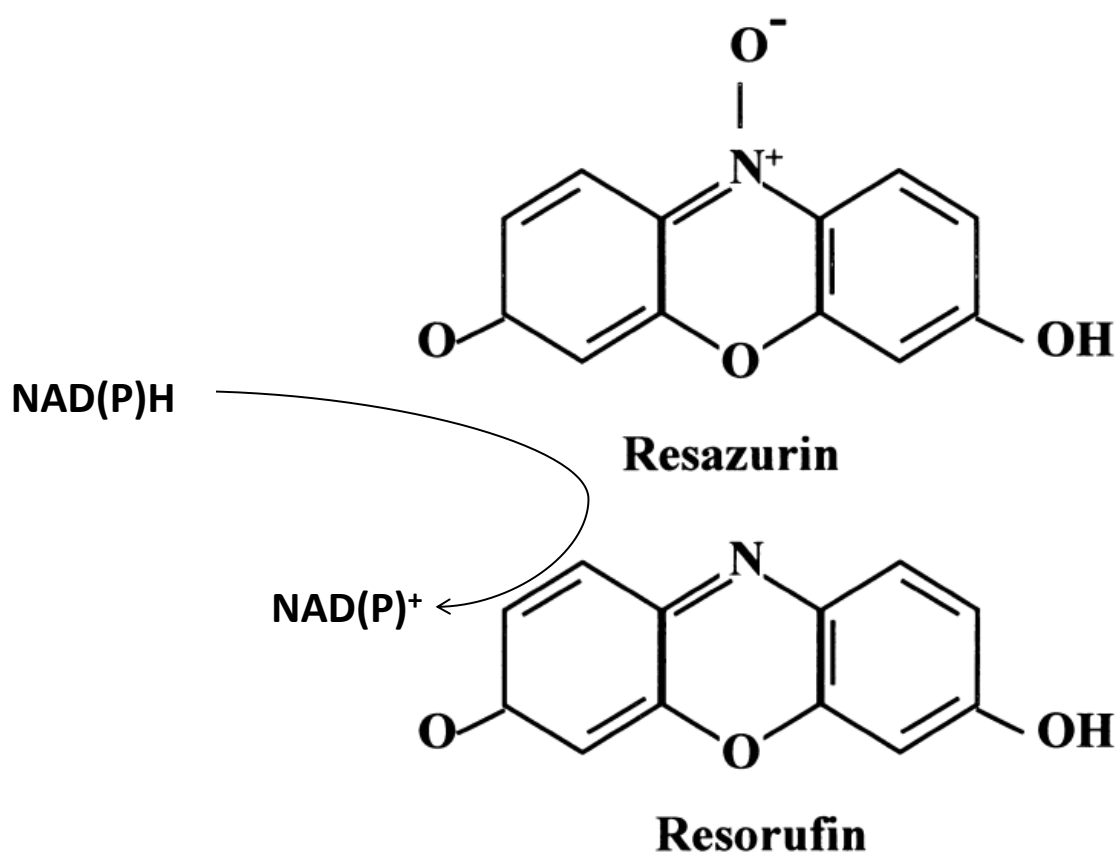
**Slika 11: Obrnjena konfiguracija**

(A) Prva preizkušena konfiguracija za obrnjeno gojenje celic, ki zaradi nestabilnosti nosilca ni dajala ponovljivih rezultatov. (B) Shema druge obrnjene konfiguracije, kjer je bil celični nosilec dvignjen s pomočjo steklenih celic. Izkazala se je za neuporabno, zaradi abrazije celic s strani steklenih kroglic. (C) Končna, uspešno uporabljena, obrnjena konfiguracija, kjer je nosilec stabiliziran s strani steklenih kroglic, stabilno urejenih v formacijo prstana.

### 3.2.7 Resazurinski test – preživetveni test

Resazurinski preživetveni test se uporablja že več kot 70 let pri monitoringu mleka za prisotnost bakterij ali gliv ter pri monitoringu kakovosti semena semenskih bikov. Kljub temu še vedno ni povsem jasen mehanizem, kot tudi ne mesto njegove redukcije. V

zadnjem času je bil sprejet konsenz, da je za redukcijo odgovoren enak mehanizem, kot za tetrazolijeve teste, z nekaj izjemami. Prva razlika je ta, da je končni produkt redukcije resazurina, resorufin, fluorescenčna molekula, druga pa, da sama redukcija, za razliko testov z tetrazolijevimi solmi, verjetno poteče v celični citoplazmi, nakar jo celica izloči v zunajcelični prostor. Resazurin za svojo redukcijo prav tako ne potrebuje elektronskega prenašalca, elektron za redukcijo namreč prispeva direktno NAD(P)H. Del te redukcije zagotovo poteče tudi v mitohondrijih, vendar več kot polovico prispevajo citoplazemski producenti NAD(P)H.



Slika 12: Resazurinski test

Redukcija nefluorestenčnega resazurina v fluorestenčen Resorufin.

### 3.2.7.1 Resazurinski test – izvedba

Po izvedbi 4-dnevnega eksperimenta vpliva sedimentacije TiO<sub>2</sub>-NT na preživetje celic (3.2.6.1), je bil eden od treh opravljenih testov resazurinski test preživetja. Resazurin v

obliki natrijeve soli je bil raztopljen v DMEM mediju brez FBS, obogatenem z glukozo. Ker je resazurinski test fluorescenčni test, v mediju ni bilo pH indikatorja Fenol rdeče, saj bi lahko slednji interferiral s fluorescenčnimi meritvami. Končna koncentracija resazurina je bila 10<sup>-4</sup> M. Resazurin je bil vse skozi ščiteno pred svetlobo, ki lahko povzroči njegovo redukcijo še pred izpostavitvijo celicam.

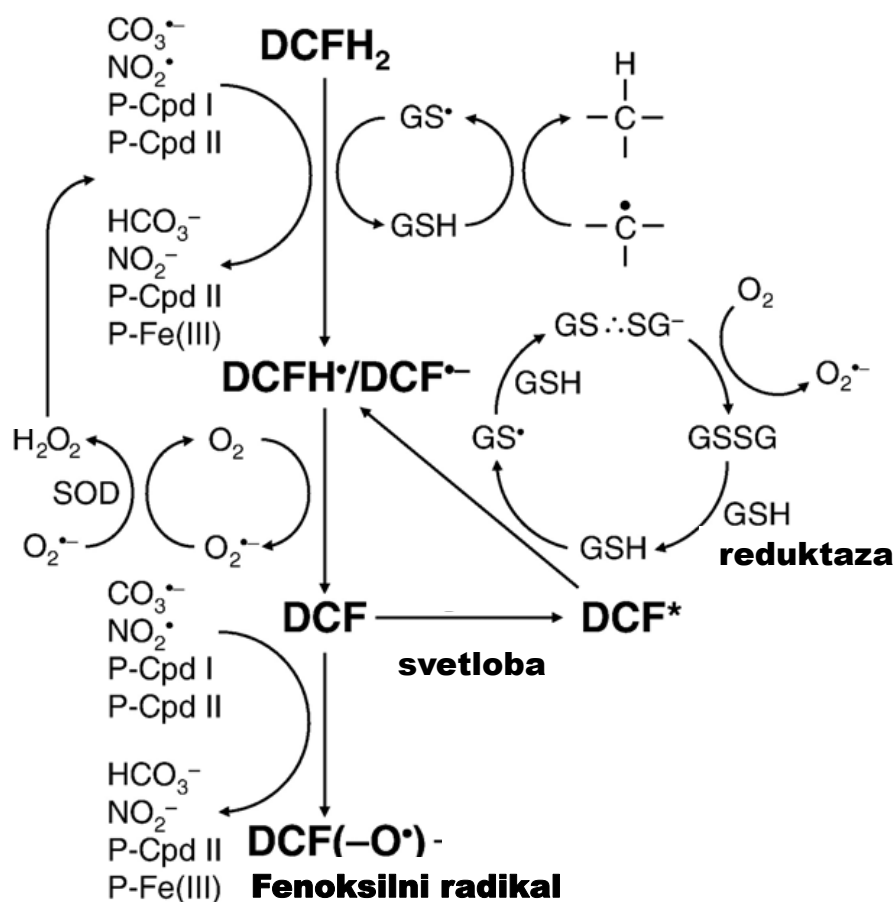
Celični nosilci so bili zopet sprani v svežem temperiranem PBS in vstavljeni v nove plošče s 24 bazenčki. Tokrat so bili vsi v klasični konfiguraciji, se pravi s celicami obrnjenimi navzgor, brez steklenih kroglic. Po prestavitvi vzorcev je bila vsem nosilcem dodana prej pripravljena raztopina resazurina. Končni volumen je bil 700 µl. Sledila je 3-urna inkubacija pri 37 °C.

Ker so bile uporabljene plošče s 24 bazenčki iz prosojne plastike, ki ni uporabna za snemanje fluorescence, smo po treh urah prepipetirali reducirano raztopino resazurina v 96-mikrotiterske črne plošče za merjenje fluorescence. Iz vsakega bazenčka z 700 µl na 24-mikrotiterski plošči, smo prepipetirali 4-krat po 100 µl v 4 bazenčke na 96-mikrotiterski plošči (povprečje teh štirih bazenčkov nam da napako pipetiranja). Po pipetiranju smo nemudoma izmerili emisijo pri 590 nm na TECAN M1000 fluorescenčnem bralniku plošč, in sicer pri eksitaciji 560 nm. Prav tako so bile izmerjene kontrole brez celic in ozadja.

Fluorescenčni spektri so bili zajeti z licenčno INFINITE M1000 PRO programsko opremo. Podatki so bili obdelani z MS Excel2010, Systat SigmaPlot13 in OriginLab OriginPro8 programsko opremo. Vsaka različica eksperimenta (kontrola, UV, TiO<sub>2</sub>-NT, TiO<sub>2</sub>-NT+UV), ki je potekala sočasno, je imela svojo ploščo (24 bazenčkov, 24 celičnih nosilcev) pri posamezni ponovitvi. Konfiguracija brez FBS je bila ponovljena 3-krat (72 preverjenih celičnih nosilcev za vsako različico), medtem, ko je bila konfiguracija s FBS ponovljena 6-krat (144 preverjenih celičnih nosilcev za vsako različico). Narisane so povprečne vrednosti intenzitete fluorescence s standardno napako.

### 3.2.8 DCF test – test celičnega stresa

2',7'-Diklorofluorescein diacetat (2',7'-DCFH-DA) je nefluorescenčna molekula, ki zaradi vezene acetata z lahkoto prehaja celično membrano. V citoplazmi pride v stik z celičnimi esterazami, ki cepijo diacetata proč od molekule in tako poskrbijo, da ostane v celici. Nova oblika brez acetata je izjemno občutljiva na oksidacijo in preko dveh radikalnih oblik (DCFH• in DCF•) ob prisotnosti prostih radikalov tvori 2',7'-Diklorofluorescein (DCF). Le-ta ob eksitaciji z modro svetlobo močno emitira v zelenem delu spektra.



Slika 13: DCF test

Shema vseh potencialnih dejavnikov, ki vplivajo na rezultat DCF testa.

Prيرهjeno po Wardman (2007)

Pretvorbo DCFH-DA v DCF lahko pospešijo mnoge molekule neposredno (naprimer hidroksilni radikal, superoksid...) ali posredno (vodikov peroksid). Vsekakor pa je treba

vedno imeti v mislih, da DCF test, kjub trditvam mnogim publikacijam, ni specifičen indikator za nobenega od zgoraj naštetih radikalov, temveč je pokazatelj splošnega redoks stanja celice.

#### 3.2.8.1 DCF test - izvedba

Po izvedbi 4-dnevnega eksperimenta vpliva sedimentacije TiO<sub>2</sub>-NT na preživetje celic (3.2.6.1), je bil eden od treh opravljenih testov DCF test celičnega stresa. Na začetku pripravimo 10 mM založno raztopino 2',7'-Diklorofluorescein diacetata (2',7'-DCFH-DA) v čistem DMSO. Založno raztopino nenehno ščitimo pred svetlobo, ker lahko le-ta začne cikel avtooksidacije, ki bi nam lahko povzročil artefakte v kasnejših meritvah s celicami.

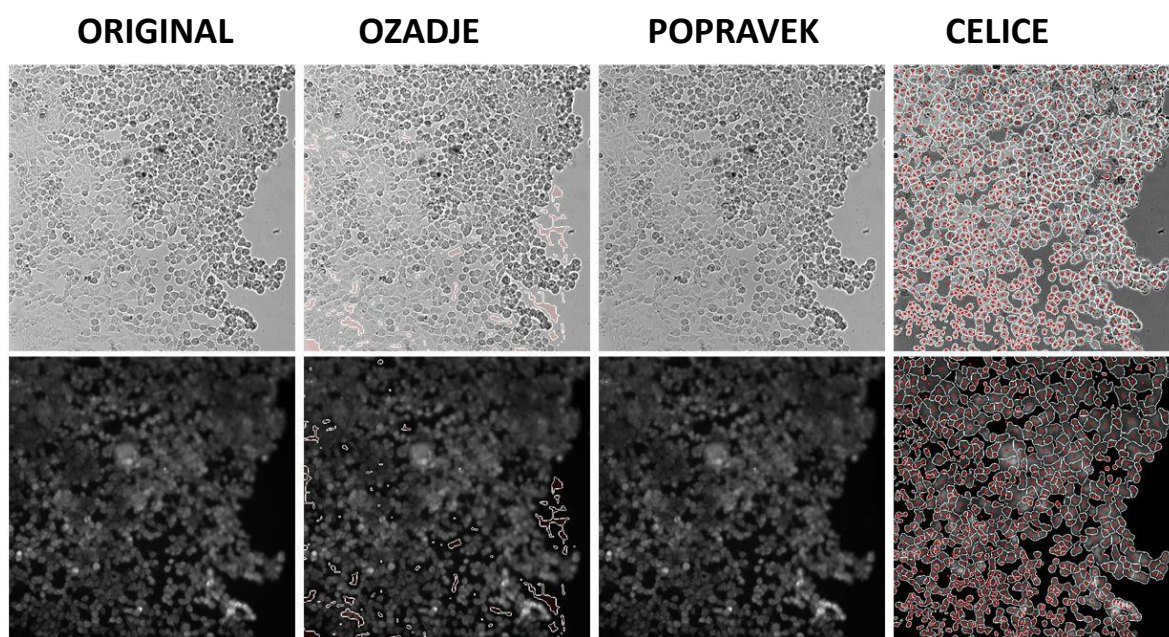
Po pripravi založne raztopine poberemo tretirane celice na nosilcih iz 24-mikrotiterskih plošč in jih speremo v čistem, temperiranem PBS. Potem nosilce previdno položimo v konfokalne posodice, ki imajo na dnu 13 mm široko in 0,11 mm globoko luknjo, ki je iz zunanje spodnje strani prekrita s krovnim steklom. Nosilce vstavimo tako, da so celice obrnjene navzgor. V 2 ml epici pripravimo končno koncentracijo DCFH-DA, tako da dodamo 2 µl založne DMSO raztopine DCFH-DA (10 mM) v 1998 µl PBS in tako dobimo končno koncentracijo 10 µM. S 1000-kratnim redčenjem poskrbimo tudi za to, da koncentracija topila (DMSO) ne spremeni fiziološkega stanja celic. Koncentracije DMSO nad petimi promili namreč očitno povzročijo celični stres in zmanjšajo preživetje celic.

Po dodatku barvila postavimo celične nosilce v inkubator za 15 min. Po inkubaciji jih previdno obrnemo, tako da se celična plast zdaj nahaja med zunanjim krovnikom posodice spodaj in celičnim nosilcem zgoraj. PBS medija ni potrebno zamenjati, ker sam DCFH-DA ni fluorescenčen in tako ne viša ozadja. DCF signal lahko zdaj merimo tako s fluorometrom kot s fluorescenčnim mikroskopom. Mi smo se odločili za slednjega, ker lahko prvič neposredno ocenimo tako oksidativno stanje posameznih celic kot tudi njihovo morfologijo.

Konkavne posodice zato vpnemo v nosilec fluorescenčnega mikroskopa in posnememo serijo mikroskopskih slik. Za vsako izbrano mesto posnememo najprej sliko v svetlobnem

polju in nato še fluorescenčno sliko z valovno dolžino eksitacijske svetlobe v intervalu 430-490 nm. Dikroično zrcalo je nastavljeno na 495 nm, medtem, ko emisijo zajemamo med 506 in 594 nm. Na vsakem nosilcu posnamemo najmanj 10 mest, ki si sledijo od tistih z največjo gostoto celic, do tistih z manjšo. Slike zajemamo pri 10-kratni povečavi.

Za analizo slik je bila uporabljena namensko napisana koda v programski opremi WOLFRAM MATHEMATICA 10, ki je semi-avtomatizirala obdelavo slik. Program najprej poišče ozadje na sliki svetlega polja ter ga potem ovrednoti in odšteje na fluorescenčni sliki. Vrednost ozadja se shrani, saj predstavlja pomembno informacijo uhajanja oksidirane probe iz celice. Na isti sliki potem še označi in prešteje celice ter izmeri maksimalno intenziteto fluorescence. Ko so meje celic določene, jih prestavi še na sliko svetlega polja, kjer izmeri atenuacijo svetlobe, ki prehaja skozi celice glede na ozadje. Atenuacija je namreč zaradi sipanja svetlobe na nanocevkah pokazatelj koncentracije slednjih v celic.



**Slika 14: DCF test 2**

Semi-avtomatizirana programska oprema za obdelavo mikroskopskih slik celic v stresu.

Na koncu narišemo odvisnost maksimalne intenzitete fluorescence vsake posamezne celice od povprečja njene atenuacije v svetlem polju. Vsako različico eksperimenta (kontrola, UV, TiO<sub>2</sub>-NT, TiO<sub>2</sub>-NT+UV; vsaka od njih še FBS+/- ter obrnjena/klasična konfiguracija) je predstavljajo najmanj 6 celičnih nosilcev.

### **3.2.9 Test mitohondrijskega membranskega potenciala**

Za test mitohondrijskega membranskega potenciala tretiranih celic smo uporabili komercialno barvilo MitoTracker Orange CMTMRos<sup>®</sup>, ki naj bi selektivno obarvalo mitohondrije in sicer tako, da je fluorescenčna intenziteta posameznega mitohondrija premosorazmerna od napetosti njegovega membranskega potenciala.

Celicam dodamo reducirano obliko barvila, znano samo kot CMH2TMRos, ki prehaja celično membrano in je nato v citoplazmi s strani celičnih oksidantov oksidirana v ketonsko obliko. Zaradi pozitivnega naboja se oksidirana oblika CMTMRos začne elektroforetsko akumulirati okoli notranje mitohondrijske membrane zaradi njenega izjemno negativnega membranskega potenciala. Membranski potencial je indikator stopnje aktivnosti mitohondrijev in kot tak prisoten samo v živih in aktivnih mitohondrijih.

#### **3.2.9.1 Test mitohondrijskega membranskega potenciala - izvedba**

Po izvedbi 4-dnevnega eksperimenta vpliva sedimentacije TiO<sub>2</sub>-NT na preživetje celic (3.2.6.1), je bil eden od treh opravljenih testov test mitohondrijskega membranskega potenciala. Uporabljena laboratorijska steklovina in plastika ste bili povsem enaki kot pri izvedbi DCF meritev (3.2.8.1). Enak je bil tudi inkubacijski čas (15 min), razlika je bila le v končni uporabljeni koncentraciji MitoTrackerja, ki je bila nanomolarna, dodana z enim promilom topila (DMSO).

Po 15 min smo vzorec pogledali pod mikroskopom v svetlem polju in v fluorescenčnem načinu z eksitacijo v območju 542-582 nm in merjenjem emisiji v intervalu 596-664 nm. Dikroično zrcalo je bilo nastavljeno na 593 nm.

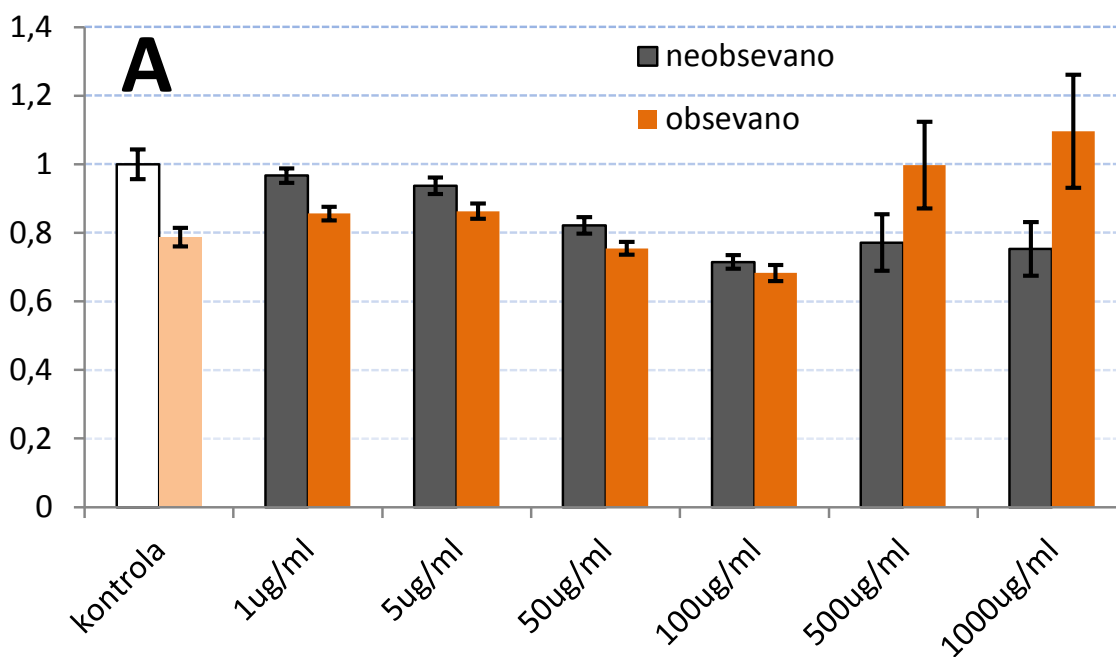


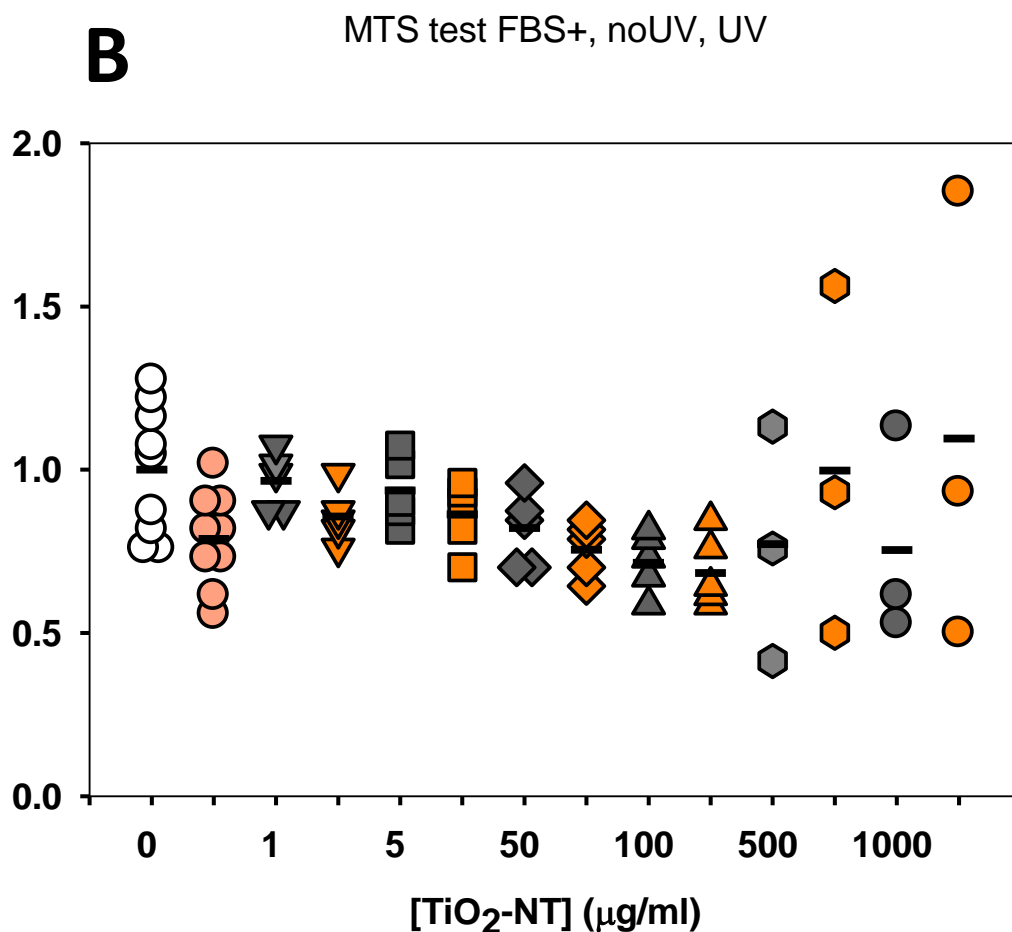
Za analizo slik je bila uporabljena namensko napisana koda v programski opremi WOLFRAM MATHEMATICA 10, ki je semi-avtomatizirala obdelavo slik.

## 4 REZULTATI Z RAZPRAVO

### 4.1 MTS TEST – KOLORIMETRIČNI TEST PREŽIVETJA

Za preverjanje biokompatibilnosti oziroma citotoksičnosti nanomateriala smo 4. dan eksperimenta, takoj po končanem 24 urnem obsevanju, uporabili MTS preživetveni test (Slika 1). Nanocevke delujejo toksično pri koncentracijah nad 50 mg/ml (Slika 2). Pri koncentraciji 100 mg/ml je tako viabilnost 71 %. Po drugi strani, pa obsevanje ne poveča fototoksičnosti nanocevk.





**Slika 15: MTS - Kolorimetrični test viabilnosti celic**

Padeč viabilnosti MCF-7 celic, normaliziran glede na netretirano kontrolo, prikazan kot (A) stolpčni graf (označena odstopanja predstavljajo standardno napako najmanj treh ponovitev) in kot (B) frekvenčni diagram z vsemi dobljenimi vrednostmi in njihovo razporeditvijo.

Zanimivo je, da je izmerjena viabilnost obsevane kontrolne skupine brez nanomateriala le 78 % preživetja neobsevane kontrole, kar je stat. signifikantna razlika ( $p < 0,05$ ), konsistentna z literaturo, ki jo je vredno podrobneje razčleniti. Bender in sod. (Bender in sod., 1997) poročajo, da UVA sevanje aktivira različne transkripcijskih faktorjev v citoplazmi, ti pa nato razne rastne faktorje, proteaze in virusne proteine. Med bolj znanimi je transkripcijski faktor AP-1, ki uravnava metaloproteinaze ekstracelularnega matriksa in tip I prokolagen in s tem prispeva k staranju kože (Rittie in Fisher, 2002).

Velja pa opozoriti, da vsi ti novi transkripti vplivajo na obsevane celice šele nekaj ur po prvi izpostavitvi. Takojšnji odziv na sevanje povzročijo predvsem signalne kaskade, inicirane s strani tirozinskih kinaz, ki se aktivirajo zaradi UV inducirane inhibicije njihovega inhibitorja, tirozinske fosfataze. Čeprav imajo nekatere od aktiviranih kaskad tirozinskih kinaz lahko pozitiven vpliv na proliferacijo obsevanih celic, je neto odziv ponavadi negativen, zato tudi padec viabilnosti obsevane kontrole. Kljub vsemu pa je treba poudariti, da naj bi vendar večji prispevek pripisali procesom, ki sledijo iz dolgotrajnega obsevanja (24 h) in brez izjem vključujejo tudi poškodbe DNK. Naša uporabljena valovna dolžina 360 nm ima ravno še dovolj energije (3.44 eV), da povzroča pirimidinske dimere (Freeman in sod., 1989), najpogostejšo UV poškodbo DNK. Za popravilo pirimidinskih dimerov ima sicer evkariontska celica na volje popravljalne mehanizme (najpogosteje popravilo z nukleotidnim izrezom), vendar so lahko le-ti okvarjeni zaradi drugih nespecifičnih UV DNK poškodb. Znano je tudi patološko stanje Xeroderma pigmentosum, autosomska recesivna bolezen, kjer je popravljalni mehanizem nukleotidnega izreza okvarjen, kar rezultira v hiperobčutljivost kože na UV svetlobo in že najmanjša izpostavitve rezultira v poškodbe kože in maligne tvorbe (Sarasin, 1999). Poleg popravljalnih mehanizmov ima veliko vlogo pri onkološki obrambi in samemu preživetju celice predvsem tumor supresorski protein p53. Točkovne mutacije v tem proteinu s strani UV sevanja se pokažejo kot pomemben razlog malignih sprememb v celicah (de Gruijl in sod., 2001). MCF-7 celična linija je ena redkih malignih celičnih linij, ki ima nemutiran p53 tumor supresor gen divjega tipa (WT), ki kodira delujoč p53 tumor supresor protein, ki v primeru potencialnih malignih in oksidativnih poškodb DNK sproži apoptozo in tako zavre nadaljno potencialno rast tumorja v tkivih. Zato je preživetje celičnih linij z divjim tipom gena p53, vključno z MCF-7 celicami, ponavadi precej nižje ko gre za genotoksične vplive okolja, predvsem UVA svetlobo, za katero je znano, da lahko celo stabilizira drugače precej nestabilen p53 tumor supresor protein in tako ojača apoptotski odgovor (Bender in sod., 1997). Poleg prej omenjenega deleža apoptotskih celic, ki preidejo v apoptozo preko p53 inicirane kaskade, verjetno k padcu viabilnosti obsevane kontrole prispevajo tudi celice, ki preidejo v apoptozo zaradi direktnega eksogenega vpliva UV, ki povzroči dimerizacijo membranskih, z apoptozo povezanih površinskih faktorjev, ki naprej signalizirajo apoptozo. Vzrok dimerizacije ni povsem znan, verjetno pa je posledica

konformacijske spremembe membranskih proteinov ali samih lipidnih molekul zaradi absorpcije UV sevanja.

Fototoksičnosti pri koncentraciji nanomateriala nad 5 µg/ml ni. Rahlo porast viabilnosti za 7 do 8 %, glede na viabilnost v odsotnosti nanomateriala bi lahko razložili z zaščitnim vplivom nanomateriala na celice, ki spominja na vpliv TiO<sub>2</sub> delcev v modernih sončnih kremah (Smijš in Pavel, 2011). Bolj verjetno pa gre za pojav hormeze, kjer nizka koncentracija agensa deluje stimulatивно na rast, višja pa inhibitorno (Iavicoli in sod., 2010). Sam odziv v tem primeru ni posledica specifičnega odziva na agens, temveč specifičen odziv organizma oziroma celice. Bil naj bi univerzalen vsem organizmom, vendar ga ne opazimo pri vseh stresorjih, zato je na mestu ocenjevanje vpliva vsake kemikalje posebej. Za nanodelce naj bi bil fenomen potrjen (Nascarella in Calabrese, 2012). V osnovi gre za evolucijsko adaptacijo, kjer organizmi prekomerno kompenzirajo škodo povzročeno s strani določenega stresorja s pospešenim metabolizmom in proliferacijo (Stebbing, 1987). Rezultat je stimulacija rasti in navidezno pozitiven učinek na metabolizem celic, ki mu sledi padec v vitalnosti pri višjih koncentracijah. Dobljen koncentracijski odziv ima ponavadi obliko obrnjene črke U, ki jo opazimo tudi pri našem MTS testu. Vprašanje, ki ostaja neodgovorjeno, pa je, zakaj hormezo opazimo samo pri kombinaciji obeh stresorjev, ne pa tudi pri vsakem posebej.

Pri nadaljnjem zviševanju koncentracije (50 in 100 µg/ml) so nanodelci toksični za celice MCF-7. Viabilnost pade na 75 % (50 µg/ml) in 68 % (100 µg/ml). Zgubi pa se učinek sevanja, saj je razlika med obsevanim in neobsevanim materialom majhna ali celo nesignifikantna, kar pripisemo zaščitnemu učinku materiala, ki s sipanjem in absorpcijo ščiti celice pred škodljivimi učinki sevanja. Glede na dejstvo, da nanomaterial rad agregira in da agregati še uspešneje zaščitijo celice pred UV, predvidevamo, da agregacija igra pomembno vpliva na strupenost pri večjih koncentracijah materiala.

Pri največjih koncentracijah 500 in 1000 µg/ml, ki sicer že presegata običajne koncentracijske razpone pri toksikoloških testiranjih, opazimo izravnavo preživetvene krivulje, ko toksični vpliv doseže nasičenje, presenetljivo pa tudi izredno ojačan zaščitni učinek obsevanega nanomateriala, kjer izmerjena viabilnost lahko celo preseže tisto

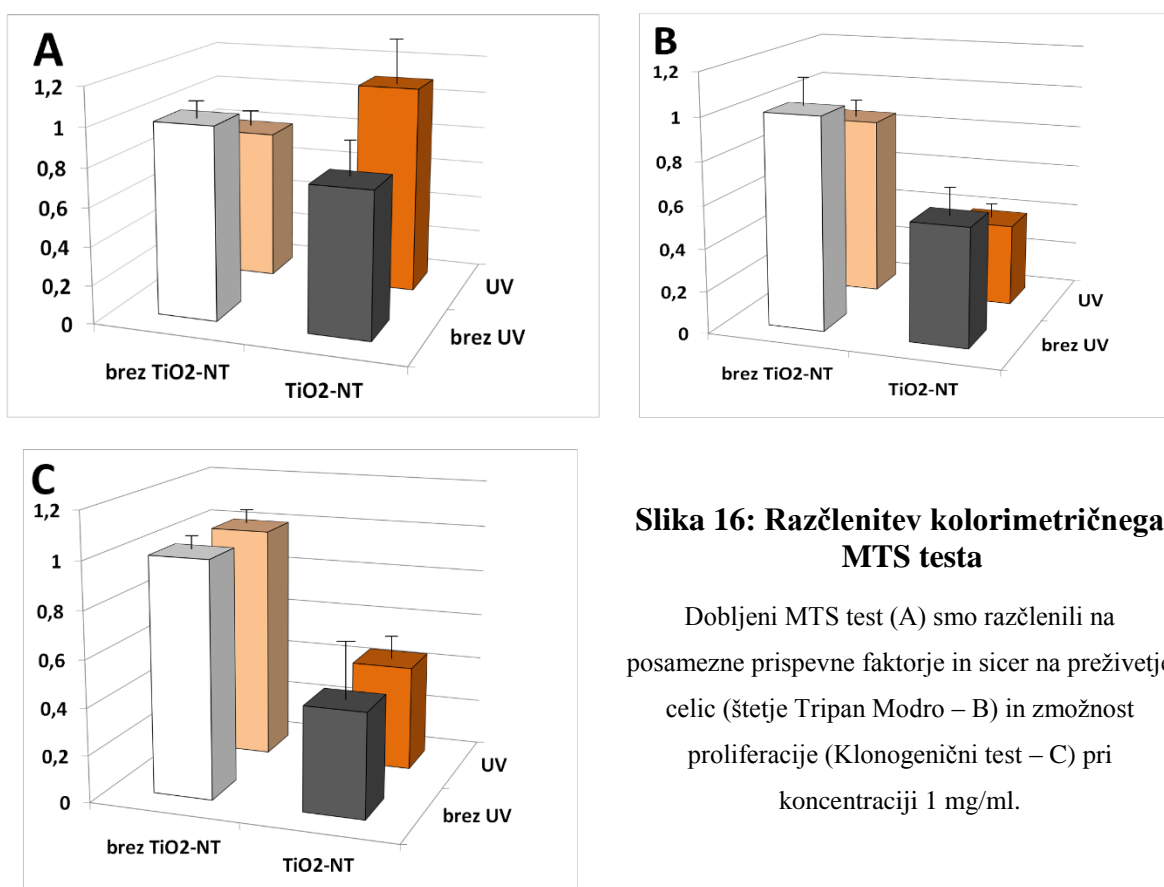
neobsevane kontrolne skupine. Ker smo z meritvami ovrgli morebitno prisotnost *Mycoplasme* in drugih bakterij in naredili dovolj ponovitev, se zdi še najverjetneje, da je prišlo do neželjene interakcije med reagentom in materialom (pri MTS testu), ki je vodila do anorganske pretvorbe tetrazolijevega reagenta v končni produkt – formazan in pospeševala pretvorbo, ki naj bi bila specifična za žive sisteme. Končna vrednost je tako produkt obeh, žal neločljivih poti nastanka formazana. Ker je znanih kar precej omejitvev uporabe testov na tetrazolijevi osnovi (Huang in sod., 2004; Kroll in sod., 2012; McGowan in sod., 2011; P. Wang in sod., 2010), smo poleg testnih skupin s celicami vodili tudi kontrolne skupine, ki so bile deležne povsem enake obravnave kot testne skupine, vključno s končnim dodatkom MTS testa in zajemanja podatkov. Interference smo res zaznali in potrdili, da lahko TiO<sub>2</sub> nanodelci pretvarjajo tetrazolijevo sol v formazan, kot tudi emitirajo njegovo delovanje, saj absorbirajo delež svetlobe tudi brez dodatka tetrazola. Vsi opaženi vplivi TiO<sub>2</sub> pa so bili na koncu odšteti testiranim vrednostim, ki so jih naredile celice. Tako smo zagotovili, da res opazujemo le odziv celic na material in ne morebitne interakcije le-tega s testom preživetja. Ob izključitvi vseh interakcijskih dejavnikov materiala lahko torej zaključimo, da največji obsevani koncentraciji nimata nobenega toksičnega vpliva na preživetje celic ali pa sicer vplivata na preživetje, a tako, da celice, ki preživijo, posedujejo nenavadno visoko stopnjo metabolne aktivnosti.

Ker prva možnost, upoštevajoč strupenost pri precej manjših koncentracijah, ni najbolj verjetna, je torej bolj verjetno, da je strupenost vsaj enaka, če ne večja, kot pri nižjih koncentracijah, a so tiste celice, ki jim uspe preživeti, sposobne proizvesti enako neto metabolno produkcijo kot kontrolna populacija. Na tem mestu je vredno opozoriti na poročila, da MTS test lahko kaže preveliko viabilnost glede na kontrolni ATP test, ki bi moral kazati podobne rezultate, za razne protitumorske učinkovine (P. Wang in sod., 2010). Huang in sod. (Huang in sod., 2004) poročajo o 90 % višji viabilnosti pridobljeni z tetrazolijevimi testi v primerjavi z ATP testi, ki merijo direktno fosforizacijo adenzina. Pri tem so lahko končne meritve formazana odvisne tudi od uporabe serumskih proteinov v gojilnem mediju, kot tudi od vrste medija in prisotnosti maščobnih kislin. Nepravilna izvedba kontrolnih meritev, ki ne upošteva dodatka serumskih proteinov v testnem mediju, lahko spregleda celo podvojitev števila celic (Huang in sod., 2004).

Zaradi naštetih pomankljivosti se zdi nujno, da za popolno razumevanje dobljenih rezultatov razčlenimo MTS na vse faktorje, ki prispevajo k končnemu produktu. Glede na to, da MTS test uradno meri »število živih celic v proliferacijskih in citotoksičnih testih...preko aktivnosti dehidrogenaznih encimov v metabolno aktivnih celicah« (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega – navodila za uporabo), je končni produkt zmnožek števila celic (viabilnosti) in njihove metabolne aktivnosti (~proliferacijske kapacitete). Ker sam test ne zmore ločiti med tema dvema prispevkoma, jih je potreba izmeriti direktno.

#### 4.2 MTS TEST – RAZČLENITEV

Da bi razumeli nenavadno visoko preživetje celic, tretiranih z visokimi koncentracijami fotovzbujenega TiO<sub>2</sub> nanomateriala, smo najprej viabilnost direktnega izmerili s štejetjem celic s pomočjo barvila tripan modro.



**Slika 16: Razčlenitev kolorimetričnega MTS testa**

Dobljeni MTS test (A) smo razčlenili na posamezne prispevne faktorje in sicer na preživetje celic (štetje Tripin Modro – B) in zmožnost proliferacije (Klonogenični test – C) pri koncentraciji 1 mg/ml.

Rezultati testa s štejetjem celic kažejo, da je material še bolj toksičen kot kaže MTS test, saj preživetje pade za skoraj polovico (na 55 %), medtem ko pri enaki koncentraciji in enakih pogojih MTS test pokaže padec za samo 25 % (na 75 %). Še bolj dramatična pa je razlika pri obsevanem materialu, kjer preživetje pade na 38 %, čeprav MTS test kaže viabilnost 110 % kontrolne vrednosti. Samo pri obsevani kontroli sta vrednosti obeh testov podobni (84 % oz. 78 % pri MTS testu). Ker pri barvanju s tripan modrim in štejetjem celic, tak test ne interferira z drugimi lastnostmi celic, mu lahko bolj zaupamo. Material je torej dvakrat bolj toksičen od obsevanja samega, medsebojnem ojačanja obeh vplivov oziroma fototoksičnosti materiala pa ne moremo potrditi.

Zmožnost proliferacije pa smo dovolj zanesljivo izmerili s klonogeničnim testom, ki pokaže skoraj identične vrednosti za obe vrsti kontrol brez nanomateriala (obsevano in neobsevano) ter za obe konfiguraciji z nanomaterialom (obsevano in neobsevano). Kontrolni obdržita popolno zmožnost proliferacije, celice tretirane z nanomaterialom pa ne glede na dodatno obsevanje izgubijo več kot polovico (55 %) zmožnosti delitve. Zato zaključimo, da samo obsevanje nima vpliva na zmožnost delitve in proliferacije celic. Glede na rezultate testa viabilnosti bi lahko še ugotovili, da UV verjetno le zavre delitev celic, kar prispeva k manjšemu seštevku pri štejetju viabilnosti, nima pa vpliva na zmožnost delitve in rasti ob odstranitvi stresorja, saj si celice povsem opomorejo in dosežejo neobsevano kontrolo. UV tako v nasprotju s prejšnjimi predvidevanji in zaključki na našo celično linijo ne vpliva akutno, prav tako nima nikakršnega dolgoročnega genotoksičnega vpliva.

Na drugi strani pa lahko material zavira delitev v več kot polovici celic in ga kot takega lahko opredelimo kot izjemno genotoksičnega, kar se sklada tudi z najnovejšimi objavami (Tavares in sod., 2014). Še vedno pa ostaja neznanka mehanizem strupenosti oziroma genotoksičnosti.

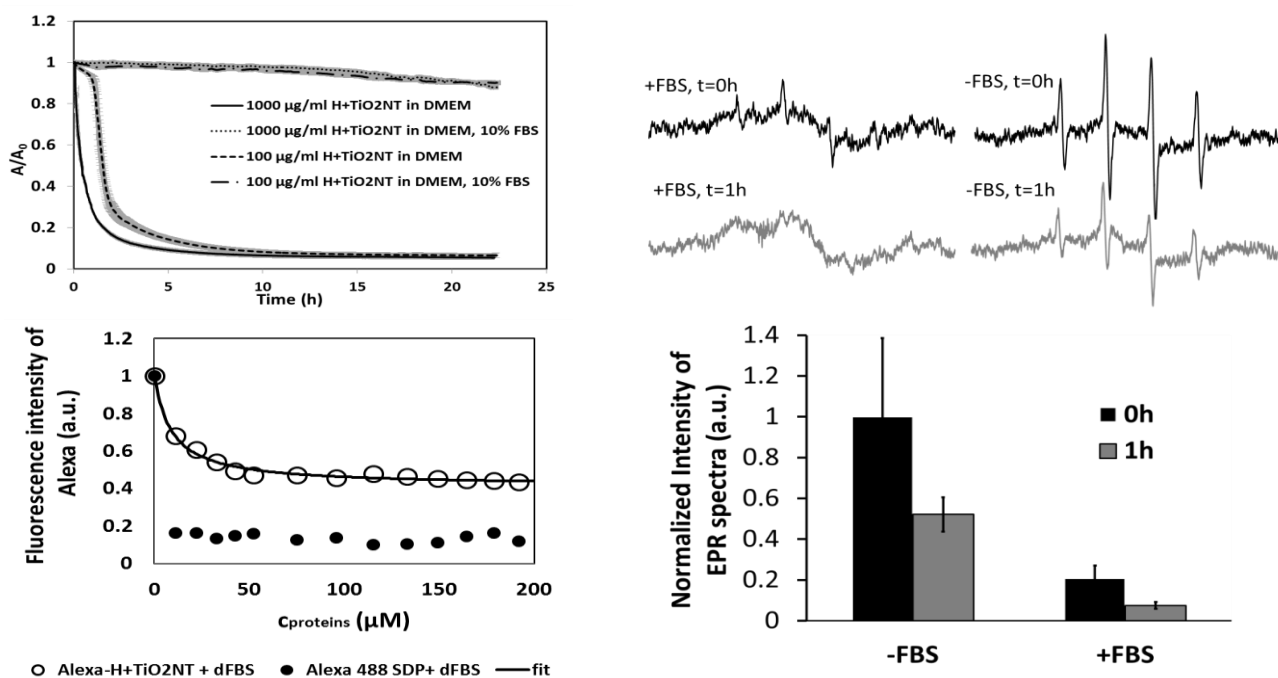
Ker pa smo med meritvami vpliva materiala pri najvišjih koncentracijah tekom 3 dnevnega tretiranja kljub prisotnosti serumskih proteinov, opazili posedanje materiala, ki povsem prekrije spodaj ležeče celice, smo želeli preveriti, ali ni mehanizem strupenosti morda povezan z ovirano difuzijo nutrientov zaradi prevleke posedanega nanomateriala.

#### 4.3 PROTEINSKA KORONA IN NJEN VPLIV NA POSEDANJE IN AKTIVNOST DELCEV

Zaradi posedanja nanodelcev smo najprej preverili njihovo stabilnost v fizioloških pogojih. UV-VIS spektroskopija (slika 3a) razkrije, da na posedanje oziroma agregacijo vpliva prisotnost oziroma odsotnost govejih serumskih proteinov, ki sicer v mediju služijo kot glavni vir amino kislin in dušika. Obe testirani koncentraciji (100 in 1000 µg/ml) kažeta izjemno stabilnost tekom enega dneva v prisotnosti popolnega celičnega medija, s samo 10 % sedimentacijo. Na drugi strani se nanomaterial v odsotnosti serumskih proteinov izjemno hitro poseda, kar zaznamo s povečanjem prepuščene svetlobe za 50% v prvi uri pri višji koncentraciji (1000 µg/ml) oziroma po dveh urah pri nižji koncentraciji (100 µg/ml) delcev. Po petnajstih urah, ko je poseđenih že 95 % materiala pri obeh koncentracijah, se nadaljnje posedanje ustavi.

Ker so suspenzije nanodelcev zelo slabo stabilne, jih po navadi stabiliziramo z organskimi ali anorganskimi stabilizatorji oziroma z uravnavanjem pH-ja, s čimer spreminjamo površinski naboj delcev. Naši delci so bili pred vsako uporabo dobro dispergirani (sonikacija) in stabilizirani v 10 % KOH raztopini pri bazičnem pH-ju 11, ki je preprečil posedanje in agregacijo. Pri prenosu delcev v fiziološki celični medij, se najprej zmanjša pH, zaradi česar se delcem najprej zmanjša naboj, hkrati pa se delci oblečejo z različnimi molekulami iz celičnega medija, od proteinov, maščobnih kislin in vitaminov, ter anorganskih dodatkov v obliki mnogih ionov, soli in fosfatov, ki lahko spet spremenijo površinski naboj in vplivajo na stabilizacijo elektrostatsko ali preprosto sterično. Ker je v mediju najbolj koncentriran goveji serumski albumin, se zdi, da njegov naboj v plašču okrog delcev učinkovito stabilizira TiO<sub>2</sub> delce za vsaj 24 ur.





**Slika 17: Interakcija in vpliv serumskih proteinov na nanomaterial**

(A) Posedanje nanomateriala izmerjeno z UV-Vis absorpcijsko spektroskopijo, pri dveh koncentracijah nanodelcev, ob in brez prisotnosti serumskih proteinov. (B) Padanje intenzitete fluorescence fluorofora Alexa 488 (vezanega na nanomaterial) ob titriranju z serumskimi proteini. (C) Profili EPR spektra ob in brez prisotnosti serumskih proteinov (1) in intenziteta njihovega EPR signala (2).

Proteinski plašč ali korona, ki obdaja nanomaterial, mu daje identiteto in konec koncev odloča o njegovi biološki usodi (Lundqvist in sod., 2011), je v našem primeru v veliki večini sestavljena iz govejega serumskega albumina, ki sestavlja od 95-98 % fetusnega govejega seruma, preostali odstotek seruma pa zavzemata gama-globulin in apo-transferin (direktni posredovani podatki proizvajalca). Skupaj vplivajo na dispergiranost in stabilnost nanocevk (Ji in sod., 2010). Kljub znanim vplivom korone, pa npr. citrat agregira že stabilizirane železo-oksidsne nanodelce (Safi in sod., 2011), po drugi strani pa delci prevlečeni z karboksiliranimi polimeri ostanejo stabilizirani brez pomoči serumskih proteinov, ki očitno s plaščem delcev ne reagirajo.

Da bi preverili oplaščenje nanocevk z albuminom smo opazovali dušenje fluorescence pri fluorescenčno označenih nanodelcih. Cevke smo označili s fluoroforjem Alexa488, ki je bil na nanodelec vezan prek linkerja APMS, in opazovali fluorescenčne spremembe ob približevanju serumskih proteinov v sistem. Padanje signala fluorescence s povečevanjem koncentracije proteinov se izravna že okoli 25  $\mu\text{M}$  koncentraciji proteinov (slika 3B), ko je zadušene 40 % fluorescence Alexe. Pri 200  $\mu\text{M}$  koncentraciji proteinov znaša fluorescenca le še 45 % prvotne. Na drugi strani pa je prosta Alexa povsem zadušena že pri najnižji koncentraciji proteinov (10  $\mu\text{M}$ ).

K gašenju fluorescence vezane Alexe najbolj prispevajo aminokislina kot so Triptofan (Trp), Tirozin (Tyr), Histidin (His) ter Metionin (Met), kjer Trp in Tyr močno, His in Met pa šibko gasita fluorescenco (H. Chen in sod., 2010). Trp lahko gasi fluorescenco dinamično preko molekularnih trkov kot tudi statično, ko se morata skladati relativni orientaciji aromatskih obročev obeh molekul in pride do interakcije med obema molekularnima orbitalama preko fotoinduciranega elektronskega transfera (PET), kjer foto-eksitiran donor preda eksitiran elektron akceptorju, če se nahaja znotraj Van der Waalsovega radija. Možen je še način gašenja z vezavo na fluorofor, ki ustvari nefluorescenten kompleks. Ker se pri Tyr izključuje vezavo z Alexo, gašenja verjetno poteka preko trkov in PET-a zaradi OH skupine na para mestu fenolnega obroča (tirozinu podobna aminokislina fenilalanin (Phe) namreč ne povzroča gašenja) ,Met gasi fluorescenco prek trkov, His pa s kombinacijo PET in vezave v neaktivni kompleks preko imidazolne skupine. Ker je torej gašenje fluorescence s strani albumina kompleksno in v prvi vrsti odvisno od izpostavljenih aminokislin, ki lahko pridejo v stik oz. bližino fluoroforja oz. nanomateriala, je opazovan padec fluorescence vsota prispevkov vseh izpostavljenih stranskih skupin na površini in aktivnih mestih proteinov, ki so sposobne vsaj enega od omenjenih načinov gašenja fluorescence.

Ker se koncentracija proteinov v celičnem mediju ob običajnem dodajanju 10 % FBS-ja giblje okoli 20  $\mu\text{M}$ , je večina površine nanocevke v celičnem mediju ali prekrita ali vsaj v bližnji interakciji s proteini, kar lahko sklepamo tako iz gašenja fluorescence kot iz spektrometričnih analiz stabilnosti TiO<sub>2</sub> nanomaterialov pri uporabljeni koncentraciji nanocevk (1000 mg/ml). Še več, površina materialov nase »veže« večino oz. praktično vse

razpoložljive proteine v mediju, zato se poraja vprašanje, ali so le-ti proteini na voljo celicam za normalno rast.

Preden odgovorimo na zgornje vprašanje, pa se opredelimo tudi do tega ali plašč proteinov vpliva na aktivnost nanodelcev. Kot omenjeno na začetku, je bil TiO<sub>2</sub> izbran zaradi dokazanih fotokatalitičnih lastnosti in pričakovanega fototoksičnega učinka na celice, ki pa se je do sedaj izmikal potrditvi. Zato smo materiala tokrat ovrednotili v skoraj fizioloških pogojih. Z elektronsko paramagnetno resonanco (EPR) smo na preverjeno fotoaktivnih delcih, dispergiranih v celičnem mediju z in brez dodatka fetusnega govejega seruma, izmerili prisotnosti ROS. Rezultati (slika 3C) kažejo da proteinski plašč zmanjša zaznavo ROS preko spinskih lovilcev, ki so v raztopini in lovijo ROS po celotnem volumnu. Intenziteta EPR spektrov, ki je proporcionalna koncentraciji spinskih aduktov, ta pa ulovljenim ROS, pri takojšnjih meritvah pade na 22 % intenzitete vzorca brez serumskih proteinov, pri meritvah po eni uri, v kateri lahko pride do sedimentacije, pa še dodatno občutno pade. Ker je izvor radikalov kvečjemu na delcih, spinske pasti pa so vsepovsod, se zmanjšanje števila ulovljenih radikalov lahko razloži le tako, da plazemski proteini prestrezajo generirane radikale (Soriani in sod., 1994). Če bi proteini prestrezali radikale po celotnem volumnu, bi bil zaradi anihilacije radikalov učinek na število aduktov minimalen, kar pa je v nasprotju z opaženim. Zato sklepamo, da morajo biti proteini zelo blizu površine nanodelcev, kjer učinkovito prestrezajo radikale in zmanjšajo njihov učinek.

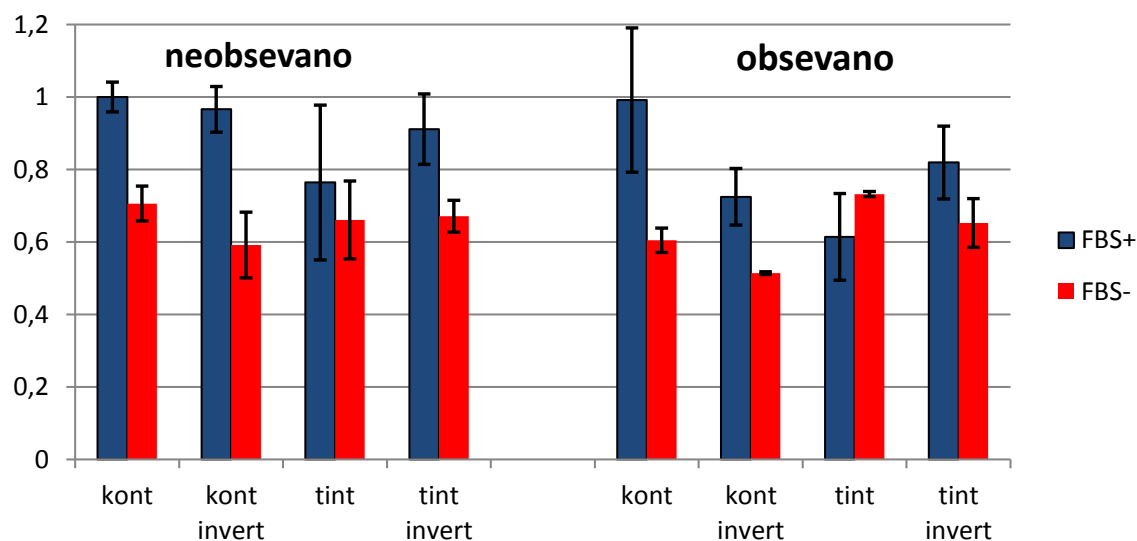
Ta zaključek ne pomeni, da po nastanku korone delci niso več citotoksični. Internalizacija in s tem povezane celične poškodbe so še vedno možne, vendar je korona tista, ki odloča o nadaljni biološki usodi. Preprečitev produkcije radikalov in bio-funkcionalizacija reaktivne površine nanodelcev pa zagotovo zmanjša njihov toksičen potencial (Ge in sod., 2011). Ni treba posebej poudariti, da smo naravnim nanodelcem živa bitja izpostavljeni že od obstoja Zemlje preko vulkanskih izbruhov, gozdnih požarov, peščenih neviht, erozije, ipd. V takih naravnih pojavih se producirajo ogromne količine nanodelcev, katerim se biološke vrste niso mogle izogniti. Kljub današnjemu prekomernemu onasneževanju s fosilnimi gorivi, ki še dodatno prispevajo nanodelce v ozračje, je še vedno več kot 90 % aerosolnih nanodelcev naravnega izvora (Buzea in sod., 2007). Zato je iz evolucijskega stališča obstoj

mehanizma, ki nevtralizira potencialno škodljive, vsepovsod prisotne delce, zagotovo pomemben.

#### 4.4. VPLIV SEDIMENTACIJE

Po določitvi vpliva serumskih proteinov na stabilnost in aktivnost nanocevk je pod vprašanjem še vedno ostal mehanizem strupenosti. Rezultati MTS testa, ki niso kazali na signifikantno strupenost materiala, so bili zaradi verjetne interference med delci in testnimi kemikalijami neprepičljivi, medtem ko sta bolj zanesljiva testa, štetje celic pod mikroskopom in klonogenični test, pokazala padec preživetja za skoraj polovico. Tudi vprašanje sedimentacije delcev v celičnem mediju je še ostalo neodgovorjeno.

Sedimentacija nanoprahov je dobro znana in večkrat opisana (Liu in sod., 2011), vendar v *in vitro* celičnih eksperimentih kot po pravilu spregledana ali zanemarjena. Razlog za to verjetno tiči v njeni slabi kontroli in v zakoreninjenih toksikoloških protokolih, ki nanodelce navadno obravnavajo kot vse druge kemikalije, brez upoštevanja njihovih fizikalnih lastnosti. Nanodelci namreč niso molekule in njihova koncentracija ni povsod enaka. Zaradi agregacije in sedimentacije je dejanska oz. efektivna koncentracija v neposrednem okolju celic, ki rastejo na dnu bazenčkov, večja od tiste pri gladini bazenčka (Cho in sod., 2011), še najbolj pa je odvisna od stabilnosti materiala in hitrosti posedanja. Zato ta dva parametra neposredno vplivata na stopnjo internalizacije materiala in njegovo potencialno toksičnost, koncentracija pa je slabo definirana količina.



**Slika 18: Resazurinski test**

Pokaže vpliv sedimentacije na viabilnost celic.

Ob ugotovitvi posedanja smo zato v izogib klasičnim napakam toksikoloških študij nanoprahov, postavili t.i. obrnjeno konfiguracijo *in vitro* testiranja strupenosti, kjer smo celice gojili na nosilcih, ki smo jih ob dodatku nanodelcev obrnili in vpeli tik pod gladino. S tem smo se izognili vsem nepredvidljivim vplivom sedimentacije, ter tako zagotovili, da so celice v interakciji samo s povsem suspendiranimi in stabiliziranimi delci oz. da je difuzija delcev edini mehanizem, ki jih pripelje do celične interakcijske cone (kot to velja tudi pri testiranjih vseh drugih agensov in kemikalij).

Z drugačno postavitvijo obrnjenega eksperimenta, za katero prej ni obstajal noben protokol oz. za ta namen ustvarjena steklovina ali laboratorijska plastika, smo se izognili zamudnemu in tehnično zahtevnemu eksperimentu (Cho in sod., 2011). Naš namen je bil ustvariti ekonomsko ugodno konfiguracijo iz predmetov, ki so običajno na voljo v vsakem celičnem laboratoriju. Z optimizacijo ponovljivosti in stabilnosti vpetja nosilcev (slika 4 A1,2) in številu podpornih kroglic, ki ne smejo s trenjem poškodovati proliferajoče populacije celic (slika 4 B1,2), ki bi sicer kazala le 60% viabilnost (slika 4 B3), smo razvili konfiguracijo, ki je vključevala ob steni stabilizirane kroglice, namenjene opori celičnemu nosilcu (slika 4 C1).

Zaradi slabih izkušenj z MTS testom smo tokrat raje uporabili drug kolorimetrični test, Resazurin, ki za razliko od MTS-a bazira na fluorescenci in ne absorbanci (Page in sod., 1993). Rasazurin je aktivna komponenta znanega komercialnega testa Alamar Blue. Testirali smo vpliv nanodelcev, UV svetlobe, odsotnosti serumskih proteinov in vpliv konfiguracije (klasična prosti obrnjeni) in največjo razliko v viabilnosti izmerili med setoma z (FBS+) in brez (FBS-) serumskih proteinov (SLIKA5-C2). Ker so le-ti glavni vir dušika v gojišču, brez katerega je anabolna sposobnost celic izjemno omejena, je 30 % padec preživetja med FBS+ in FBS- kontrolo tako zagotovo posledica depravacije celic serumskih proteinov, ki so nujni nutrient v celičnem gojišču za našo celično linijo. Nadaljnje tretiranje celic, ki so bile prikrajšanje za serumske proteine, z UV svetlobo in nanodelci ni povzročila nadaljnega padca viabilnosti, ki bi ga pričakovali glede na klonogenični test in štetje celic (SLIKA3-B,C). Nanodelci namreč v tem primeru niso bili oblečeni s proteinsko korono, zaradi česar bi morali neposredno interagirati z membrano. Zaradi posedanja bi morale biti celice popolnoma zasute z materialom, kar bi ustavilo difuzijo ostalih prisotnih nutrientov v mediju in tako še dodatno zmanjšalo celično sposobnost njihovega privzema, na drugi strani pa povečalo efektivno koncentracijo delcev okoli celic, kar bi verjetno vodilo v večjo internalizacijo. In zadnjič, odsotnost seruma in s tem vira dušika bi morala močno vplivati na celično sposobnost odziva na nanomaterial, točneje na sposobnost izločanja materiala, tvorjenja antioksidantov in popravljanja celičnih organelov. Ti rezultati so zato presenetljivi, še posebej zato, ker smo s prej omenjenima testoma štetja in klonogeničnosti pokazali, da sam material zagotovo zmanjša preživetje za vsaj polovico.

Poleg neprepričljivega vpliva materiala in UV-ja, je tudi vpliv konfiguracije nesignifikanten. Obrnjena konfiguracija sicer kaže rahlo večje preživetje, vendar je razlika znotraj statistične napake. Zato smo sumili, da tudi resazurinski test trpi za analognimi pomankljivostmi kot test MTS. V primerjavi tetrazolnih preživetvenih testov z resazurinom sicer ugotavljajo njihovo večjo občutljivost, vendar spojine, ki vplivajo inducirajoče na mitohondrijske mehanizme in povečujejo metabolizem, dajejo napačno pozitivne rezultate (Hamid in sod., 2004). To bi lahko sklepali tudi iz sploh prve uporabe resazurina iz 40-ih let prejšnjega stoletja, ko so prvič začeli uporabljati resazurin kot indikator okužb mleka (Erb in Ehlers, 1950), kjer je zaznaval spremembe redox potenciala

zaradi bakterijske redukcije. Kot pri MTS testu je tudi pri resazurinskem testu še veliko neznank glede mehanizma in kraja redukcije. Največji delež redukcije spet verjetno prispeva NADH:ubikvinon oksidoreduktaza oz. prvi kompleks dihalne verige. Verjetno pa redukcija ni direktna, temveč poteka posredno preko že reduciranih molekul. Prav tako ni konsenza niti o tem ali resazurin sploh prehaja v celice.

Nerazložljive vrednosti bi bile lahko tudi posledica prehitre redukcije samega testa. Kot že opisano, test temelji na NADH odvisni redukciji nefluorescenčnega resazurina v fluorescenčni resorufin. Vendar obenem poteka tudi redukcija fluorescenčnega resorufina v zopet nefluorescenčni hidroresorufin (O'Brien in sod., 2000). Ob neugodno izbranem časovnem oknu lahko tako dobimo za manj viabilne celice (manjša redukcija) večjo vrednost resorufina kot za bolj aktivne (večja redukcija, več resorufina v hidrirano obliko).

Poleg omenjenih slabosti Tronstad s sod. (Erikstein in sod., 2010) trdi, da celo sam test povzroča poškodbe, ki bi jih sicer moral evalvirati. Omenja oksidativni izbruh reaktivnih kisikovih zvrsti ob vpeljavi resazurina v medij, ki lahko pripelje do respiratorne disfunkcije mitohondrijev, avtofagije mitohondrijev oz. destabilizacije njihove membrane. Vse našteje patologije vodijo v vodeno celično smrt, apoptozo, ki bi jo test moral validirati.

Sam vpliv materiala na redukcijski test ni znan, prav tako so bili vsi kontrolni eksperimenti na to temo negativni. Ker pa resazurinski test ni bil sposoben objektivno validirati vpliva sedimentacije in obrnjene konfiguracije, se je še enkrat izpostavila potreba po stalnem preverjanju komercialnih kolorimetričnih testov preživetja, ki so daleč od idealnega in na račun hitrosti in enostavnosti žrtvujejo velik del specifičnosti in zanesljivosti. Če za njih ne najdemo alternative je vsaj nujno, da jih dopolnjujemo med seboj in z drugimi direktnimi testi, kjer imamo večji in bolj objektivni vpogled v celično delovanje.

#### 4.5 Mehanizem strupenosti – vpliv internalizacije delcev in celični stres

Po neprepričljivih uporabah dveh kolorimetričnih testov viabilnosti, smo se odločili za uporabo svetlobne in fluorescenčne mikroskopije za določitev mehanizma strupenosti

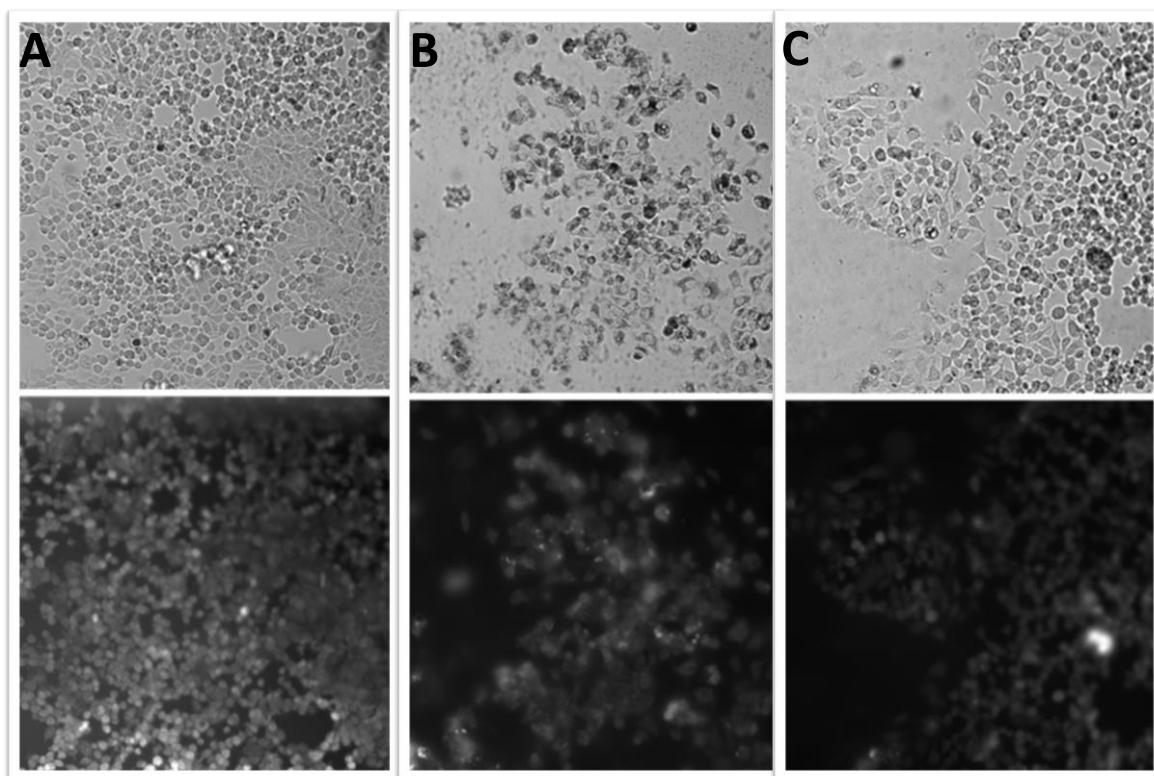
delcev (toksičnost je bila namreč nedvoumno potrjena s štejetjem celic in klonogeničnim testom).

Sam potek testiranja je ostal nespremenjen (klasična + obrnjena konfiguracija), vendar smo po tretiranju vsak nosilec posebej pogledali pod svetlobnim mikroskopom, s čimer smo dobili grobo informacijo o stanju celic (morfologija), njihovem številu (štetje), ter količini internaliziranega materiala preko atenuacije svetlobe. Za evalvacijo metabolnega stanja celic pa smo uporabili DCF test, fluorescenčni test splošnega celičnega stresa. Tudi DCF, kot do sedaj vsak uporabljen komercialni test, ni popoln. Vendar je ob pravilni interpretaciji, ob zavedanju njegovih omejitev, ter ob uporabi fluorescenčne mikroskopije namesto fluorometra lahko precej bolj informativen. Najprej se moramo zavedati, da kljub navedbam v literaturi, DCF ni specifični indikator koncentracije vodikovega peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) niti superoksida (O<sub>2</sub>•) (Jakubowski in Bartosz, 2000). Prav tako ni specifičen indikator drugih reaktivnih kisikovih zvrsti. Redoks homeostaza je ena najbolj pomembnih homeostaz v fiziološki celici in kisikove zvrsti imajo v njej pomembno vlogo signalizacije rasti, metabolizma in celične smrti (Droge, 2002). Ob premiku ravnovesja nastaneta t.i. oksidativni in redukativni stres. Bolj znan je prvi, ki je ponavadi prvi odziv celice na škodljive agense in signalizira višjo metabolno aktivnost ter napor celice, da čimbolj omeji škodo. Ob prevelikih poškodbah sledi nov izbruh prostih radikalov, ki po navadi signalizira začetek apoptoze. Na drugi strani pa poškodbe v mehanizmih ROS oz. ob prevelikem sproščanju ali vnosu antioksidantov (največkrat) vitaminov nastane redukativni stres, kjer so prizadete signalne poti, ki jih navadno upravljajo ROS, in ki prav tako vodi v celične patologije (X. Wang in sod., 2013b). Ob dejstvu, da DCF ni specifičen za noben ROS in da je dobljena fluorescenca prispevek produkcije vseh radikalov, ki pa je spet odvisna od velikosti bazena celičnih antioksidantov (predvsem glutationa in prostih aminokislin), lahko zaključimo, da je edina informacija, ki jo lahko dobimo iz dobljene fluorescence, splošno redoks stanje v celici, katerega povečanje govori o splošnem celičnem odzivu, imenovanem celični stres, čeprav nekateri test uporabljajo celo za štetje celic (Mao in sod., 2012) po principu: več celic, več radikalov, večji signal. Glede na to znano dejstvo, da lahko že sama sprememba temperature oz. nihanje v CO<sub>2</sub> atmosferi povzroča celični stres in tako večji signal ob enakem številu celic, je ta metoda za štetja celic še najmanj primerna.



Poleg prej omenjene nespecifičnosti je problem DCF testa tudi majhna produkcija radikalov, ki naj bi jih meril. Ob prehajanju začetne probe (DCFH-DA) v celico in njeni deacetaciji, ki zagotavlja, da proba ostane v celici, nastane majhna količina vodikovega peroksida (Rota in sod., 1999). Prav tako je bilo z EPR pokazano, da ob sami oksidaciji DCFH v DCF nastaja superoksid, vendar naj bi bile nastale količine le-tega zanemarljive (Myhre in sod., 2003). Potencialni problem predstavlja tudi avtooksidacija. Ob fotoredukciji DCF-ja lahko nastane kratkoživ DCF<sup>•</sup> radikal, ki je ob aerobnih pogojih oksidiran s kisikom, kar vodi v reciklažo začetnega DCF in produkcijo superoksida, ki ga potem DCF zaznava (Bonini in sod., 2006). Zato je potrebna posebna skrb, da je barvilo vedno na temnem mestu, tudi med delom.

Da bi se izognili adsorpciji DCF-ja na nanocevkah smo skrajšali inkubacijo na 15 min na 37°C. Prav tako smo opravili vse kontrole morebitne *ex vivo* oksidacije DCF, vendar so bile vse negativne. Ugotovimo, da ima DCF po vseh preživetvenih testih končno potencial pokazati realno fiziološko stanje celic, brez vplivov nanomateriala na sam test. Ker je naš glavni namen ocenitev strupenosti internaliziranega materiala, primerjamo torej količino internaliziranega materiala, izmerjenega preko padca intenzitete v svetlobnem polju svetlobne mikroskopije, s fluorescenčo intenziteto DCF-ja, ki jo izmerimo z fluorescenčno mikroskopijo.

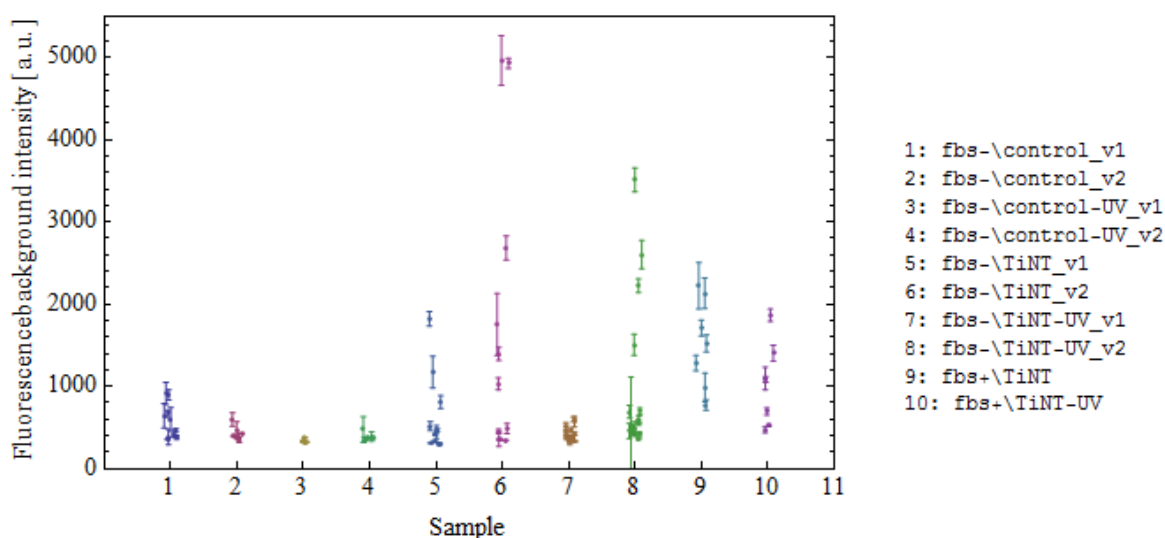


**Slika 19: Vpliv sedimentacije na internalizacijo**

Slika v svetlem polju in pod njo fluorescenčna slika kontrolnih celic (A), celic tretiranih z TiO<sub>2</sub>-NT v klasični konfiguraciji (B) in celic tretiranih z TiO<sub>2</sub> v obrnjeni konfiguraciji (C).

Rezultati kažejo, da dodatek nanomateriala drastično zniža preživetje celic, kar lahko ugotovimo z avtomatskim štetjem. Prav tako lahko opazimo spremenjeno morfologijo. Internalizacija materiala je precejšnja, na nekaterih mestih je težko opredeliti, ali je material internaliziran ali vezan na membrano. Intenziteta fluorescence preživelih celic je premo sorazmerna s količino materiala, kar pomeni, da nanomaterial celicam povzroča stres, ki potem verjetno vodi v celično smrt, apoptozo. Tega sicer ne moremo trditi, prav lahko je, da se preživetje celic drastično zniža že takoj po dodatku materiala, v tem primeru govorimo o nekrozi inducirani s strani nanodelcev. Kaj več o mehanizmu strupenosti ne moremo reči, zagotovo lahko trdimo le, da drastično zmanjša viabilnost celic, ter preživelim povzroča celični stres. Pri vzorcih z nanodelci je bila zanimiva tudi prisotnost relativno visokega fluorescenčnega ozadja, ki ga pri ostalih vzorcih nismo zaznali. Sam od sebe se ponuja odgovor, da je to oksidirano barvilo, ki se je razlilo v medij potem, ko so

celice podlegle oksidativnemu stresu in prešle v apoptozo. Vendar s svetlobno mikroskopijo, ki jo opravimo pred inkubacijo z DCF-jem ugotovimo, da je viabilnost veliko manjša že pred izpostavitvi celic redoks probi. Tako je edini možni vir visokega ozadja v živih celic oksidirana proba, ki prehaja iz celic v medij. To naj bi preprečevala deacetacije z esterazami takoj po prehodu čez membrano v citoplazmo, vendar pa kljub temu deacetilirana in oksidirana proba lahko v manjših koncentracijah prehaja nazaj v medij (Jakubowski in Bartosz, 1997). Koncentracija v mediju naj bi bila v ravnovesju s koncentracijo probe v celicah. Tako razložimo tudi največje uhajanje probe ravno v najbolj stresnih celicah, ki imajo največji signal (čeprav bi bile razlog lahko tudi poškodbe membrane), medtem ko v kontrolnih celicah, kjer je stres in posledično signal zelo majhen, ne zaznamo skoraj nobenega ozadja.

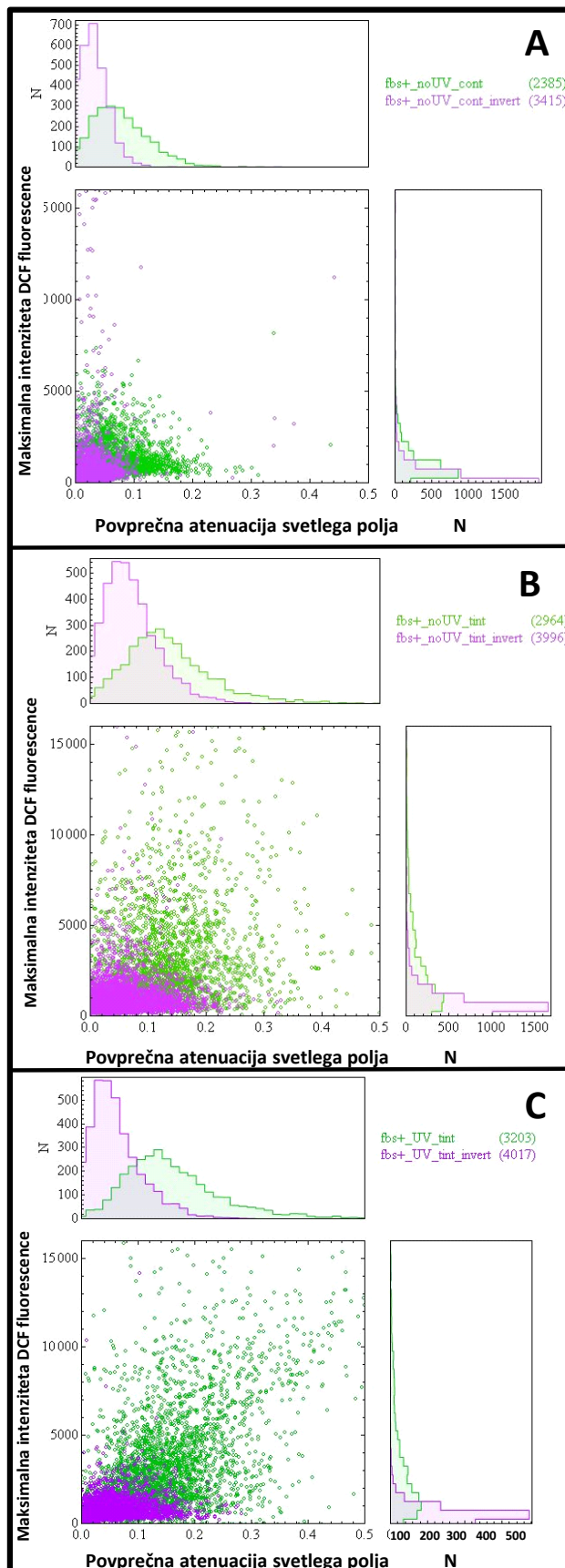


**Slika 20: DCF ozadje**

Fluorescenčno ozadje DCF-ja glede na različne variante eksperimenta.

Tudi z DCF testom vpliva UV svetlobe nismo zmogli zaznati. Fototoksičnosti torej ni, saj sta obsevan in neobsevan material dala zelo podobna rezultata. Tudi količina internaliziranega materiala pri obsevanju je podobna. Glede na literaturo smo pričakovali, da bi UV sevanje lahko celo povečalo internalizacijo. Kot prej že omenjeno, naj bi namrel UV svetloba zavirala proliferacijo tako, da ustavi celični cikel v G2 fazi, pred M fazo delitve, tako da ne pride do podvajanja (Pavey in sod., 2001). Internalizacija nanodelcev je

odvisna tudi od celičnega cikla, še bolj natančno, poveča se ravno med G2/M fazo, v kateri bi morale biti največ obsevanih celic (J. A. Kim in sod., 2012). Pri nas ta fenomen ni bil statistično signifikanten.



**Slika 21: Celični stres-vpliv obrnjene konfiguracije**

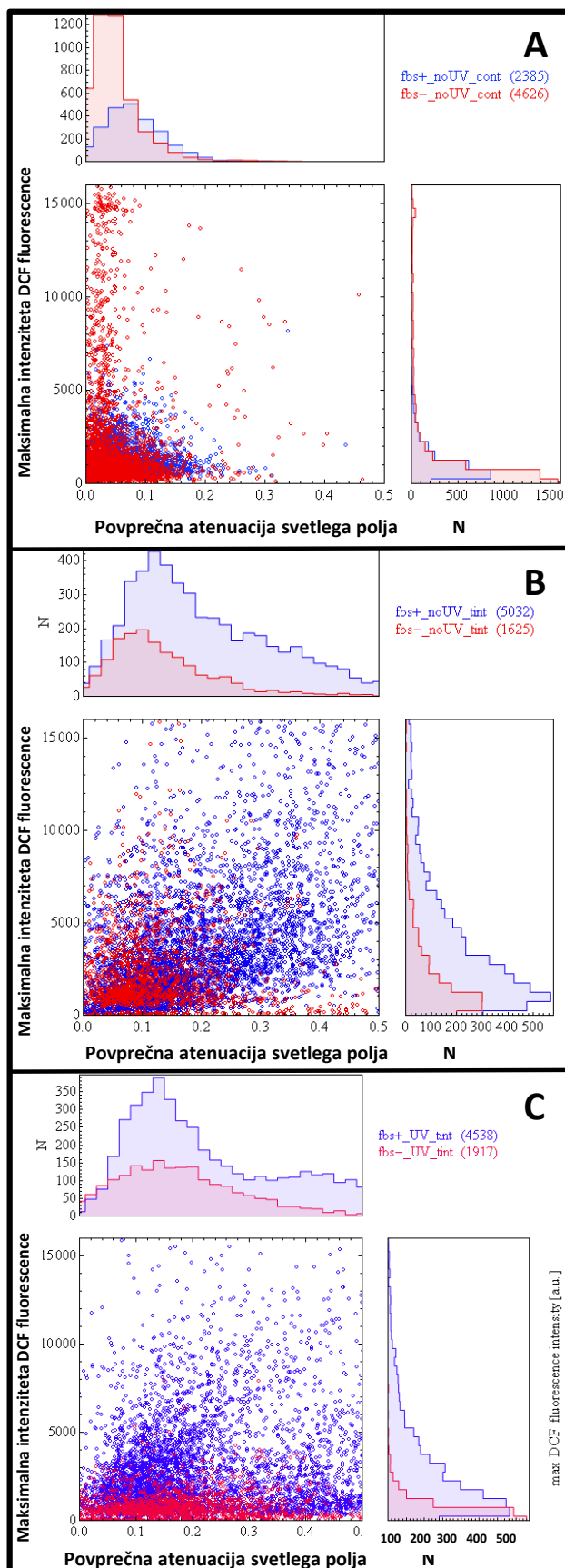
(A) Primerjava kontrolne nasaditve celic v klasični in obrnjeni konfiguraciji.

(B) Primerjava celic tretiranih z nanomaterialom v klasični in obrnjeni konfiguraciji.

(C) Primerjava obsevanih tretiranih celic v klasični in obrnjeni konfiguraciji.

Test z obrnjeno konfiguracijo ponovno izpostavi problem postavitve eksperimenta in upoštevanja vseh fizikalnih dejavnikov, ko gre za testiranje vpliva nanodelcev. Celice tretirane v obrnjeni konfiguraciji so namreč internalizirale izjemno malo materiala in njihovo redoks stanje je povsem primerljivo s kontrolo. Iz vidika te konfiguracije lahko zaključimo, da količina suspendiranega in difundirajočega materiala pri naši koncentraciji ni toksična. V prihodnosti bi bilo vredno preveriti, količino sedimentiranega materiala oz. količino materiala, ki je ostala v mediju in tako točno določiti koncentracijo, ki so jo celice internalizirale in jo določiti za netoksično.

Meritve z DCF so jasno pokazale pomen serumskih proteinov za celično homeostazo. Že netretirana kontrola brez serumskih proteinov v odsotnosti nanodelcev oz. drugih stresorjev kaže velik stres. Pri tretiranju pa se stanje samo še poslabša in poleg najmanjše viabilnosti od vseh konfiguraciji imajo preživele celice tudi najvišji nivo stresa. Vendar stres kontrole in nivo ugotovljene apoptoze/nekroze dajeta slutiti, da je mehanizem delovanje delcev, ki nimajo proteinskega plašča drugačen od tistih s plaščem, kar ima za posledico večjo toksičnost. Količina internaliziranega materiala je zelo podobna ne glede na prisotnost proteinov, čeprav literatura omenja primere (Tedja in sod., 2012), kjer celice s proteini oblečen nanomaterial najprej izločijo, potem pa znova internalizirajo, kar na koncu rezultira v večji procent internalizacije kot v odsotnosti serumskih proteinov. Tudi ta fenomen pri nas ni bil statistično signifikanten. Večji nivo internalizacije naj bi bil tudi posledica receptorsko posredovane endocitoze (prek klatrinskih mešičkov), ki še poveča nivo internalizacije. Ne glede na to pa se avtorji strinjajo, da je strupenost še vedno mnogo višja brez mediacije serumskih proteinov, kar kaže na težji prehod delcev brez plašča, ki pri prehajanju verjetno poškodujejo tudi celično membrano, podobno kot azbestna vlakna (Shi in sod., 2011).



**Slika 22: Celični stres-vpliv serumskih proteinov**

(A) Primerjava kontrolnih nasaditev celic ob in brez prisotnosti serumskih proteinov

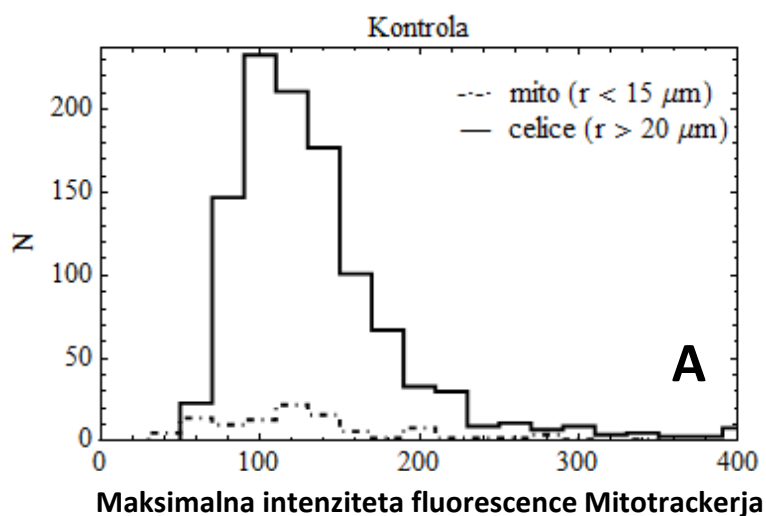
(B) Primerjava tretiranih celic ob in brez prisotnosti serumskih proteinov.

(C) Primerja obsevanih in tretiranih celic ob in brez prisotnosti serumskih proteinov.

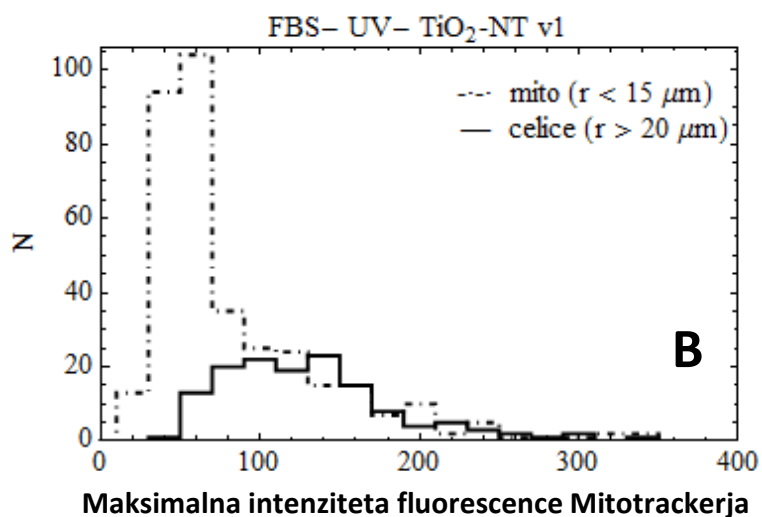
Nepojasnjeni ostanejo samo še kolorimetrični eksperimenti, ki pri najvišjih koncentracijah nanodelcev, pokažejo veliko viabilnost, čeprav se preživetje zmanjša za polovico, produkcija ROS pa ostane v fiziološkem mediju zanemarljiva. Ker vsi preizkušeni testi merijo mitohondrijsko aktivnost, natančneje aktivnost NAD(P)H, in je tudi mikroskopija pokazala signifikantno znižanje števila celic ob nizkem rezultatu resazurinskega testa, ostane le še možnost, da se kljub očitni celični smrti v mediju še aktivni mitohondriji in so ti še vsaj nekaj časa sposobni reducirati kemikalije v kolorimetričnih testih.

Za barvanje potencialno aktivnih mitohondrijev smo uporabili barvilo MitoTracker Orange CMTMRos<sup>®</sup>. Barvali smo kontrolno skupino celic ter celice, pri katerih se je delež pod mikroskopom opazovanega celičnega preživetja najbolj razlikoval od kolorimetričnih testov. To je bil obsevan vzorec tretiran z TiO<sub>2</sub>-NT in depreviran serumskih proteinov. S posebej razvito programsko opremo opredelimo signal Mitotrackerja s področja, večjega od 20 mikronov kot celico z intakten znotraj celičen mitohondrij, signal z manjšega področja pa kot aktivne zunaj celične mitohondrije. Rezultati so bili presenetljivi. Pri kontroli opazimo zanemarljivo število izven celičnih mitohondrijev, medtem ko je pri tretiranem vzorcu (slika 23-B) število zunanjih mitohondrijev vsaj 5-krat večje od celičnih. Res je, da so zunanji mitohondriji posamezni, medtem ko je celični signal sestavljen iz kopice le-teh. Vendar je trend očiten.

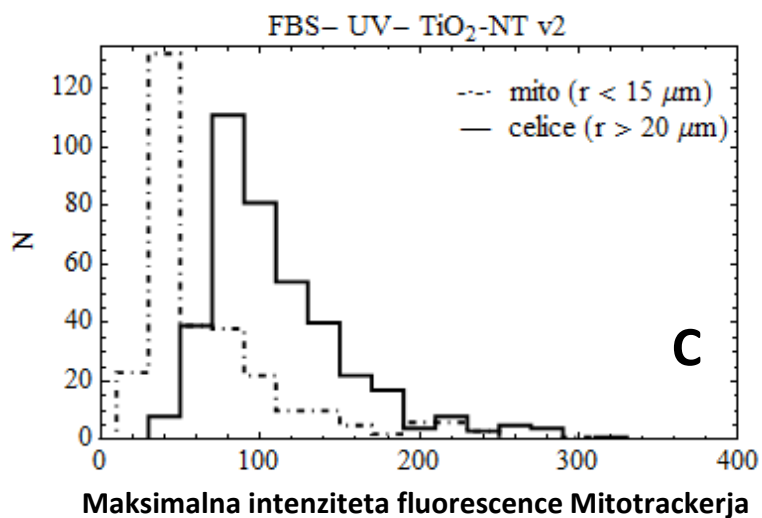




**Slika 23: Izven celični mitohondriji**



Delež izven celičnih mitohondrijev glede na preživele celice za kontrolo, netretirano varianta (A), tretirano in obsevano varianta v odsotnosti FBS (B) ter tretirano in obsevano varianta, ki ji je bil med dodatkom materiala in obsevanjem, dodan FBS (C)..



Da bi potrdili, da gre res za vpliv večje strupenosti delcev ob odsotnosti serumskih proteinov, smo nekaj tretiranim vzorcem dan po tretiranju z delci (tretji dan, tik pred obevanjem) dodali 10 % FBSja (verzija2; v2) (slika23-C). Ob takem vzorcu, ki bi ga lahko obravnavali kot vmesni vzorec med FBS+ in FBS- eksperimentom, smo zaznali preživetje celic, ki je približno za polovico nižje od kontrole (kar smo do sedaj že nekajkrat potrdili), vendar še vedno 5-krat večje od vzorca, kateremu serum ni bil naknadno dodan. Prav tako pa je skoraj dvakrat manjše tudi število zunanjih mitohondrijev (23-B). Ugotovimo, da do 50 % padca viabilnosti pride že takoj ob dodanju materiala (do 24 h po tem) in da tega trenda ni mogoče obrniti s kasnejšim dodatkom FBS. Kar pa ne pomeni, da material po tem ni več škodljiv. Umiranje celic zaradi materiala se verjetno dogaja konstantno, dokler so mu celice izpostavljene, dodatek FBS ta učinek verjetno samo zmanjša oziroma deluje kot celični nutrient, ki poveča odstotek njihovega preživetja.

Verjetnost, da opazovani ekstracelularni mitohondriji pripadajo celicam, ki so odmrle takoj po dodatku TiO<sub>2</sub>-NT, je malo verjetna, ker so mediji, namenjeni izolaciji in hranjenju mitohondrijev znani po visoki koncentraciji saharoze ali manoze, ki skrbi za pravo osmolarnost (Visser in sod., 1995). Poleg tega ima sam TiO<sub>2</sub>, prisoten v zunanem mediju, dokazano negativni učinek na viabilnost mitohondrijev in povzroča njihovo disfunkcijo (Freyre-Fonseca in sod., 2011). Ta je karakterizirana s sproščanjem ROS in padcem mitohondrijskega membranskega potenciala. Mitohondrijska disfunkcija je zato tudi glavni faktor celične in sistemske senescence (Nicholls, 2004).

Mitotracker pobarva samo žive mitohondrije in sicer na podlagi mitohondrijskega membranskega potenciala, ki je ponavadi negativen in se giblje med -40 in -80 mV, medtem, ko je pri mitohondrijih od -140 do -180 mV (Gerencser in sod., 2012). Ker mitotracker vsebuje kationske fluoroforje, je njegova stopnja akumulacije premosorazmerna z membranskim potencialom (Poot in sod., 1996). Mitohondriji v disfunkciji ne morejo več vzdrževati membranskega potenciala in jih zato mitotracker ne obarva. Naši rezultati torej potrjujejo, da so bili vsi mitohondriji, tako zunanji kot notranji, v času barvanja (20 min pred snemanje) še živi in bi kot taki lahko prispevali signal k kolorimetričnim testom, ki bi bil sicer interpretiran kot posledica intaktnih celic.

Na žalost pa iz testa ne moremo sklepati o dolgoživosti mitohondrijev v celičnem mediju. Čeprav se padec intenzitete mitotrackerja rutinsko uporablja kot indikator padca membranskega potenciala, moramo upoštevati, da Mitotracker vsebuje reaktivno klorometilno skupino, ki se z veliko afiniteto kovalentno veže s tiolnimi skupinami (Poot in sod., 1996). Če predpostavimo, da ima notranja mitohondrijska membrana razmerje med proteini in lipidi v membrani 80:20, ugotovimo, da je na membrani več kot dovolj proteinov in peptidov s tiolnimi skupinami, ki lahko vežejo ves mitotracker in tako intenziteta fluorescence pade minimalno.

Izvora zunajceličnih mitohondrijev tako ne moremo povsem pojasniti. Vemo, da je apoptoza sprožena s strani mitohondrijskih ROS je ekstremno kontroliran in dokaj dolg proces. Ena ključnih stopenj v njej je tudi avtomitofagija, kjer celica razgradi mitohondrije. Če bi torej padcu naše populacije celic pripisali apoptozo, ne moremo razložiti živih mitohondrijev. Ostaneta nam dve možnosti in sicer, da so zunanji mitohondriji posledica nenadne nekontrolirane celične smrti (nekroze), ali pa da imajo izvor v še živih, stresom obremenjenih celicah, ki lahko aktivno izvržejo mitohondrije, kateri začnejo kazati znake disfunkcije (Bisharyan in Clark, 2011) in tako preprečijo poškodbe potencialnega ROS izbruha in si podaljšajo preživetje. Glede na to, da opazimo na slikah svetlega polja vzorcev z dodanim materialom mnogo objektov, ki bi bili lahko ostanki celičnih organelov, lahko sklepamo o poteku nekroze s poškodbami membrane, kar bi lahko osvobodilo mitohondrije. Prav tako pa je verjeten scenarij z ekspulzijo mitohondrijev, ker so celice, glede na DCF test še žive, a v velikem stresu, zaradi česar se zdi uporaba mehanizma za odstranitev ROS proizvajajočih mitohondrijev logična.

## 5 SKLEPI

- Delci TiO<sub>2</sub>-NT so citotoksični pri koncentraciji 1 mg/ml, saj zmanjšajo preživetje MCF-7 celic za polovico, spremenijo celično morfologijo s podaljšanjem celičnih izrastkov, se v velikih količinah internalizirajo, ter povzročajo celični stres.
- Delci TiO<sub>2</sub>-NT v fizioloških pogojih niso fototoksični za MCF-7 celice, zaradi interakcije s serumskimi proteini. Po stiku s serumskimi proteini izgubijo tudi zmožnost fotokatalize.
- Obsevanje z UV svetlobo nima vpliva na preživetje MCF-7 celic, temveč samo zavre njihovo rast in tako zniža nivo proliferacije. Ob odstranitvi stresorja je tako celični stanje reverzibilno.
- Serumski proteini stabilizirajo delce TiO<sub>2</sub>-NT v fizioloških pogojih vsaj 24h in tako preprečijo njihovo takojšnjo sedimentacijo. Sama sedimentacija kritično vpliva na količino internaliziranega materiala in s tem na preživetje, ter količino celičnega stresa.
- Gojenje in testiranje celic v obrnjeni konfiguraciji je odličen način za testiranje vpliva nanoprahov in drugih nanodelcev oziroma materialov, ki so nagnjeni k sedimentaciji.
- Opaženi ostanki celičnih organelov namigujejo na hitro, nekontrolirano celično smrt (nekrozo), verjetno prek interakcije delcev z celično membrano
- Viabilni zunaj celični mitohondriji so verjetni krivec artefaktnih rezultatov klorometričnih testov.
- Zanesljiva ocena biokompatibilnosti/toksičnosti nanomateriala se lahko izvede le s kompleksno zastavljenim eksperimentom, ki vključuje več prekrivajočih se metod in upošteva vse intrinzične lastnosti delcev, kot tudi njihove interakcije s prisotnimi biomolekulami.

## 6 POVZETEK

Z neslutnim razmahom nanotehnologije in nanomedicine ter vedno večjo produkcijo novih nanodelcev z novimi, potencialno revolucionarnimi, lastnostmi postaja vprašanje razmerja med pozitivnimi in negativnimi vplivi le-teh, na okolje in človeka, vedno bolj pereče. Ocena biokompatibilnosti oziroma strupenosti zaenkrat še ni stalnica novosintetiziranih delcev, kot tudi ne ocena vpliva na okolje. A tudi, ko so ocene na voljo, je njihovo primerjanje in ovrednotenje oteženo zaradi dejstva, da področje nanotoksičnosti nima dobro definiranih testov, kot tudi ne določenih biomarkerjev, ki bi se rutinsko preverjali. Velikokrat so zanemarjene tudi interakcije nanodelcev z okoliškimi molekulami v biološkem sistemu, na primer serumskimi proteini. Zato smo naš nanomaterial, nanocevke iz titanovega dioksida (TiO<sub>2</sub>-NT), ovrednotili z vrsto različnih pristopov, upoštevajoč intrinzične lastnosti tega materiala. TiO<sub>2</sub> je znan kot fotokatalitični material, ki ob obsevanju z UV-svetlobo v prisotnosti vode producira proste kisikove zvrsti (ROS). Ta lastnost se s pridom uporablja pri samočistilnih površinah in antibakterijskih prevlekah. Mi smo preučevali njegovo potencialno anti-kancerogeno delovanje, ki naj bi potekalo ravno s produkcijo ROS. Tako smo zasnovali 4-dnevni eksperiment, kjer smo rakavim MCF-7 celicam dodali TiO<sub>2</sub>-NT in ga obsevali z UV-svetlobo valovne dolžine 360 nm. Četrty dan smo izmerili viabilnost celic z MTS testom, kjer na podlagi mitohondrijske aktivnosti in posledično produkcije NAD(P)H nastaja vijolični produkt formazan. Naši rezultati kažejo koncentracijsko odvisen padec viabilnosti in vpliva obsevanja, vendar le pri nižjih koncentracijah, medtem ko pri dveh največjih koncentracijah opazimo celo dvig viabilnosti ter slabo ponovljivost rezultatov. Zaključimo, da je dvig viabilnosti zelo verjetno anomalija interakcije samega testa z materialom. V izogib nadaljnjim artefaktom zaradi interakcij viabilnostnih testov z materialom se odločimo, da viabilnost pri največjih koncentracijah testiramo z barvanjem s tripan Modrim in neposrednim štetjem, medtem ko zmožnost proliferacije ocenimo s klonogeničnim testom. Rezultati kažejo, da dodatek nanomateriala zmanjša preživetje celic za polovico, obsevanje pa še za nadaljnjih 10 %. Klonogenični test pa obenem tudi pokaže, da je manjša viabilnost obsevanih celic le posledica zamika v rasti in kot taka reverzibilna ob odstranitvi stresorja. Tekom eksperimenta smo opazili tudi zelo očitno posedanje materiala pri velikih koncentracijah, ki je celice dobesedno prekril. Tako smo sklepali, da je tudi sedimentacija eden od faktorjev, ki jih ne bi smeli zanemariti.

Sedimentacijo smo preverili z UV-Vis spektroskopijo, in sicer v prisotnosti serumskih proteinov in brez njih. Ugotovimo, da serumski proteini očitno stabilizirajo nanomaterial, saj je posedanje po 24 urah minimalno, medtem ko se material v odsotnosti serumskih proteinov povsem posede že v nekaj urah. Posedanje, zanimivo, ni odvisno od koncentracije, temveč izključno od prisotnih proteinov. Zaradi preprečevanja sedimentacije nanomateriala s serumskimi proteini sklepamo, da le-ti interagirajo s površino nanocevk. Da bi dokazali interakcijo, smo spremljali gašenje fluorescenčne probe Alexa 488, ki je bila prek vmesnika vezana na površino delcev, ob hkratnem titriranju s serumskimi proteini. Rezultati kažejo, da pri 20  $\mu$ M proteinov fluorescenca pade za 40 %, kar razložimo z adsorpcijo proteinov na površino nanocevk oziroma formacijo tako imenovane proteinske korone. Ker do sedaj nismo opazili posebnega učinka materiala ob obsevanju in tako zaključili, da v fizioloških pogojih ni fototoksičen, nas je nadalje zanimalo, če je to tudi posledica formacije korone. To smo preverili z elektronsko magnetno resonanco (EPR) in merili formacijo hidroksilnega radikala na obsevanem nanomaterialu ob in brez prisotnosti serumskih proteinov. Rezultati kažejo, da sama sedimentacija zmanjša aktivnost materiala za 50 % brez prisotnosti proteinov, ki bi stabilizirali delce, medtem ko je ob prisotnosti proteinov signal minimalen. Zaključimo lahko, da je formacija korone prepreči produkcijo radikalov in s tem fototoksičnost, verjetno zaradi lovljenja radikalov oz. preprečitve dostopa vode do površine. Ob dognanju, da ima sedimentacija verjetno velik vpliv tudi na strupenost materiala, smo se odločili, da jo zaobidemo in postavimo eksperiment, kjer bi v stik s celicami prišla samo difuzno aktivna frakcija materiala. S tako obrnjeno konfiguracijo, kjer gojimo in tretiramo celice na celičnem nosilcu, ki je obrnjen navzdol in stabiliziran tik pod površino, po 4 dneh preverimo viabilnost s fluorescenčnim testom resazurinom, a tudi ti rezultati ne kažejo že prej dokazanega kvarnega učinka materiala. Ker je resazurin občutljiv na celični metabolizem, se odločimo preveriti viabilnost mitohondrijev in redoks stanje celice, ki odraža celični stres. Fluorescenčni test celičnega stresa celic tretiranih v obrnjeni konfiguraciji preverimo mikroskopsko in slike obdelamo s posebno programsko opremo. Prav tako posnamemo slike v svetlem polju, kjer lahko ocenimo količino internaliziranega materiala. Ugotovimo, da sta celični stres in stopnja internalizacije vzročno povezana. Izvedbe, kjer smo do sedaj dobivali neverjetno visok signal s kolorimetričnimi testi (celice brez seruma z TiO<sub>2</sub>-NT in UV) pobarvamo tudi z Mitotracker barvilom, ki obarva mitohondrije. Ugotovimo veliko gostote izvenceličnih

mitohondrijev, ki bi lahko bili sposobni povzročiti artefakt v meritvah viabilnosti z zgoraj omenjenimi testi. Na podlagi teh zaključimo, da je testiranje nanotoksičnosti kompleksen proces, v katerega morajo biti vštete vse intrinzične lastnosti materiala, kot tudi vpliv biološkega sistema, posebno serumskih proteinov.

## 8 VIRI

- Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X. H., Childs, C. J., Sibata, C. H. 2004. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1, 1: 27-42
- Ao, C. H., Lee, S. C. 2005. Indoor air purification by photocatalyst TiO<sub>2</sub> immobilized on an activated carbon filter installed in an air cleaner. *Chemical Engineering Science*, 60, 1: 103-109
- Bender, K., Blattner, C., Knebel, A., Jordanov, M., Herrlich, P., Rahmsdorf, H. J. 1997. UV-induced signal transduction. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 37, 1-2: 1-17
- Bisharyan, Y., Clark, T. G. 2011. Calcium-dependent mitochondrial extrusion in ciliated protozoa. *Mitochondrion*, 11, 6: 909-918
- Bonini, M. G., Rota, C., Tomasi, A., Mason, R. P. 2006. The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? *Free radical biology & medicine*, 40, 6: 968-975
- Buzea, C., Pacheco, II, Robbie, K. 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2, 4: MR17-71
- Chen, H., Ahsan, S. S., Santiago-Berrios, M. B., Abruna, H. D., Webb, W. W. 2010. Mechanisms of quenching of Alexa fluorophores by natural amino acids. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 21: 7244-7245
- Chen, J., Keltner, L., Christophersen, J., Zheng, F., Krouse, M., Singhal, A., Wang, S. S. 2002. New technology for deep light distribution in tissue for phototherapy. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 8, 2: 154-163
- Cho, E. C., Zhang, Q., Xia, Y. 2011. The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles. *Nature nanotechnology*, 6, 6: 385-391
- de Gruijl, F. R., van Kranen, H. J., Mullenders, L. H. 2001. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 63, 1-3: 19-27
- Dodd, N. J. F., Jha, A. N. 2009. Titanium dioxide induced cell damage: A proposed role of the carboxyl radical. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 660, 1-2: 79-82
- Dolmans, D. E., Fukumura, D., Jain, R. K. 2003. Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews. Cancer*, 3, 5: 380-387



- dos Santos, T., Varela, J., Lynch, I., Salvati, A., Dawson, K. A. 2011. Quantitative assessment of the comparative nanoparticle-uptake efficiency of a range of cell lines. *Small*, 7, 23: 3341-3349
- Droge, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82, 1: 47-95
- Erb, R. E., Ehlers, M. H. 1950. Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen fertilizing capacity. *Journal of Dairy Science*, 33, 12: 853-864
- Erikstein, B. S., Hagland, H. R., Nikolaisen, J., Kulawiec, M., Singh, K. K., Gjertsen, B. T., Tronstad, K. J. 2010. Cellular stress induced by resazurin leads to autophagy and cell death via production of reactive oxygen species and mitochondrial impairment. *Journal of cellular biochemistry*, 111, 3: 574-584
- Faraday, M. 1857. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147, 145-181
- Feynman, R. P. (1960) There's Plenty of Room at the Bottom. *Engineering and Science*, 23, 5: 22-36
- Freeman, S. E., Hacham, H., Gange, R. W., Maytum, D. J., Sutherland, J. C., Sutherland, B. M. 1989. Wavelength dependence of pyrimidine dimer formation in DNA of human skin irradiated in situ with ultraviolet light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 14: 5605-5609
- Freyre-Fonseca, V., Delgado-Buenrostro, N. L., Gutierrez-Cirlos, E. B., Calderon-Torres, C. M., Cabellos-Avelar, T., Sanchez-Perez, Y., Pinzon, E., Torres, I., Molina-Jijon, E., Zazueta, C., Pedraza-Chaverri, J., Garcia-Cuellar, C. M., Chirino, Y. I. 2011. Titanium dioxide nanoparticles impair lung mitochondrial function. *Toxicology letters*, 202, 2: 111-119
- Fujishima, A., Honda, K. 1972. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature*, 238, 5358: 37-38
- Fujishima, A., Zhang, X., Tryk, D. A. 2008. TiO<sub>2</sub> photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports*, 63, 12: 515-582
- Ge, C., Du, J., Zhao, L., Wang, L., Liu, Y., Li, D., Yang, Y., Zhou, R., Zhao, Y., Chai, Z., Chen, C. 2011. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 41: 16968-16973
- Geiser, M., Rothen-Rutishauser, B., Kapp, N., Schurch, S., Kreyling, W., Schulz, H., Semmler, M., Im Hof, V., 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

- Gerencser, A. A., Chinopoulos, C., Birket, M. J., Jastroch, M., Vitelli, C., Nicholls, D. G., Brand, M. D. 2012. Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *The Journal of physiology*, 590, Pt 12: 2845-2871
- Gong, X.-Q., Selloni, A. 2007. First-principles study of the structures and energetics of stoichiometric brookite surfaces. *Physical Review B*, 76, 23: 235307
- Gurr, J. R., Wang, A. 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, 1-2: 66-73
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P. 2004. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, 18, 5: 703-710
- Hu, Y., Tsai, H. L., Huang, C. L. 2003. Effect of brookite phase on the anatase–rutile transition in titania nanoparticles. *Journal of the European Ceramic Society*, 23, 5: 691-696
- Huang, K. T., Chen, Y. H., Walker, A. M. 2004. Inaccuracies in MTS assays: major distorting effects of medium, serum albumin, and fatty acids. *BioTechniques*, 37, 3: 406, 408, 410-402
- Iavicoli, I., Calabrese, E. J., Nascarella, M. A. 2010. Exposure to nanoparticles and hormesis. Dose-response : a publication of International Hormesis Society, 8, 4: 501-517
- Jakubowski, W., Bartosz, G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 29, 11: 1297-1301
- Jakubowski, W., Bartosz, G. 2000. 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell biology international*, 24, 10: 757-760
- Ji, Z., Jin, X., George, S., Xia, T., Meng, H., Wang, X., Suarez, E., Zhang, H., Hoek, E. M., Godwin, H., Nel, A. E., Zink, J. I. 2010. Dispersion and stability optimization of TiO<sub>2</sub> nanoparticles in cell culture media. *Environmental science & technology*, 44, 19: 7309-7314
- Kalbacova, M., Macak, J. M., Schmidt-Stein, F., Mierke, C. T., Schmuki, P. 2008. TiO<sub>2</sub> nanotubes: photocatalyst for cancer cell killing. *physica status solidi (RRL) – Rapid Research Letters*, 2, 4: 194-196
- Kang, J. L., Moon, C., Lee, H. S., Lee, H. W., Park, E. M., Kim, H. S., Castranova, V. 2008. Comparison of the biological activity between ultrafine and fine titanium dioxide particles in RAW 264.7 cells associated with oxidative stress. *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 71, 8: 478-485

- Kim, H., Ahn, E.-K., Jee, B., Yoon, H.-K., Lee, K., Lim, Y. 2009. Nanoparticulate-induced toxicity and related mechanism in vitro and in vivo. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 1: 55-65
- Kim, J. A., Aberg, C., Salvati, A., Dawson, K. A. 2012. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nature nanotechnology*, 7, 1: 62-68
- Kocbek, P., Teskac, K., Kreft, M. E., Kristl, J. 2010. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Small*, 6, 17: 1908-1917
- Kroll, A., Pillukat, M. H., Hahn, D., Schnekenburger, J. 2012. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Archives of toxicology*, 86, 7: 1123-1136
- Laurent, S., Burtea, C., Thirifays, C., Hafeli, U. O., Mahmoudi, M. 2012. Crucial ignored parameters on nanotoxicology: the importance of toxicity assay modifications and "cell vision". *PloS one*, 7, 1: e29997
- Lesniak, A., Salvati, A., Santos-Martinez, M. J., Radomski, M. W., Dawson, K. A., Aberg, C. 2013. Nanoparticle adhesion to the cell membrane and its effect on nanoparticle uptake efficiency. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 4: 1438-1444
- Li, N., Ma, L., Wang, J., Zheng, L., Liu, J., Duan, Y., Liu, H., Zhao, X., Wang, S., Wang, H., Hong, F., Xie, Y. 2009. Interaction Between Nano-Anatase TiO<sub>2</sub> and Liver DNA from Mice In Vivo. *Nanoscale research letters*, 5, 1: 108-115
- Li, Y., Lin, T. Y., Luo, Y., Liu, Q., Xiao, W., Guo, W., Lac, D., Zhang, H., Feng, C., Wachsmann-Hogiu, S., Walton, J. H., Cherry, S. R., Rowland, D. J., Kukis, D., Pan, C., Lam, K. S. 2014. A smart and versatile theranostic nanomedicine platform based on nanoporphyrin. *Nature communications*, 5, 4712
- Linkov, I., Satterstrom, F. K., Corey, L. M. 2008. Nanotoxicology and nanomedicine: making hard decisions. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 4, 2: 167-171
- Liu, X., Chen, G., Su, C. 2011. Effects of material properties on sedimentation and aggregation of titanium dioxide nanoparticles of anatase and rutile in the aqueous phase. *Journal of colloid and interface science*, 363, 1: 84-91
- Lundqvist, M., Stigler, J., Elia, G., Lynch, I., Cedervall, T., Dawson, K. A. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 38: 14265-14270
- Lundqvist, M., Stigler, J., Cedervall, T., Berggard, T., Flanagan, M. B., Lynch, I., Elia, G., Dawson, K. 2011. The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. *ACS nano*, 5, 9: 7503-7509

- Mahon, E., Salvati, A., Baldelli Bombelli, F., Lynch, I., Dawson, K. A. 2012. Designing the nanoparticle-biomolecule interface for "targeting and therapeutic delivery". *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, 161, 2: 164-174
- Mao, W., Chen, X., Yang, T., Yin, Y., Ge, M., Luo, M., Chen, D., Qian, X. 2012. A rapid fluorescent screening method for cellular sensitivity to anti-cancer compound. *Cytotechnology*, 64, 4: 451-457
- McGowan, E. M., Alling, N., Jackson, E. A., Yagoub, D., Haass, N. K., Allen, J. D., Martinello-Wilks, R. 2011. Evaluation of cell cycle arrest in estrogen responsive MCF-7 breast cancer cells: pitfalls of the MTS assay. *PloS one*, 6, 6: e20623
- Milani, S., Bombelli, F. B., Pitek, A. S., Dawson, K. A., Radler, J. 2012. Reversible versus irreversible binding of transferrin to polystyrene nanoparticles: soft and hard corona. *ACS nano*, 6, 3: 2532-2541
- Mills, A., Le Hunte, S. 1997. An overview of semiconductor photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 108, 1: 1-35
- Monopoli, M. P., Aberg, C., Salvati, A., Dawson, K. A. 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature nanotechnology*, 7, 12: 779-786
- Monopoli, M. P., Walczyk, D., Campbell, A., Elia, G., Lynch, I., Bombelli, F. B., Dawson, K. A. 2011. Physical-chemical aspects of protein corona: relevance to in vitro and in vivo biological impacts of nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 8: 2525-2534
- Myhre, O., Andersen, J. M., Aarnes, H., Fonnum, F. 2003. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical pharmacology*, 65, 10: 1575-1582
- Nascarella, M. A., Calabrese, E. J. 2012. A method to evaluate hormesis in nanoparticle dose-responses. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*, 10, 3: 344-354
- Nicholls, D. G. 2004. Mitochondrial membrane potential and aging. *Aging cell*, 3, 1: 35-40
- Nolan, N. T., Seery, M. K., Pillai, S. C. 2009. Spectroscopic Investigation of the Anatase-to-Rutile Transformation of Sol-Gel-Synthesized TiO<sub>2</sub> Photocatalysts. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113, 36: 16151-16157
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry / FEBS*, 267, 17: 5421-5426
- Oberdorster, G. 2010. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine*, 267, 1: 89-105

- Ochiai, T., Hoshi, T., Slimen, H., Nakata, K., Murakami, T., Tatejima, H., Koide, Y., Houas, A., Horie, T., Morito, Y., Fujishima, A. 2011. Fabrication of a TiO<sub>2</sub> nanoparticles impregnated titanium mesh filter and its application for environmental purification. *Catalysis Science & Technology*, 1, 8: 1324-1327
- Okazaki, Y., Gotoh, E. 2005. Comparison of metal release from various metallic biomaterials in vitro. *Biomaterials*, 26, 1: 11-21
- Ophus, E. M., Rode, L., Gylseth, B., Nicholson, D. G., Saeed, K. 1979. Analysis of titanium pigments in human lung tissue. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 5, 3: 290-296
- Page, B., Page, M., Noel, C. 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements in-vitro. *International journal of oncology*, 3, 3: 473-476
- Pavey, S., Russell, T., Gabrielli, B. 2001. G2 phase cell cycle arrest in human skin following UV irradiation. *Oncogene*, 20, 43: 6103-6110
- Pelaez, M., Nolan, N. T., Pillai, S. C., Seery, M. K., Falaras, P., Kontos, A. G., Dunlop, P. S. M., Hamilton, J. W. J., Byrne, J. A., O'Shea, K., Entezari, M. H., Dionysiou, D. D. 2012. A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*, 125, 0: 331-349
- Poot, M., Zhang, Y. Z., Kramer, J. A., Wells, K. S., Jones, L. J., Hanzel, D. K., Lugade, A. G., Singer, V. L., Haugland, R. P. 1996. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 44, 12: 1363-1372
- Rittie, L., Fisher, G. J. 2002. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing research reviews*, 1, 4: 705-720
- Robichaud, C. O., Uyar, A. E., Darby, M. R., Zucker, L. G., Wiesner, M. R. 2009. Estimates of upper bounds and trends in nano-TiO<sub>2</sub> production as a basis for exposure assessment. *Environmental science & technology*, 43, 12: 4227-4233
- Rota, C., Chignell, C. F., Mason, R. P. 1999. Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements. *Free radical biology & medicine*, 27, 7-8: 873-881
- Rozhkova, E. A., Ulasov, I., Lai, B., Dimitrijevic, N. M., Lesniak, M. S., Rajh, T. 2009. A high-performance nanobio photocatalyst for targeted brain cancer therapy. *Nano letters*, 9, 9: 3337-3342
- Safi, M., Courtois, J., Seigneuret, M., Conjeaud, H., Berret, J. F. 2011. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 35: 9353-9363

- Sarasin, A. 1999. The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutation research*, 428, 1-2: 5-10
- Shi, X., von dem Bussche, A., Hurt, R. H., Kane, A. B., Gao, H. 2011. Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation. *Nature nanotechnology*, 6, 11: 714-719
- Skocaj, M., Filipic, M., Petkovic, J., Novak, S. 2011. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiology and oncology*, 45, 4: 227-247
- Smijs, T. G., Pavel, S. 2011. Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. *Nanotechnology, science and applications*, 4, 95-112
- Smithies, O., Lawrence, M., Testen, A., Horne, L. P., Wilder, J., Altenburg, M., Bleasdale, B., Maeda, N., Koklic, T. 2014. Stable oligomeric clusters of gold nanoparticles: preparation, size distribution, derivatization, and physical and biological properties. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*, 30, 44: 13394-13404
- Soriani, M., Pietraforte, D., Minetti, M. 1994. Antioxidant potential of anaerobic human plasma: role of serum albumin and thiols as scavengers of carbon radicals. *Archives of biochemistry and biophysics*, 312, 1: 180-188
- Stebbing, A. R. 1987. Growth hormesis: a by-product of control. *Health physics*, 52, 5: 543-547
- Tachikawa, T., Tojo, S., Fujitsuka, M., Majima, T. 2004. Formation of the dimer radical cation of aromatic sulfide on the TiO<sub>2</sub> surface during photocatalytic reactions. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*, 20, 11: 4327-4329
- Tamaki, Y., Furube, A., Katoh, R., Murai, M., Hara, K., Arakawa, H., Tachiya, M. 2006. Trapping dynamics of electrons and holes in a nanocrystalline TiO<sub>2</sub> film revealed by femtosecond visible/near-infrared transient absorption spectroscopy. *Comptes Rendus Chimie*, 9, 2: 268-274
- Tavares, A. M., Louro, H., Antunes, S., Quarre, S., Simar, S., De Temmerman, P. J., Verleysen, E., Mast, J., Jensen, K. A., Norppa, H., Nesslany, F., Silva, M. J. 2014. Genotoxicity evaluation of nanosized titanium dioxide, synthetic amorphous silica and multi-walled carbon nanotubes in human lymphocytes. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, 28, 1: 60-69
- Tedja, R., Lim, M., Amal, R., Marquis, C. 2012. Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. *ACS nano*, 6, 5: 4083-4093
- Testino, A., Bellobono, I. R., Buscaglia, V., Canevali, C., D'Arienzo, M., Polizzi, S., Scotti, R., Morazzoni, F. 2007. Optimizing the Photocatalytic Properties of Hydrothermal TiO<sub>2</sub> by the Control of Phase Composition and Particle Morphology. A Systematic Approach. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 12: 3564-3575

- Thevenot, P., Cho, J., Wavhal, D., Timmons, R. B., Tang, L. 2008. Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 4, 3: 226-236
- Thurn, K. T., Arora, H., Paunesku, T., Wu, A., Brown, E. M., Doty, C., Kremer, J., Woloschak, G. 2011. Endocytosis of titanium dioxide nanoparticles in prostate cancer PC-3M cells. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 7, 2: 123-130
- Toumey, C. 2008. Reading Feynman into Nanotechnology: A Text for a New Science. *Techné*, 13, 3: 133-168
- Uchino, T., Tokunaga, H., Ando, M., Utsumi, H. 2002. Quantitative determination of OH radical generation and its cytotoxicity induced by TiO<sub>2</sub>-UVA treatment. *Toxicology in Vitro*, 16, 5: 629-635
- Valant, J., Iavicoli, I., Drobne, D. 2012a. The importance of a validated standard methodology to define in vitro toxicity of nano-TiO<sub>2</sub>. *Protoplasma*, 249, 3: 493-502
- Valant, J., Drobne, D., Novak, S. 2012b. Effect of ingested titanium dioxide nanoparticles on the digestive gland cell membrane of terrestrial isopods. *Chemosphere*, 87, 1: 19-25
- Visser, W., van Spronsen, E. A., Nanninga, N., Pronk, J. T., Gijs Kuenen, J., van Dijken, J. P. 1995. Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 67, 3: 243-253
- Wang, F., Yu, L., Monopoli, M. P., Sandin, P., Mahon, E., Salvati, A., Dawson, K. A. 2013a. The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 9, 8: 1159-1168
- Wang, P., Henning, S. M., Heber, D. 2010. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS one*, 5, 4: e10202
- Wang, X., Fang, H., Huang, Z., Shang, W., Hou, T., Cheng, A., Cheng, H. 2013b. Imaging ROS signaling in cells and animals. *Journal of molecular medicine*, 91, 8: 917-927

## ZAHVALA

Zahvaljujem se prof. dr. Janezu Štrancarju za priložnost in posebno za izkušnje pridobljene tekom štirih let v njegovem laboratoriju, za uvid v akademsko in raziskovalno sfero, za izjemno potrpežljivost tekom pisanja magistrske in nenazadnje za ekspresno recenzijo le-te.

Prav tako gre zahvala dr. Kokliču za neštete ure brainstorminga ob rezultatih, ki se niso hoteli vdati in za vse nasvete tekom dela, ter Tilnu za vse življenske lekcije izven delovnega okvirja, ki se na koncu izkažejo za enako pomembne.

Hvala tudi vsem ostalim članom Laboratorija za biofiziko in EPR centra na IJS Ajasji, Almi, Iztoku, Marjani, prof. Marjeti Šentjunc, Roku, Zoranu in posebno Maji za pomoč in sodelovanje. Samo upam lahko, da še kdaj zaidem v tak kolektiv.

Zahvaljujem se tudi prof. dr. Damjani Drobne za produktivne jutranje nano-diskusije in za izboljšanje samega dela. Hvala tudi predsednici komisije prof. dr. Kristini Sepčič za fleksibilnost in izjemno prijaznost.

Nenazadnje pa gre prav posebna zahvala staršem in domačim, ki so mi ves čas študija stali ob strani in mi vedno dajali vedeti, da kjub vsemu še niso pripravljeni povsem obupati nad mano.