

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tanja BLAGUS

**OVREDNOTENJE IN OPTIMIZACIJA UPORABE  
CELIČNEGA BIOSENZORSKEGA SISTEMA  
HUMANIH JETRNIH CELIC HepG2p21 DsRed ZA  
DETEKCIJO GENOTOKSIČNIH SNOVI**

DIPLOMSKO DELO

**Univerzitetni študij**

**Ljubljana, 2011**

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tanja BLAGUS

**OVREDNOTENJE IN OPTIMIZACIJA UPORABE CELIČNEGA  
BIOSENZORSKEGA SISTEMA HUMANIH JETRNIH CELIC  
HepG2p21DsRed ZA DETEKCIJO GENOTOKSIČNIH SNOVI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**EVALUATION AND OPTIMIZATION OF THE USE OF BIOSENSOR  
SYSTEM OF HUMAN LIVER CELLS HepG2p21 DsRed FOR  
DETECTION OF GENOTOXIC AGENTS**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek študija biologije. Opravljeno je bilo na Oddelku za eksperimentalno onkologijo Onkološkega inštituta Ljubljana ter delno na Nacionalnem inštitutu za biologijo, v laboratorijih za genetsko toksikologijo in biologijo raka.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Majo Čemažar.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja Žgur Bertok

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Maja Čemažar

(mentorica) Onkološki inštitut Ljubljana, Oddelek za eksperimentalno onkologijo

Članica: doc. dr. Jerneja Ambrožič Avguštin

(recenzentka) Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Tanja Blagus

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	575.17:577.2(043.2)=163.6
KG	celična linija HepG2/biosenzorski sistem/fluorescenčni protein DsRed/promotor p21/genotoksičnost/test Alamar Blue/izražanje poročevalskega proteina
AV	BLAGUS, Tanja
SA	ČEMAŽAR, Maja (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2011
IN	OVREDNOTENJE IN OPTIMIZACIJA UPORABE CELIČNEGA BIOSENZORSKEGA SISTEMA HUMANIH JETRNH CELIC HepG2p21 DsRed ZA DETEKCIJO GENOTOSKIČNIH SNOVI
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XII, 72 str., 9 pregl., 23 sl., 112 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Vsakodnevno smo izpostavljeni mnogim dejavnikom, ki povzročajo poškodbe DNA s potencialno mutagenim učinkom, ki lahko vodijo v nastanek rakastih obolenj. Takšne dejavnike je treba prepoznati in oceniti, kakšno tveganje za človekovo zdravje predstavljajo. Za ocenitev tveganja je treba razviti metode, ki bodo zagotovile hitro in natančno določitev lastnosti kemikalij ter njihovega vpliva na zdravje ljudi.</p> <p>Metabolno aktivne celice človeškega hepatoma HepG2, transfecirane s plazmidom, ki ima zapis za protein DsRed in je pod uravnavo promotorja p21 (HepG2p21 DsRed), smo poskušali optimizirati in ovrednotiti z izolacijo klonov, številom presajanj (pasaž) celic ter uporabo različnih vrst spektrofluorimetrov ob izpostavitvi celic metilmetan sulfonatu (MMS) in bezo(a)pirenu (BaP). Celice smo za preverjanje primernosti biosenzorskega sistema izpostavili tudi različnim vrstam nanodelcev – superparamagnetni železov oksid (SPIONs) ter anatazni in rutilni titanov dioksid dveh velikosti (TiO<sub>2</sub>-An, TiO<sub>2</sub>-Ru, TiO<sub>2</sub>-Bulk). Preživetje celic smo določali s testom Alamar Blue, pri delu s titanovim nanodelci smo preživetje preverjali tudi s testi MTS in MTT.</p> <p>Rezultati naše raziskave so pokazali, da so bili izolirani kloni celične linije občutljivejši in boljje odzivni na genotoksičnost snovi kot neselekcioniirane celice. Pri primerjavi intenzitete fluorescence med posameznimi pasažami smo ugotovili, da ta ni odvisna od števila presajanj celic. Rezultati, dobljeni med validacijo spektrofluorimetrov, so pokazali, da je zaznava poročevalskega proteina DsRed oziroma intenzitete njegove fluorescence odvisna od vrste in občutljivosti spektrofluorimetra. S testiranjem nanodelcev (SPIONs, TiO<sub>2</sub>), smo ugotovili, da jeporočevalski sistem HepG2p21 DsRed primeren za določevanje genotoksičnosti nanodelcev in da test AlamarBlue ni primeren za ugotavljanje viabilnosti celic, kadar je testirana snov netopna.</p> <p>Z diplomsko nalogo smo optimizirali in ovrednotili biosenzorski sistem humanega hepatoma HepG2p21 DsRed ter pokazali, da je sistem občutljiv in zanesljiv za merjenje genotoksičnosti različnih snovi, tudi nanodelcev.</p>

## KEYWORDS DOCUMENTATION

ŠD	Dn
DK	575.17:577.2(043.2)=163.6
CX	HepG2 cells/cell biosensor system/fluorescent protein DsRed/p21 promoter/genotoxicity/ Alamar Blue assay/reporter gene assay
AU	BLAGUS, Tanja
AA	ČEMAŽAR, Maja (supervisor)
PP	SI-1000, Ljubljana, Večna pot 111
PB	University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology
PY	2011
TI	EVALUATION AND OPTIMIZATION OF THE USE OF BIOSENSOR SYSTEM OF HUMAN LIVER CELLS HepG2p21 DsRed FOR DETECTION OF GENOTOXIC AGENTS
DT	Graduation thesis (University studies)
NO	XII, 72 p., 9 tab., 23 fig., 112 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AI	<p>In everyday life we are exposed to variety of toxic agents, which induces DNA damages, and have potential mutagenic effect, which may lead to carcinogenesis. It is necessary to identify such agents and to assess the potential risk they represent on human health. For risk assessment it is necessary to develop methods that will ensure fast and accurate determination of the characteristic of chemicals and their impact on human health.</p> <p>Metabolically active HepG2 human hepatoma cells transfected with plasmid encoding DsRed protein under the control of the p21 promoter (HepG2p21 DsRed), we tried to optimize and evaluate with isolation of clones, with different number of passages and according to nature and sensitivity of microplate reader through exposure of cells to methyl methane sulphonate (MMS) in benzo(a)pyrene (BaP). To determine whether the reporter system is suitable for detection of genotoxicity of nanoparticles, we exposed cells to different types of nanoparticles – superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) and to anatase as well as rutile titanium dioxide in two sizes (TiO<sub>2</sub>-An, TiO<sub>2</sub>-Ru, TiO<sub>2</sub>-Bulk). Cell survival and viability was determined by AlamarBlue assay, MTS and MTT assays were used also while working with titanium dioxide nanoparticles.</p> <p>The results of our study showed that isolated clones of cell line were more sensitive and responsive to genotoxic effect of the agents than the parental non-selected cells. When comparing the fluorescence intensity of individual passages, we found that fluorescence intensity did not depend on number of cell culture passages. Results obtained during validation of microplate readers showed that the detection of reporter protein DsRed or its fluorescence intensity depended on type and sensitivity of microplate reader. Testing of nanoparticles (SPIONs, TiO<sub>2</sub>), demonstrated that reporter system HepG2p21 DsRed is suitable for detection of genotoxicity of nanoparticles. Additionally, we demonstrated that assay Alamar Blue is not suitable for measuring cell viability when tested substance is insoluble.</p> <p>In conclusion, we optimized and evaluated cell biosensor system of human hepatoma HepG2p21 DsRed and demonstrated that it is sensitive and reliable system for measurement of genotoxicity of different agents, including nanoparticles.</p>

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEYWORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK .....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC .....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE .....</b>	<b>2</b>
<b>3 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 GENOTOKSIČNOST.....</b>	<b>3</b>
<b>3.2 TESTI ZA ZAZNAVO POŠKODBE CELIČNE DNA.....</b>	<b>3</b>
3.2.1 Testi za odkrivanje mutacij.....	4
3.2.2 Testi za odkrivanje kromosomskih mutacij.....	5
3.2.3 Test za odkrivanje poškodbe DNA in celični odziv na poškodbo .....	6
<b>3.3 DEFINICIJA BIOSENZORJEV IN NJIHOVA UPORABA .....</b>	<b>6</b>
<b>3.4 VRSTE BIOSENZORJEV .....</b>	<b>8</b>
3.4.1 Encimski biosenzorji .....	9
3.4.2 Imunosenzorji .....	10
3.4.3 DNA-biosenzorji .....	11
3.4.4 Celični biosenzorji.....	11
<b>3.5 CELIČNI BIOSENZORSKI SISTEM NA OSNOVI TEHNOLOGIJ     POROČEVALSKIH GENOV .....</b>	<b>13</b>
3.5.1 Poročevalski proteini .....	13
3.5.1.1 Zeleni fluorescenčni protein (GFP).....	13
3.5.1.2 Rdeči fluorescenčni protein (DsRed) .....	14
3.5.2 Uporaba poročevalskih genov v genski toksikologiji .....	15
3.5.3 Uporaba tumor supresorja p21 kot biomarkerja za odkrivanje genskih poškodb .....	17
<b>3.6 CELIČNA KULTURA HepG2.....</b>	<b>18</b>

3.6.1	Celična linija HepG2p21 DsRed .....	18
<b>4</b>	<b>MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1</b>	<b>CELIČNA KULTURA.....</b>	<b>20</b>
<b>4.2</b>	<b>GOJENJE CELIC.....</b>	<b>20</b>
<b>4.3</b>	<b>TESTIRANE KEMIKALIJE .....</b>	<b>21</b>
4.3.1	Metilmetan sulfonat (MMS) .....	22
4.3.2	Benzo(a)piren (BaP).....	22
4.3.3	Titanov dioksid (TiO <sub>2</sub> ) .....	22
4.3.4	Superparamagnetni železov oksid (SPIONs).....	23
<b>4.4</b>	<b>DOLOČANJE VIABILNOSTI CELIC, CITOTOKSIČNOSTI IN PREŽIVETJA CELIC .....</b>	<b>23</b>
4.4.1	Test MTT .....	23
4.4.2	Test MTS .....	24
4.4.3	Test Alamar Blue .....	25
<b>4.5</b>	<b>SLIKANJE CELIC HepG2p21 DsRed.....</b>	<b>26</b>
<b>4.6</b>	<b>MERJENJE FLUORESCENCE IN ABSORBANCE .....</b>	<b>27</b>
<b>4.7</b>	<b>DOLOČANJE RASTNIH KRIVULJ CELIČNIH LINIJ HepG2 IN HepG2p21 DsRed.....</b>	<b>28</b>
<b>4.8</b>	<b>IZOLACIJA KLONOV CELIČNE LINIJE HepG2p21 DsRed .....</b>	<b>29</b>
<b>4.9</b>	<b>PRIMERJAVA VREDNOSTI INTENZITETE FLUORESCENCE MED POSAMEZNIMI PASAŽAMI CELIČNE LINIJE HepG2p21 DsRed.....</b>	<b>31</b>
<b>4.10</b>	<b>VALIDACIJA SPEKTROFLUORIMETROV .....</b>	<b>32</b>
<b>4.11</b>	<b>TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV .....</b>	<b>33</b>
4.11.1	Superparamagnetni železov oksid.....	33
4.11.2	Titanov dioksid .....	36
<b>4.12</b>	<b>STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV .....</b>	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>REZULTATI .....</b>	<b>38</b>
<b>5.1</b>	<b>DOLOČANJE RASTNIH KRIVULJ CELIČNIH LINIJ HepG2 IN HepG2p21 DsRed.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2</b>	<b>IZOLACIJA KLONOV CELIČNE LINIJE HepG2p21 DsRed .....</b>	<b>39</b>

<b>5.3 PRIMERJAVA VREDNOSTI INTENZITETE FLUORESCENCE MED POSAMEZNIMI PASAŽAMI CELIČNE LINIJE HepG2p21 DsRed.....</b>	<b>42</b>
<b>5.4 VALIDACIJA SPEKTROFLUORIMETROV.....</b>	<b>43</b>
5.4.1 MMS.....	44
5.4.2 BaP.....	46
<b>5.5 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV.....</b>	<b>48</b>
5.5.1 Superparamagnetni železov oksid (SPIONs).....	48
5.5.2 Titanov dioksid (TiO <sub>2</sub> ).....	50
5.5.2.1 Alamar Blue.....	51
5.5.2.2 MTS.....	52
5.5.2.3 MTT.....	54
<b>6 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>57</b>
<b>7 POVZETEK.....</b>	<b>63</b>
<b>8 VIRI.....</b>	<b>64</b>

**ZAHVALA**



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Princip delovanja biosenzorjev .....	7
<b>Slika 2:</b> Teorija merjenja s celičnim biosenzorskim sistemom .....	12
<b>Slika 3:</b> Shema plazmida p21-DsRed2 .....	19
<b>Slika 4:</b> Celična linija HepG2p21 DsRed, slikana z invertnim mikroskopom po izpostavitvi MMS (40µg/ml) pri 300-kratni povečavi .....	20
<b>Slika 5:</b> Struktura MTT tetrazolijeve soli, ki se reducira v MTT-formazan .....	24
<b>Slika 6:</b> Struktura MTS tetrazolijeve soli in nastalega produkta, formazana .....	25
<b>Slika 7:</b> Struktura Alamar Blue (moder resazurin), ki ima nizko fluorescenco, ter njegovega produkta (roza resorufin), ki je visoko fluorescenten.....	26
<b>Slika 8:</b> Umeritvena krivulja celične linije HepG2.....	38
<b>Slika 9:</b> Umeritvena krivulja celične linije HepG2p21 DsRed .....	38
<b>Slika 10:</b> Rastni krivulji celičnih linij HepG2 in HepG2p21 DsRed.....	39
<b>Slika 11:</b> Izolirani kloni celične linije HepG2p21 DsRed na podlagi 48-urne izpostavitve različnim koncentracijam MMS (0, 10, 40 µg/ml).....	40
<b>Slika 12:</b> Klon B3 .....	41
<b>Slika 13:</b> Klon F5.....	41
<b>Slika 14:</b> Primerjava občutljivosti spektrofluorimetrov za merjenje intenzitete fluorescence po izpostavitvi celične linije HepG2p21 DsRed različnim koncentracijam MMS (0, 5, 10, 20, 40 in 50 µg/ml).....	44
<b>Slika 15:</b> Primerjava občutljivosti spektrofluorimetrov za merjenje intenzitete fluorescence po izpostavitvi celične linije HepG2p21 DsRed različnim koncentracijam BaP (0, 0,05, 0,13, 0,25, 0,50 in 1,26 µg/ml) .....	46
<b>Slika 16:</b> Indukcija fluorescence, normirana na preživetje po 48-urni izpostavitvi superparamagnetnim nanodelcem, prevlečenih s poliakrilno kislino (SPIONs-PAA), DNA (pEGFP N1 CMV) in polietilaminu (PEI).....	49
<b>Slika 17:</b> Preživetje celic po 48-urni izpostavitvi superparamagnetnim nanodelcem, prevlečenih s poliakrilno kislino (SPIONs-PAA), DNA (pEGFP- N1- CMV) in polietilaminu (PEI).....	50

<b>Slika 18:</b> Indukcija fluorescence po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovega dioksida (TiO <sub>2</sub> ) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), normirana na preživetje celic dobljeno s testom Alamar Blue .....	51
<b>Slika 19:</b> Preživetje celic po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovega dioksida (TiO <sub>2</sub> ) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), dobljeno s testom Alamar Blue .....	52
<b>Slika 20:</b> Indukcija fluorescence po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovega dioksida (TiO <sub>2</sub> ) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), normirana na preživetje celic dobljeno s testom MTS .....	53
<b>Slika 21:</b> Preživetje celic po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovga dioksida (TiO <sub>2</sub> ) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), dobljeno s testom MTS .....	54
<b>Slika 22:</b> Indukcija fluorescence po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovega dioksida (TiO <sub>2</sub> ) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), normirana na preživetje celic dobljeno s testom MTT .....	55
<b>Slika 23:</b> Preživetje celic po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovega dioksida (TiO <sub>2</sub> ) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), dobljeno s testom MTT .....	56

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Prikaz nasaditve celic v postopku izolacije klonov .....	30
<b>Preglednica 2:</b> Nasaditev in izpostavitve celic različnim koncentracijam MMS in BaP .....	33
<b>Preglednica 3:</b> Prikaz nanosa različnih volumnov gojišča v posamezni stolpec .....	34
<b>Preglednica 4:</b> Priprava kompleksov: PEI + DNA; PEI + SPIONs-PAA; SPIONs-PAA + DNA; PEI + SPIONs-PAA + DNA.....	35
<b>Preglednica 5:</b> Izpostavitve celic DNA, PEI in SPIONs-PAA.....	35
<b>Preglednica 6:</b> Prikaz nasaditve celic in izpostavitve titanovim nanodelcem TiO <sub>2</sub> .....	37
<b>Preglednica 7:</b> Prikaz vrednosti razmerja indukcije in preživetja celic pri različnih pasažah	43
<b>Preglednica 8:</b> Vrednosti razmerja inducirane fluorescence proteina DsRed .....	45
<b>Preglednica 9:</b> Vrednosti razmerja inducirane fluorescence proteina DsRed. ....	47

**OKRAJŠAVE IN SIMBOLI**

$\beta$ -GAL	$\beta$ -galaktozidaza (angl. $\beta$ -galactosidase)
BaP	benzo(a)piren (angl. benzo(a)pyrene)
BPDE	benzo(a)piren diolepoksid (angl. benzo(a)pyrene diolepoxide)
CAT	kloramfenikol acetil transferaza (angl. chloramphenicol acetyl transferase)
CDK	od ciklina odvisna kinaza (angl. cyclin-dependent kinase)
CMV	citomegalovirus (angl. cytomegalovirus)
dEGFP	destabiliziran EGFP (angl. destabilized EGFP)
DMSO	dimetil sulfoksid (angl. dimethyl sulphoxide)
DNA	deoksiribonukleinska kislina (angl. deoxyribonucleic acid)
DsRed	rdeči fluorescenčni protein (angl. red fluorescent protein)
DSBs	prelom v obeh verigahDNA (angl. double-strand breaks)
EC	Evropska komisija (angl. European Commission)
EGFP	ojačan zeleni fluorescenčni protein (angl. enhanced green fluorescent protein)
ELISA	encimskoimunski test (angl. enzyme linked immunosorbant assay)
FBS	fetalni goveji serum (angl. fetal bovine serum)
FRET	fluorescenčni prenos resonančne energije (angl. fluorescence resonance energy transfer)
GADD	ustavitev rasti in poškodba DNA (angl. growth arrest and DNA damage)
GFP	zeleni fluorescenčni protein (angl. green fluorescent protein)
GST	glutation S transferaza (angl. glutathione S transferase)
HC	na osnovi humanih celic (angl. human cell-based)
HepG2	človeški jetrni karcinom (angl. human hepatoma cells)
IF	indukcija fluorescence (angl. fluorescence induction)
MEM	minimalno osnovno gojišče (angl. minimum essential medium)
MLA	metoda za določanje genskih poškodb na celicah mišjega limfoma (angl. mouse lymphoma assay)
MMS	metil metan sulfonat (angl. methyl methane sulphonate)
MODC	mišja ornitin dekarboksilaza (angl. mouse ornithin decarboxylase)
MTS	1-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid (1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

MTT	3-(4,5- dimetiltiazol -2-il)-2,5-difenil tetrazolijev bromid (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
PAA	poliakrilna kislina (angl. polyacrylic acid)
PBS	raztopina fosfatnega pufra (angl. phosphate buffer saline)
PCNA	jedrni antigen proliferajočih celic (angl. proliferating cell nuclear antigen)
PEI	polietilamin (angl. polyethylamine)
PLL	poli lizin (angl. poly-L-lysine)
RAD	rekombinacija in popravilo DNA (angl. recombination and DNA repair)
REACH	registracija, evalvacija, avtorizacija in omejevanje kemikalij (angl. registration, evaluation, authorization and restriction of chemicals)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (angl. reactive oxygen species)
SCGE	gelska elektroforeza posamezne celice (angl. single cell gel electrophoresis)
SPIONs	superparamagnetni železov oksid (angl. superparamagnetic iron oxide nanoparticles)
SSBs	prelomi v enojni verigiDNA (angl. single-strand breaks)
TiO <sub>2</sub>	titanov dioksid (angl. titanium dioxide)
TiO <sub>2</sub> -An	TiO <sub>2</sub> anatazne oblike nanometerskih velikosti
TiO <sub>2</sub> -Bulk	TiO <sub>2</sub> anatazne oblike podmikronskih velikosti
TiO <sub>2</sub> -Ru	TiO <sub>2</sub> rutilne oblike nanometerskih velikosti
TK	timidin kinaza (angl. thymidine kinase)

## 1 UVOD

Organske snovi, pesticidi, izpušni plini, odpadni produkti in mnogi drugi onesnaževalci predstavljajo velik problem za naše okolje in zdravje ljudi, predvsem v daljšem časovnem obdobju. Za kakovostno in kar se da varno življenje je nujno treba preveriti in identificirati potencialno škodljive učinke različnih snovi na okolje in ljudi pred njihovo nadaljnjo uporabo. Evropska skupnost je leta 2006 v ta namen pripravila uredbo REACH (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances) (EC 1907/2006), s katero naj bi se zagotovilo visoko raven varovanja ljudi in okolja s hitrejšo in boljšo identifikacijo lastnosti določenih kemičnih spojin ter na osnovi izsledkov nevarne kemikalije nadomestilo z manj nevarnimi.

Toksikološke raziskave imajo osrednjo vlogo pri ocenjevanju nevarnosti kemikalij za zdravje ljudi ob njihovi predhodni izpostavitvi. Pomembno in posebno mesto med njimi zavzemajo genotoksične raziskave. Namen teh je ugotoviti, ali neka spojina povzroča genetske poškodbe (mutacije celične DNA), katerih posledica je spremenjeno delovanje celic in s tem večje tveganje za nastanek rakavih obolenj in degenerativnih bolezni. Genetske poškodbe tako lahko privedejo do obremenitve genskega sklada in posledično do nastanka dednih bolezni. Genotoksične analize so nujno potrebne za pregled snovi, (1) ki so sestavni del potencialnih zdravil (kemične knjižnice), (2) ki so pogosti aditivi v prehrabni industriji, in snovi, (3) ki se uporabljajo v kozmetični industriji. Same metode genotoksičnih raziskav se uporabljajo tudi na področjih onesnaževanja in varstva okolja. Kljub temu da obstaja veliko fizikalno-kemijskih metod za ocenjevanje onesnaženosti, te niso dovolj za celostno sliko, zato je treba izvajati biološke teste, ki omogočajo lažje razumevanje delovanja kemikalij in njihovih mešanic na okolje. Med bioteste prištevamo tudi genotoksične teste, s katerimi lahko spremljamo kontaminacijo vode, zemlje in zraka s onesnaževalci.

Za testiranje genotoksičnih in citotoksičnih snovi in produktov, ki se uporabljajo v farmacevtski, prehrabni, kozmetični in kmetijski industriji, so testi genotoksičnosti izvedeni *in vitro* na celičnih linijah oziroma *in vivo* na živih organizmih.

## 2 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Namen diplomskega dela je ovrednotiti in optimizirati celični biosenzorski sistem humanega jetrnega karcinoma HepG2p21 DsRed s selekcijo različnih klonov, z različnim številom pasaž (presajanja celic) ter z uporabo različnih vrst spektrofluorimetrov (filtrski ali monokromatorski). Pri tem smo uporabili kemikalije z znanim delovanjem, metilmetan sulfonat (MMS) in benzo(a)piren (BaP). Poleg optimizacije in ovrednotenja biosenzorskega sistema smo želeli preveriti še njegovo uporabnost pri določanju delovanja različnih vrst nanodelcev.

V okviru diplomskega dela smo zastavili naslednje hipoteze:

1. S selekcijo klonov celične linije HepG2p21 DsRed bomo izolirali klon z visoko občutljivostjo na genotoksične spojine.
2. Število presajanj celic (število pasaž) vpliva na stopnjo občutljivosti celičnega biosenzorskega sistema.
3. Zaznava genotoksičnosti z merjenjem indukcije fluorescence je odvisna od občutljivosti spektrofluorimetra.
4. Celični biosenzorski sistem HepG2p21 DsRed je primeren za določevanje genotoksičnosti različnih vrst nanodelcev.

### 3 PREGLED OBJAV

#### 3.1 GENOTOKSIČNOST

Genotoksično delovanje je le eden od mnogih škodljivih učinkov toksičnih snovi na zdravje ljudi. Genotoksičnost je lastnost snovi za vezavo na deoksiribonukleinsko kislino (DNA angl. deoxyribonucleic acid) ter na druge celične tarče, ki so odgovorne za integriteto DNA. Genotoksičen dejavnik ali genotoksin se lahko poveže z DNA (neposredno delovanje) ali pa vpliva na celične mehanizme, ki zagotavljajo natančno podvojevanje celičnega genoma oziroma aktivira druge molekule, ki potem poškodujejo DNA (posredno delovanje). Z delovanjem genotoksične snovi pride do nastanka DNA aduktov, prelomov verig DNA (prelomi ene verige (SSBs angl. single strand breaks), prelomi obeh verig (DSBs angl. double strand breaks)), točkovnih mutacij ter strukturnih in numeričnih kromosomskih sprememb.

Genotoksine lahko na podlagi njihovega vpliva na DNA razdelimo na karcinogene (agensi, ki povzročajo nastanek rakavih obolenj), mutagene (agensi, ki izzovejo nastanek mutacij) in teratogene (agensi, pri katerih pride do poškodb oziroma smrti zarodkov).

#### 3.2 TESTI ZA ZAZNAVO POŠKODBE CELIČNE DNA

Testi genotoksičnosti so lahko definirani kot *in vivo* in *in vitro* testi, ki preko različnih mehanizmov posredno ali neposredno odkrivajo genetske poškodbe. Ti testi so namenjeni zaznavanju potencialne nevarnosti snovi za nastanek poškodb na DNA-verigi v obliki mutacij genov, kromosomskih poškodb, rekombinacij ali številnih kromosomskih sprememb, ki pa so pomembne pri dedovanju na potomce (Dearfield, 1995). Testirano snov, pri kateri je zaznana poškodba DNA, lahko opredelimo kot genotoksično. Taka snov je potencialni karcinogen in/ali mutagen pri glodavcih in/ali ljudeh (Dearfield, 1995; Monroe, 1996; Battershill in Fielder; 1998).

Teste lahko glede na zaznavo različnih mehanizmov genotoksičnosti razdelimo na:

1. test za odkrivanje mutacij,



2. test za odkrivanje kromosomskih mutacij in
3. test za odkrivanje poškodbe DNA in celičnega odziva na poškodbo.

Zgoraj naštetih skupine testov lahko razdelimo v dve skupini: osnovni (angl. core) in indikatorski testi. Osnovni testi so tisti testi, ki nam podajo končni izid. Sem prištevamo teste za odkrivanje mutacij in kromosomskih mutacij. Druga skupina testov so indikatorski testi, pri katerih določamo markerje za dokazovanje genotoksičnih učinkov. Sem prištevamo teste za odkrivanje poškodbe DNA ter teste za opazovanje celičnega odziva na poškodbo.

### 3.2.1 Testi za odkrivanje mutacij

Leta 1973 so Ames in sod. razvili Ames test (Ames in sod., 1973), ki je najpogosteje uporabljen genotoksični test. Ames test je test, ki temelji na uporabi mikroorganizma, in sicer mutante seva *Salmonella typhimurium*, ki je izgubila zmožnost sinteze histidina ter s tem posledično rasti ob odsotnosti histidina. Ob prisotnosti genotoksičnega agensa se poveča število mutacij, s tem pa tudi povečuje možnost reverzних mutacij v okvarjenem histidinskem operonu. Takšne mutante lahko ponovno rastejo na gojišču brez dodanega histidina. Ames in sod. so v svoji raziskavi opredelili Ames-ov test kot hitro, enostavno, občutljivo in ekonomično metodo za določevanje karcinogenov, ki povzročijo točkaste mutacije – delujejo neposredno na DNA. Za določevanje posredno induciranih mutacij, npr. preko inhibicije popravljalnih mehanizmov, pa Ames test ni primeren (Ames in sod., 1973). Ames test se z manjšimi izpopolnitvami uporablja tudi za ocenjevanje genotoksičnosti odpadnih voda (DIN 38415-3, 1999) ter v obliki mikrotiterske različice, ki so jo razvili Hubbard in sod. (1984) za ocenjevanje genotoksičnih učinkov kemikalij ob uporabi bakterijskih sevov v tekočem gojišču. Testu, ki so ga razvili Hubbard in sod. (1984), pravimo Ames fluktacijski test.

Kljub temu, da je testiranje z uporabo Ames testa hitro in občutljivo, se pri njegovi uporabi kažejo nekatere pomanjkljivosti. Ames test je neprimeren za uporabo večjega števila vzorcev, poleg tega pa ni dovolj ustrezen za ocenjevanje tveganja v okolju in pri ljudeh.

V uporabi so tudi testi *in vitro* za različne celične linije, s katerimi odkrivamo genske mutacije preko različnih genskih lokusov. Kljub temu, da je na voljo več testov z različnimi lokusi, se za odkrivanje mutacij pogosteje uporabljajo mutacije genov za zapis fosforiboziltransferaze, timidin kinaze (TK) in Na/K ATPaze.

### 3.2.2 Testi za odkrivanje kromosomskih mutacij

Kromosomske mutacije pomenijo strukturno spremembo kromosomov (strukturne kromosomske mutacije) oziroma njihovo spremenjeno število, ki je posledica nepravilne segregacije kromosomov pri celični delitvi (numerične kromosomske mutacije). Citogenetske učinke lahko proučujemo *in vivo* na živalih ali pa *in vitro* na celicah.

Test kromosomskih mutacij v kulturi celic je široko uporabljen že vrsto let in je bil dokazan kot zelo uporaben in visoko občutljiv za odkrivanje klastogenih snovi. Klastogene snovi so genotoksini, ki imajo genotoksičen učinek na strukturo kromosomov, običajno gre za pridobitve, izgube ali preureditve dela kromosoma. Poškodbe kromosomov celic, ki so bile izpostavljene genotoksični snovi, so vidne z mikroskopsko analizo kromosomov v metafazi celične delitve (F1). Test lahko poteka v metabolno aktivnih ali neaktivnih celicah (Galloway, 2000).

*In vitro* test mikrojedr ali mikronukleusni test so razvili kot alternativo testa kromosomskih mutacij (Miller in sod., 1998). Mikrojedrni test se uporablja za odkrivanje poškodbe kromosomov oziroma poškodbe delitvenihstruktur (npr. delitveno vreteno, topoizomeraze), ki jih inducirajo kemikalije (Schmid, 1973). Mikrojedra so majhni delci, ki vsebujejo acentrično nameščene fragmente kromosomov ali pa celotne kromosome, ki so zaostali v anafazi celične delitve (F2). Po končani telofazi se ti fragmenti ne vključijo v jedro hčerinske celice in tvorijo enega ali več mikrojedr v citoplazmi. Test mikrojedr je v primerjavi s testom kromosomskih mutacij lažje in hitreje izvedljiv, nedavno pa je bil ocenjen kot zanesljiva zamenjava za test kromosomskih mutacij (Corvi in sod., 2008).

### 3.2.3 Test za odkrivanje poškodbe DNA in celični odziv na poškodbo

Poškodba DNA je primarno zgodnji indikator zmožnosti neke snovi za vezavo na DNA, kar pa ne pomeni, da sevedno obdrži kot mutacija ali kromosomska mutacija. Zato je bilo za zaznavanje poškodb DNA in določanje sposobnosti vezave snovi na DNA v populaciji celic razvitih veliko testov in eksperimentalnih tehnik na sesalskih celicah. Najpomembnejše med njimi so meritve DNA-aduktov in modificiranih baz ter meritve preloma DNA-verig.

Merjenje DNA-aduktov in modificiranih baz temelji na uporabi protiteles za odkrivanje specifičnih aduktov, kot so O<sup>6</sup>-metilgvanin in O<sup>6</sup>-etilgvanin, 7-metilgvanin, N<sup>6</sup>-metiladenin, za odkrivanje obsežnejših aduktov, kot so N-2-acetilaminofluoren in benzo(a)piren diolepoksid (BPDE angl. benzo(a)pyrene diolepoxide), ter za odkrivanje modificiranih baz, kot so ciklobutan pirimidinski dimeri (Baan in sod., 1985).

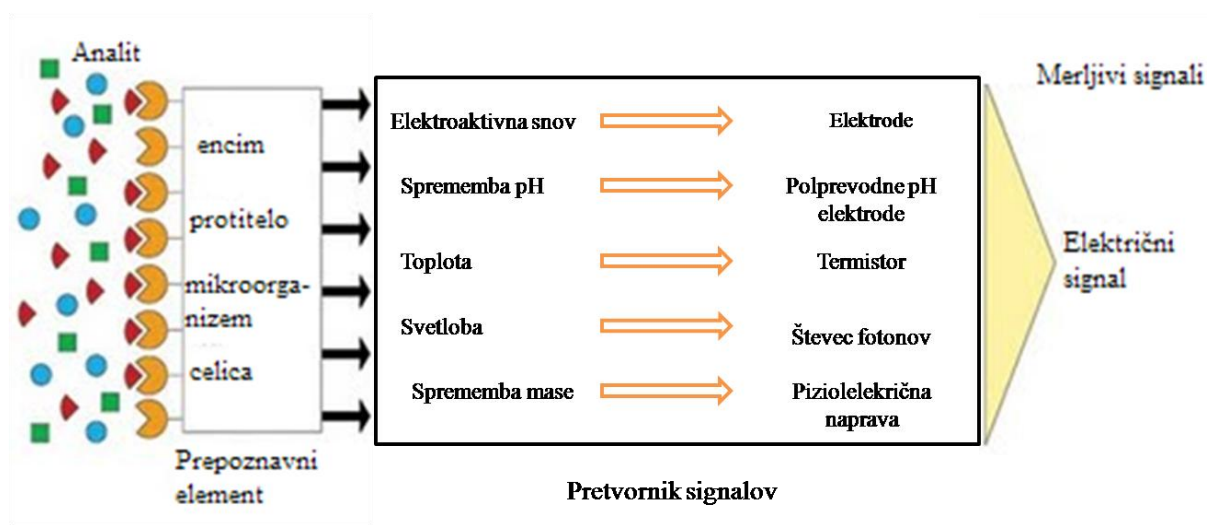
Kometni test ali gelska elektroforeza posameznih celic (SCGE angl. single-cell gel electrophoresis) se uporablja za zaznavo poškodb DNA v katerikoli sesalski celici, ki je bila izolirana iz kateregakoli tkiva ali organa. Kometni test sta leta 1984 razvila Östling in Johanson (1984).

### 3.3 DEFINICIJA BIOSENZORJEV IN NJIHOVA UPORABA

Začetek zgodovine in razvoja biosenzorjev sega v obdobje med letoma 1956–1962, ko je t. i. »oče biosenzorjev« Leland C. Clark razvil encimske elektrode za merjenje koncentracije kisika v krvi, vodi in drugih tekočinah ter prvič opisal biosenzorje (Clark in Lyons, 1962). Od takrat dalje se je razvoj aktivno širil v smer bolj sofisticiranega, zanesljivega in zrelega biosenzorskega sistema ter njegovo aplikacijo na področjih okoljske zaščite, preverjanja kakovosti hrane, agrikulture, vojske (bioterrorizem), medicine in farmacije.

Splošno gledano, se izraz »biosenzor« nanaša na kakršen koli sistem, ki lahko s pomočjo komponente biološkega izvora, ki služi kot pretvornik signalov, zazna prisotnost neke snovi – substrata (Gu in sod., 2004).

Tradicionalno gledano, lahko »biosenzor« definiramo kot bioanalitično napravo, ki vključuje material biološkega izvora (encime, protitelesa, nukleinske kisline, celične organele, celice) opredeljen kot prepoznavni element ali bioreceptor. Ta je povezan s pretvornim sistemom (transduktorjem). Pretvornik obdela signal, ki se tvori ob interakciji prepoznavnega elementa z analitom. Princip odkrivanja biosenzorja temelji na specifičnih interakcijah med proučevanim analitom in prepoznavnim elementom. Ob njihovi specifični vezavi pride do sprememb v eni ali več kemično-fizikalnih lastnosti (pH, razporeditev elektronov, temperatura, masa, optične lastnosti, ipd.). Te spremembe zazna in izmeri pretvornik (Velasco-García in Mottram, 2003), ki je odgovoren za preoblikovanje biokemičnega signala, posredovanega od prepoznavnega elementa, v električni signal, ki ga je mogoče izmeriti. Pretvornik je lahko optični, elektrokemični, termični, električni ali magnetni. Namen biosenzorjev je predvsem produkcija diskretnih ali ponavljajočih se signalov, kar pa je proporcionalno številu analitov (Soper in sod.,2006).



**Slika 1: Princip delovanja biosenzorjev** (prirejeno po <http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/biosensor.html>)

Biosenzorski sistemi ponujajo mnoge prednosti kot alternativo klasičnim analitičnim metodam zaradi njihove specifičnosti, visoke občutljivosti in hitrega odzivnega časa (Belkin, 2003; Velasco-Garcia in Mottram, 2003). Zaradi teh lastnosti imajo biosenzorski sistemi kratek čas izvedbe, omogočajo analizo širokega spektra snovi ter so cenovno ugodni. Pomembno prednost predstavlja tudi zmožnost odkrivanja le biološko aktivnih onesnaževalcev, njihov odziv pa je proporcionalen stopnji toksičnosti (Ron, 2007).

Poročevalskiali biosenzorski sistemi imajo tudi nekaj pomanjkljivosti. Zaradi odvisnosti od biološkega sistema so testi slabše ponovljivi kot testi, merjeni s klasičnimi kemijskimi metodami, dobljene vrednosti pa so ponavadi relativne in ne absolutne. Poleg tega so biološki materiali slabše stabilni v razmerah, ki se gibljejo pod ali nad optimalnimi, kar je lahko vzrok za relativno počasno komercializacijo biosenzorskih sistemov.

### 3.4 VRSTE BIOSENZORJEV

Biosenzorji so lahko razvrščeni glede na tip prepoznavnega elementa oziroma glede na tip pretvornika.

Ena izmed razdelitev biosenzorjev temelji na različnih pretvornih elementih. Tako je večina oblik pretvornikov opredeljena glede na metode transdukcije: (1) optične, (2) elektrokemične, (3) masno-občutljive in (4) termične. Večina biosenzorskih sistemov, opisana v literaturi, je elektrokemičnih (Pohanka in Skladal, 2008; Farre in sod., 2009).

Druge razdelitev temelji na tipu prepoznavnega elementa. Prepoznavni element je biološkega molekula (protitelo, encim, protein ali nukleinska kislina) oziroma živ biološki sistem (celica, tkivo ali celotni organizem), ki uporablja biokemijske mehanizme za prepoznavo snovi. Prepoznavna komponenta biosenzorja vsebuje biosenzitivno plast z bioreceptorji ali pa so bioreceptorji kovalentno pripeti na pretvornik. Tako najpogostejše oblike prepoznavnih elementov temeljijo na:

- interakciji protitelesa z antigenom,
- interakciji z nukleinskimi kisljinami,
- interakciji z encimi,
- celičnih interakcijah (celica- celična struktura) in
- interakciji z uporabo biomimetskega materiala (sintetični bioreceptorji).

V grobem lahko katalitske biosenzorje razdelimo tudi na molekularne biosenzorje (uporaba biološke molekule – protitelo, nukleinska kislina, encim, ionski kanalček), na celične

biosenzorje in na tkivne biosenzorje. Pri slednjih dveh gre za vključitev izolirane celice ali tkiva iz širokega spektra rastlinskih ali živalskih vrst (Pancrazio in sod., 1999).

Biosenzorji, ki jih razdelimo na podlagi tipa prepoznavnega elementa, se najpogosteje uporabljajo kot okoljski biosenzorji, ki predstavljajo pomemben preboj za spremljanje polutantov v onesnaženih okoljih zaradi njihove sposobnosti merjenja interakcije specifičnih sestavnih delov z biološkim sistemom preko visoko občutljivih (bio)prepoznavnih procesov (Keane in sod., 2001). Definirani so kot sistem monitoringa, ki temelji na uporabi bioloških organizmov oziroma bioloških reakcij. Najbolj so za spremljanje okolja in okoljske analize organskih polutantov primerni celični bioreceptorji, encimski bioreceptorji, imunosenzorji in DNA-biosenzorji.

Za raziskave, aplicirane na gensko toksikologijo, toksikologijo in monitoring okolja, so najpomembnejši biosenzorji, ki so klasificirani po tipu prepoznavnega elementa.

### **3.4.1 Encimski biosenzorji**

Encimi, ki so glavna komponenta encimskih biosenzorjev, so primerni prepoznavni elementi zaradi združevanja visoke kemične specifičnosti ter s tem povezane ojačitve biokatalitičnega signala. Uporaba encimov kot bioreceptorjev je bila nadvse popularna v začetni fazi razvoja biosenzorjev zaradi njihove komercialne dostopnosti. Primer dobro poznanega encimskega biosenzorja je biosenzor z glukozno oksidazo, kjer je slednja pripeta na površino amperometrične kisikove elektrode. Tako sestavljen biosenzor nam omogoči neposredno merjenje koncentracije glukoze v proučevani snovi (Clark in Lyons, 1962).

Mnogi encimi imajo v živi celici vlogo celičnega signaliziranja in so pogosta tarča delovanja analitov, kar lahko izkoristimo za razvrstitev encimskih biosenzorjev na dve skupini:

- encimski biosenzorji, ki merijo inhibicijo specifičnega encima glede na prisotnost določenega analita, in
- encimski biosenzorji, ki zaznajo katalitično transformacijo določenega analita ob delovanju specifičnega encima.

Večina pretvornikov, povezanih v encimskih biosenzorjih, je elektrokemičnega tipa – amperometrični in potenciometrični pretvornik. Glavna prednost elektrokemičnih pretvornikov je nizka cena elektrod, njihova visoka stopnja obnovljivosti ter možnost enkratne uporabe. Do omejitve amperometričnih meritev pride zaradi možnosti interference signalov, kadar so v vzorcu elektroaktivne snovi (Farre in sod. 2009).

### **3.4.2 Imunosenzorji**

Imunosenzorji so biosenzorji, osnovani na afiniteti do liganda. So polprevodniške naprave, v katerih je imunokemijska reakcija vezana na pretvornik. Temeljna podlaga vseh imunosenzorjev sta specifičnost protiteles za prepoznavo antigenov in tvorba stabilnih kompleksov. Imunosenzorje lahko razdelimo glede na princip odkrivanja signalov, torej na elektrokemične, optične in mikrokavimetrične imunosenzorje. Povezava antigenov z elektrokemičnimi in optičnimi senzorji omogoča določanje koncentracije analita v realnem času, pri tem pa ni potrebno dodajanje reagentov (Scheller in sod.,2001).

Pri nekaterih vrstah imunosenzorjev, kjer je za določitev koncentracije potrebno dodajanje reagentov pred posamezno meritvijo, govorimo o t.i. tradicionalnih imunotestih, kot so encimskoimunski test (ELISA angl. enzyme linked immunosorbant assay), kolorimetrični testi za preverjanje nosečnosti (angl. colorimetric »pregnancy« test strips) ipd. Tak tip biosenzorjev združuje enofazne imunske teste s fizikalno-kemičnimi prevodnimi elementi (elektrokemični, optični, piezoelektrični).

Raziskave, ki potekajo v smeri razvoja novih imunotestov in imunosenzorjev brez potrebe po reagentu, so osnovane na rekombinacijskih tehnologijah, ki dopuščajo sklopitev poročevalske molekule s proteinom, pri čemer nastane biosenzor na osnovi fluorescenčnega proteina. Prvič sta tak biosenzor opisala Giuliano in Taylor (1998). Fluorescenčni protein lahko preko konformacijske spremembe ob vezavi z ligandom tvori signal, fluorescenco.

### 3.4.3 DNA-biosenzorji

DNA-biosenzorji ali genosenzorji so v primerjavi z naprednimi encimskimi senzorji, imunosenzorji in mikrobnimi biosenzorji le malo raziskani. Struktura DNA je zelo občutljiva na prisotnost in delovanje različnih polutantov, zato se njihovo delovanje pogosto izraža v nastanku mutacij in karcinogenezi. Za ugotavljanje genotoksičnih učinkov onesnaževalcev na DNA je potrebna uporaba DNA-biosenzorjev pri izvajanju genotoksičnih testov. S tem je diagnosticiranje hitrejše, kar je zelo pomembno v odkrivanju rakavih obolenj (Scheller in sod., 2001).

DNA-biosenzorji, ki temeljijo na nukleinski kislini, predstavljajo obetaven pripomoček za analizo genskih zaporedij ter za odkrivanje mutacij (Jayarajah in Thompson, 2002). Metodologija temelji na hibridizaciji znanih enoverižnih DNA-sond s komplementarnim zaporedjem na DNA v testiranem vzorcu. Princip pretvorbe je optična zaznava fluorescenčno označenega oligonukleotida. Paralelno analizo večjega števila DNA-odsekov nam omogočajo matrične tehnike s pomočjo DNA-čipov oziroma bio-čipov.

Z DNA-senzorji lahko gensko informacijo uporabimo kot novo, zanesljivo in cenovno ugodno orodje za odkrivanje bolezni v kliničnih raziskavah (Drummond in sod., 2003).

### 3.4.4 Celični biosenzorji

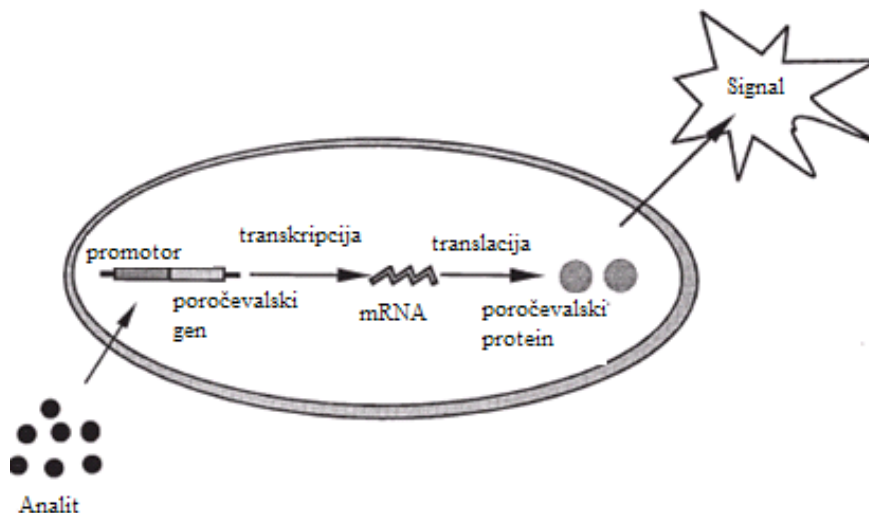
Biološke celice so z membrano obdane strukture, v kateri so visoke koncentracije encimov, nukleinskih kislin, ionov, lipidov, oligosaharidov, proteinov in veliko število majhnih organskih molekul. Tako struktura kot kemična kompleksnost celic nudita visoko občutljivost za širok spekter snovi. S posameznimi tipi celic lahko zasledimo določeno skupino fizikalno-kemičnih ali bioloških sprememb, ki nastanejo ob odzivu celice na specifično skupino kemikalij.

Glavni izziv pri izkoriščanju žive celice za biosenzorski sistem je doseganje selektivne transdukcije specifičnega biokemijskega procesa v kompleksu biokemijskih celičnih



procesov. Pri občutljivosti in specifičnosti določene celice za specifično kemikalijo pride do variacij, ki so odvisne od tipa, vira in okolja celice ter od same narave kemikalije.

Biosenzorji, ki so sestavljeni iz mreže oziroma plasti nepoškodovanih bioloških celic kot detekcijski ali merilni element, so splošno znani kot celični biosenzorji (Turner in sod., 1987). Kadar so biosenzorji razviti z namenom okoljskega monitoringa onesnaževalcev, senajpogosteje kot del celičnega biosenzorskega sistema uporabljajo mikroorganizmi. Polutanti lahko aktivirajo metabolne poti mikroorganizma ali pa sprožijo nespecifični celični stres, kar se odraža v izražanju enega ali večih genov (Belkin in sod., 1997). Ker se mikroorganizmi različno odzovejo na različne spremembe okolja so uporabni pri ekotoksikoloških testih ter pri spremljanju onesnaženosti okolja, v katerem je narava toksinov in onesnaževalcev nenapovedljiva. Mikroorganizmi so v tehnologiji biosenzorjev cenovno zelo ugodni in enostavni za vzdrževanje (Gu in sod., 2004). Bakterijski celični biosenzorji producirajo merljive produkte genov, ki jih zapisujejo poročevalski geni. Za poročevalske gene lahko uporabimo gene, ki so naravno prisotni v bakterijah ali pa so bili z gensko manipulacijo vneseni v bakterijski genom (Sørensen in sod., 2006). Kot celični biosenzorji se lahko uporabljajo tudi evkariontske celice kvasovk, rastlin in živali, ki pa bodo opisane v naslednjih poglavjih.



**Slika 2: Teorija merjenja s celičnim biosenzorskim sistemom** (prirejeno po Köhler in sod., 2000: 770)

## 3.5 CELIČNI BIOSENZORSKI SISTEM NA OSNOVI TEHNOLOGIJ POROČEVALSKIH GENOV

### 3.5.1 Poročevalski proteini

Kvantifikacija poročevalskih molekul posredno zagotavlja informacije o dejavnosti testiranega vzorca in lahko poteka preko odkrivanja dejavnosti mRNA (angl. messenger RNA), poročevalskih proteinov ali pa preko merjenja encimske aktivnosti v odvisnosti od poročevalskih proteinov. Funkcija poročevalca je produkcija merljivih signalov, ki nastajajo ob odzivu na testiran analit ali skupino analitov. Pri uporabi biosenzorskih sistemov se primarno uporabljajo geni, kot je bakterijska luciferaza (*lux*), žuželčja luciferaza (*luc*) ter iz meduze izolirana proteina aequorin in zeleni fluorescenčni protein (GFP angl. green fluorescent protein). Izražanje omenjenih genov lahko ob prisotnosti genotoksičnih snovi zaznamo z merjenjem luminiscence, fluorescence ali absorbance.

#### 3.5.1.1 Zeleni fluorescenčni protein (GFP)

Zeleni fluorescenčni protein lahko najdemo pri večini ožigalkarjev, prvič pa je bil kloniran iz bioluminiscentne meduze *Aequorea victoria* (Prashera in sod., 1992), za raziskovanje genske ekspresije ter dinamike in lokalizacije proteinov (Tsien, 1998). GFP je enoverižni polipeptid sestavljen iz 238 aminokislin in je edinstven med svetlobo-oddajajočimi proteini. Zaradi avtokatalitičnosti ne potrebuje prisotnosti kofaktorjev, substratov ali celične energije za oddajanje fluorescence. GFP je odporen proti povišano temperaturo, nihanja pH, prisotnost soli, organska topila in na širšinabor proteaz (Ehrmann in sod., 2001). Ko je protein izdelan, je lahko obstojen tudi več ur, njegovo fluorescenco pa je možno zaznati tudi po celični smrti (Keane in sod., 2001).

V kristalni strukturi proteina najdemo centralno nameščene kromofore, v t.i.  $\beta$ -sodčku podobnih košarah (angl.  $\beta$ -can) (Ormo in sod., 1996), ki zagotovijo primerno okolje za delovanje kromofor oziroma preprečijo dostop topil in kisika (Arun in sod., 2005). V preteklosti je bil GFP velikokrat uporabljen za določevanje lokalizacije in prostorske dinamike določenih proteinov, ki so bili sklopljeni z GFP, saj lahko take sklopljene proteine

sledimo v živih celicah s pomočjo fluorescenčne mikroskopije (Jakobs in sod., 2000). Pretekle raziskave so pokazale, da lahko GFP tvori zeleno fluorescenco v različnih organizmih, v bakterijah, glivah ter v rastlinskih in sesalskih celicah (Cubitt in sod., 1995).

V zadnjem desetletju so razvili kar nekaj mutant proteina GFP. Prav takšna mutanta je ojačan zeleni fluorescenčni protein ali EGFP (angl. enhanced green fluorescent protein), ki nosi mutacijo kromofore, zaradi česar pride do povišanja ekscitacijskega vrha na 488 nm, s čimer se ojača intenziteta fluorescence (Zhang in sod., 1996). Razvoj EGFP je omogočil njegovo uporabo za hitro odkrivanje genotoksičnih lastnosti (Hastwell in sod., 2006; Žager in sod., 2010).

Destabiliziran EGFP (dEGFP angl. destabilized EGFP) je modificirana oblika EGFP-proteina, ki omogoča hitro pretvorbo v sesalskih celicah. Leta 2005 so Arun in sod. v okviru raziskave razvili dEGFP, ki je nastal z združitvijo zapisa za EGFP z odsekom nukleotidnega zaporedja mišje ornitin dekarboksilaze (MODC angl. mouse ornithine decarboxylase). Pri tem so ugotovili, da so intenziteta fluorescence in spektralne lastnosti dEGFP enake izvorni EGFP kromofori, razpolovna doba pa je za polovico skrajšana (1–4 ure) (Arun in sod., 2005). Skrajšana razpolovna doba je posledica zaporedja aminokislinskih baz PEST (prolin (P), glutaminska kislina (E), serin (S), treonin (T)) v nukleotidnem zaporedju MODC (Li in sod., 1998). PEST zaporedje deluje kot proteolitični signal, s čimer pride do hitre degradacije proteina (Rechsteiner in Rogers, 1996). Različice dEGFP se uporabljajo za natančno določitev kinetike promotorske aktivacije oziroma za trenutno prepisovanje proteina, s katerim je poročevalec dEGFP sklopljen (Arun in sod., 2005).

### 3.5.1.2 Rdeči fluorescenčni protein (DsRed)

DsRed (angl. red fluorescent protein) je izoliran iz korale vrste *Discosoma sp.* in je kot alternativa proteina GFP komercialno že v rabi, saj ima, kot so dokazali Baird in sod. (2000), višji ekstinkcijski koeficient in večje kvantno polje, hkrati pa je odporen proti pH-ekstremom in barvnem bledenju v primerjavi z dosedaj objavljenimi in uporabljenimi poročevalskimi proteini. DsRed ima ekscitacijski vrh pri 558 nm, emisijski maksimum pa pri 583 nm (Baird in sod., 2000; Jakobs in sod., 2000). Z razvojem mutant, kot so DsRed-

Timer (Terskikh in sod., 2000), DsRed2 (Yanushevich in sod., 2002) in hitro zoreči DsRed-Express (Bevis in Glick, 2002), se je uporaba aplikativnih metod, ki vključujejo fluorescenčne proteine močno povečala, predvsem v celični biologiji (Verkhusha in sod., 2003). Predhodne raziskave, ki so prikazale biokemijske in fotofizikalne lastnosti proteina DsRed, so ga označile kot primerne za uporabo v *in vivo* aplikacijah (Baird in sod., 2000; Terskikh in sod., 2000).

DsRed je homomerni tetramer z velikostjo 28-kDa, ki ima tako kot GFP centralno nameščeno kromoforo v strukturi  $\beta$ -sodčka. Zaporedje aminokislin polipeptidne verigesev 23% ujema z zaporedjem polipeptida GFP (Verkhusha in sod., 2003), prav tako pa sta si strukturno podobni kromofori (Baird in sod., 2000; Verkhusha in sod., 2003). Jakobs in sod. (2010) so na sevu *E.coli* primerjali EGFP in DsRed. Na podlagi rezultatov raziskave so ugotovili, da je DsRed v primerjavi z EGFP počasi zoreč, saj je prišlo do indukcije EGFP že po 4 urah inkubacije celic, medtem ko so DsRed zaznali šele po 20 urah inkubacije.

### 3.5.2 Uporaba poročevalskih genov v genski toksikologiji

Geni, ki jim lahko izmerimo fenotipsko lastnost in se ta razlikujemo od ozadja endogenih proteinov pravimo poročevalski geni (Naylor, 1999). V splošnem imajo poročevalski geni prednost nizke aktivnosti v ozadju celice ter hkratno ojačanje signala iz celične površine oziroma njene okolice. Poročevalci se pogosto na signal močno odzovejo (visoka občutljivost), s čimer tvorijo signal, ki ga lahko hitro in dobro zaznamo. Izbira poročevalskega proteina je odvisna od same celične linije, uporabljene v eksperimentu, od narave eksperimenta ter od prilagajanja testa primerni detekcijski metodi (povzeto po Naylor, 1999).

Najpogosteje uporabljeni so bakterijski sistemi, pri katerih so genotoksični učinki identificirani na podlagi sprememb v izražanju SOS-odzivnih genov. Leta 1997 so Vollmer in sod. (1997) opisali poročevalski sistem, ki je omogočil odkrivanje subletalnega delovanja snovi, ki poškodujejo DNA. Pri tem poročevalskem sistemu gre za sklopitev treh promotorjev genov, ki sodelujejo v popravljalnih mehanizmih DNA *E.coli* (*recA*, *uvrA*, *alkA*), na operon *luxCDABE* *Vibria Fischeri*. Podoben test, ki temelji na SOS-odzivnih genih, je

VITOTOX<sup>®</sup> test, kjer je promotor gena *recN* bakterije *E. Coli* sklopljen z operonom *lux* bakterije *V. fischerii* ter nato vstavljen v genom *S. typhimurium* (Van der Lelie in sod., 1997). Uporaba prokariotskih testov, ki so osnovani na SOS-odzivnih genih, je v farmacevtski industriji omejena in se v zadnjem času usmerja predvsem v monitoring okolja (Knight in sod., 2009).

Široko uporabljen je tudi test GreenScreen, ki temelji na kvasovkah *Saccharomyces cerevisiae*. Walmsley in sod. (1997) so leta 1997 uporabili poročevalski gen za GFP, sklopljen s promotorjem *RAD54* (*RAD* angl. recombination and DNA repair). Poškodba DNA inducira prepisovanje s promotorja *RAD54* in s tem tudi s promotorjem sklopljenega gena za GFP. Količino izraženega GFP lahko kvantitativno izmerimo z meritvijo intenzitete fluorescence. Podoben test, ki temelji na sevu kvasovk SKAM4, je RadarScreen, kjer je poročevalski gen  $\beta$ -galaktozida ( $\beta$ -*GAL*). Poročevalski gen se prepíše pod vplivom promotorja *RAD54*, ki je aktiviran ob poškodbi DNA, kadar se DSBs popravljajo s homologno rekombinacijo (Westering in sod., 2010).

V sesalskih celicah so najpomembnejše poti celičnih odzivov na DNA-poškodbo ob aktivaciji tumor supresorja in transkripcijskega faktorja p53 preko fosforilacije na poškodbo DNA odzivnih kinaz (Zhou in Elledge, 2000). Aktiviran p53 inducira izražanje genov, vključenih v popravljalne mehanizme DNA, zaustavitev celičnega cikla oziroma apoptozo (Sionov in Haupt, 1999). V preteklih letih je bilo opisanih kar nekaj genotoksičnih testov, pri katerih se za določanje genotoksičnih poškodb uporabljajo sesalske celice in na poškodbo DNA odzivni geni pod uravnavo tumor supresorja p53 (Todd in sod., 1995; Hastwell in sod., 2006; Žager in sod., 2010). Todd in sod. (1995) so prvi izkoristili gene, ki so vključeni v odziv poškodbe DNA in so pod uravnavo promotorja p53 (*p53R2*, *GADD45a*, *GADD153*) za izdelavo poročevalca z zapisom za kloramfenikol acetil transferazo (*CAT* angl. chloramphenicol acetyl transferase), ki so ga stabilno vnesli v celice jetrnega karcinoma HepG2. Gen *P53R2* ima zapis za podenoto ribonukleotidne reduktaze (Tanaka in sod., 2000), geni *GADD* (*GADD* angl. growth arrest and DNA damage) pa se izrazijo kot odziv na okoljski stres, ki vključuje poškodbe DNA in povzroči zaustavitev celičnega cikla v prehodih med fazami G1/S oziroma G2/M (Siafakas in Richardson, 2009). Leta 2006 so Hastwell in sod. razvili testni sistem, kjer izražanje poročevalskega proteina EGFP

uravnavajo elementi genov *GADD45a*, vnešeni v limfoblastoidno celično linijo TK6, ki izraža aktiven protein p53. Testni sistem je poznan kot GreenScreen HC (HC angl. human cell-based) in je po Birell in sod. (2010) ter Mizota in sod. (2011) občutljiv, visoko specifičen in natančen ter pomembno orodje za hitro določanje potencialno genotoksičnih agensov za ljudi. Pred kratkim so Žager in sod. (2010) razvili hiter testni sistem, za testiranje genotoksičnosti širokega spektra toksičnih snovi, ki temelji na celicah jetrnega karcinoma HepG2. V celice HepG2 so vstavili zapis za EGFP, ki je uravnavan s promotorjem *p21*. Ob poškodbi DNA je prišlo do povečanega izražanja *p21* ter s tem posledično do povečanega nastanka poročevalskega proteina.

Nedavne raziskave so pokazale, da sta gena *GADD45* in *GADD153* relativno nespecifična in da njuno izražanje in odziv povzročijo tudi karcinogeni, ki niso genotoksični, zato se jih ne smatra za specifične pokazatelje genotoksičnosti (Ellinger-Ziegelbauer in sod., 2005).

### **3.5.3 Uporaba tumor supresorja p21 kot biomarkerja za odkrivanje genskih poškodb**

Celična usoda je kontrolirana z delitvijo, diferenciacijo in celično smrtjo. Ravnotežje med njimi je določeno preko negativne in pozitivne regulacije tumor supresorskih genov in proto-onkogenov. Tumor supresorji v normalnih razmerah zavirajo formacijo in razvoj tumorja, zato lahko ob njihovem nepravilnem izražanju in delovanju pride do nenadzorovane rasti rakavih celic. Funkcija tumor supresorjev je prizadeta z genskimi mutacijami, izgubami kromosomskih regij ali z utišanjem genov ob metilaciji promotorja. Tumor supresorski geni so pomembne tarče pri iskanju novih kliničnih terapij, ki temeljijo na obnovi delovanja tumor supresorskega gena (povzeto po Martinin sod., 2008).

Znano je, da je v sesalskih celicah najpomembnejša pot odziva na poškodbe DNA-aktivacija tumor supresorja p53 prek fosforilacije s kinazami, ki jih aktivira poškodba DNA. Aktiviran p53 nato inducira izražanje genov, ki so vpleteni v popraviljanje poškodb DNA, ustavitev celičnega cikla in apoptozo (Zhou in Elledge, 2000). p53 neposredno kontrolira gen z zapisom za protein p21WAF/CIP1 oziroma p21. Macleod in sod. (1995) so prikazali, da je od p53 odvisna uravnava gena *p21* ključnega pomena pri odzivu na poškodbo DNA. Gen *p21* je na kromosomu 6p21.2 in se obnaša kot tumor supresorski gen. Njegova funkcija je

inhibicija od ciklina odvisnih kinaz, predvsem CDK1A ter vezava na jedrni antigen proliferajočih celic (PCNA angl. proliferating cell nuclear antigen). PCNA je pomožni faktor DNA-polimeraze. p21 ima regulatorno vlogo v celičnem ciklu, v S-fazi DNA replikacije in pri popravljanju DNA-poškodb. Aktiviran protein p53 stimulira izražanje *p21*, ki preko negativne regulacije inhibira od ciklina odvisne kinaze med prehodom iz faze G1 v S-fazo ter iz faze G2 v mitozo (Vogelstein in sod., 2000).

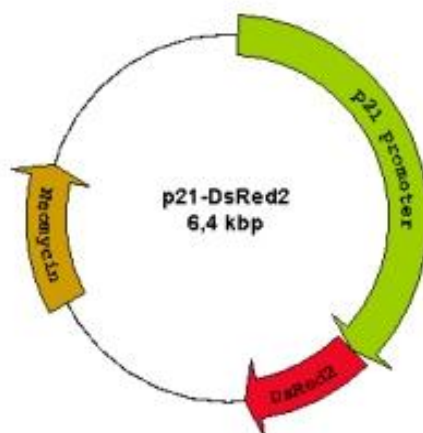
### 3.6 CELIČNA KULTURA HepG2

Celična kultura HepG2 je kultura humanih jetrnih celic, ki je bila prvič izolirana leta 1972 (Aden in sod., 1972) iz primarnega hepatoblastoma 11-letnega dečka iz Argentine. Jetrne celice izločajo in proizvajajo številne encime, ki igrajo ključno vlogo pri čiščenju telesa in biotrasformaciji ksenobiotikov v manj nevarne snovi. Kulture jetrnih celic se zato veliko uporabljajo pri proučevanju metabolizma ksenobiotikov v biomedicinskih raziskavah in genotoksičnih testih.

Primernost uporabe celične linije HepG2 temelji na ohranjenosti mnogih metabolnih funkcij, ki pa se izgubijo pri gojenju primarnih kultur hepatocitov. Najpomembnejša ohranjena funkcija je izločanje velikih plazemskih proteinov (Aden in sod. 1979; Knowles in sod. 1980). Za celično linijo HepG2 je značilno, da so encimi I. faze (citokrom P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B, CYP2E1) in II. faze (glutation S transferaza (GST angl. glutathione-S-transferase), sulfotrasferaza, N-acetiltransferaza, uridin glukuronosiltransferaza) še aktivni in igrajo pomembno vlogo pri aktivaciji in detoksifikaciji mutagenih snovi, ki delujejo na celično DNA (Knausmüller in sod. 2004). Eden najpogostejših modelov *in vitro* je celična linija HepG2 (Wilkening in sod., 2003), ki se je izkazala za odlično orodje pri odkrivanju genotoksičnosti okoljskih in prehranskih kemikalij (Knausmüller in sod. 2004).

#### 3.6.1 Celična linija HepG2p21 DsRed

HepG2p21 DsRed so celice HepG2, ki so stabilno transfecirane z rekombinantnim vektorjem pp21-dsRed, ki ima zapis za poročevalski protein DsRed sklopljen s promotorjem za človeški gen *p21*.



Slika 3: Shema plazmida p21-DsRed2

Za izdelavo plazmida p21-DsRed2 so uporabili promotor *p21*, ki so ga izrezali iz plazmida WWP-LUC (Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, Maryland, ZDA), vir DsRed2 pa je bil plazmid pCLEF35 DsRed2 (Invivogen), z zapisom za rdeč fluorescenčni protein iz vrst *Discosoma*, ki se hitro razvije. Za izdelavo rekombinantnega vektorja s promotorjem *p21* so kot ogrodje uporabili plazmid pEGFP-N1 (Clontech), ki je sesalski ekspresijski vektor. Vanj so vstavili fragment promotorske regije *p21* s prepoznavnim mestom za p53, na katerega so vezali zaporedje za DsRed2. Nastali plazmid so poimenovali pp21-DsRED2 (slika 3). Del plazmida ima tudi zapis za odpornost proti neomicinu/kanamicinu.

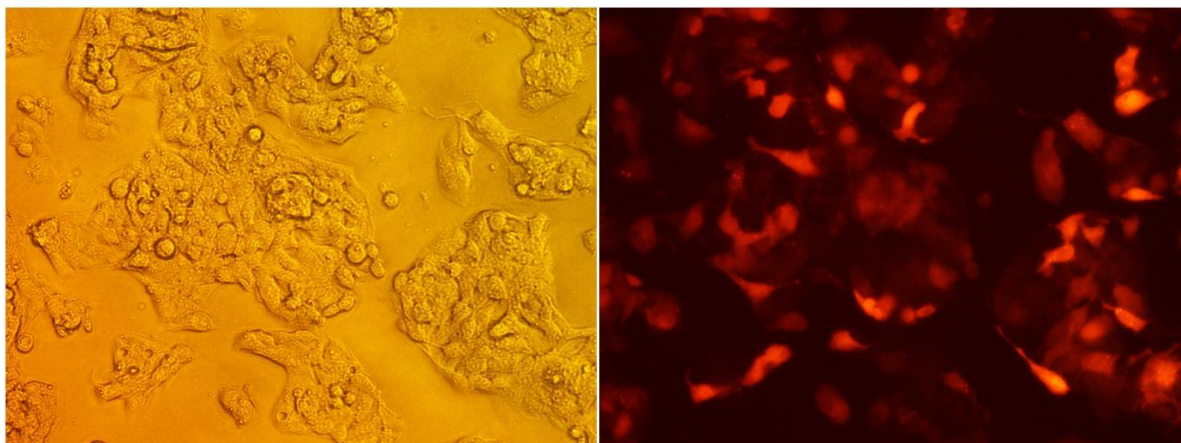
Celice HepG2 so namnožili in jih transfecirali z omenjenim rekombinantnim vektorjem s pomočjo elektroporacije, saj se celice HepG2 podobno kot primarne hepatocite težko transfecira s pomočjo tradicionalnih transfekcijskih metod (povzeto po Čemažar in sod., 2009). S selekcijo z antibiotikom (neomicin, kanamicin) so izbrali stabilno transfecirane kolonije. Izbrane klonove so izpostavili 50  $\mu\text{g/ml}$  MMS, določili citotoksičnost z MTS-testom in indukcijo DsRed normalizirali na gostoto celic. Izmed klonov so izbrali najbolj odzivnega in novo celično linijo poimenovali HepG2p21 DsRed (Patentna prijava P2010000072, Urad RS za industrijsko lastnino).



## 4 MATERIAL IN METODE

### 4.1 CELIČNA KULTURA

Pri praktičnem delu diplomske naloge smo uporabili stabilno transformirano celično kulturo humanega jetrnega karcinoma HepG2p21 DsRed (slika 4). Pripravili so jo na Onkološkem inštitutu Ljubljana, na Oddelku za eksperimentalno onkologijo.



**Slika 4: Celična linija HepG2p21 DsRed, slikana z invertnim mikroskopom po izpostavitvi MMS (40 $\mu$ g/ml) pri 300-kratni povečavi**

### 4.2 GOJENJE CELIC

Celično kulturo HepG2p21 DsRed smo gojili v 25 cm<sup>2</sup> (T-25) oziroma v 75 cm<sup>2</sup> (T-75) platenkah za gojenje celičnih kultur (TPP, Trasadingen, Švica) v gojišču MEM (GIBCO, Invitrogen, Paisley, VB), obogatim z 10 % fetalnim govejim serumom (FBS angl. fetal bovine serum) (GIBCO, Invitrogen, Paisley, VB), z dodatkom 2,4 mg/ml antibiotika geneticina (Neomycin, GIBCO, Invitrogen, Paisley, VB), v inkubatorju s 95 % vlago pri temperaturi 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Celice smo dvakrat tedensko presajali, odlepljali smo jih s podlage z 0,025 % tripsinom (GIBCO, Invitrogen, Paisley, VB).

Celično kulturo netransformiranih celic HepG2 smo gojili tako kot celice HepG2p21 DsRed, le brez dodanega antibiotika geneticina.

### Presajanje in štetje celic

Ko so bile plošče približno 80% preraščene, smo celice presadili. Iz platenke (TPP) smo odstranili gojišče, površino sprali z 1 x fosfatnim pufrom (PBS angl. phosphate buffer saline), ki smo ga nato odstranili in dodali 0,025 % tripsin, ki je bil ogret na 37 °C. Za celice nasajene v T-25 smo dodali približno 2 ml tripsina, za celice nasajene v T-75 pa smo dodali približno 4 ml tripsina. Celice smo inkubirali 3-5 min pri temperaturi 95% vlagi, 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Če je bilo potrebno smo ploščo rahlo pretresli, da so se celice dokončno odlepili od podlage. Nato smo dodali sveže gojišče s FBS (2-kratno količino volumna dodanega tripsina), ki je prekinil delovanje tripsina. Celično suspenzijo smo prenesli v 5 ml epruveto (Coring) in centrifugirali 5 minut pri 1500 obratih/minuto in pri temperaturi 20 °C. Po končanem centrifugiranju smo odpipetirali supernatant, celice resuspendirali v 5 ml svežega gojišča s FBS ter geneticinom (48 µl geneticina/1 ml gojišča) in jih prenesli v novo centrifugirko. Nato smo jih s pomočjo inzulinke brizgalke (Tyco-Healthcare-Kendall, UK) 7-krat potegnili skozi injekcijsko iglo (TIK, d. o. o., Kobarid, SLO). Tako smo dobili suspenzijo bolj ali manj posameznih celic. Nasadili smo jih na ploščo in dodali ustrezno količino gojišča. Celicam nasajenim v T-25 smo dodali 5 ml gojišča, celicam nasajenim T-75 pa 10 ml gojišča.

Kadar smo potrebovali suspenzijo celic z določeno gostoto, smo jih prešteli s pomočjo hemocitometra. 10 µl suspenzije smo nanесли v hemocitometer in prešteli celice v 4 poljih ter preračunali gostoto celic/ml. V primeru da je bila gostota celic visoka, smo celice pred uporabo hemocitometra 10 x redčili v pufru PBS ali gojišču MEM.

### 4.3 TESTIRANE KEMIKALIJE

Za izolacijo in izbiro klonov ter primerjavo pasaž smo uporabili metilmetan sulfonat (MMS angl. methyl methane sulphonate) (Sigma, St. Louis, ZDA). Za validacijo spektrofotometrije smo poleg MMS uporabili še benzo(a)piren (BaP angl. benzo(a)pyrene) (Sigma, St. Louis, ZDA). Za določanje primernosti celičnega biosenzorskega sistema HepG2p21 DsRed smo testirali tudi različne vrste nanodelcev: superparamagnetni železov oksid (SPIONs angl. superparamagnetic iron oxide nanoparticles) (Nanotesla, Ljubljana, SLO) in titanov dioksid (TiO<sub>2</sub> anataz nanometerskih velikosti, TiO<sub>2</sub> rutil nanometerskih velikosti ter TiO<sub>2</sub> anataz

podmikronskih velikosti) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija). Za preverjanje viabilnosti in določevanje stopnje preživetja smo uporabili metode z reagenti Alamar Blue, MTS in MTT.

#### **4.3.1 Metilmetan sulfonat (MMS)**

MMS je genotoksična substanca, ki neposredno inducira alkilacijo DNA-baz in je dobro poznan mutagen in karcinogen za glodavce (Lawley, 1989; Breanek, 1990). Pred nekaj leti sta Jaiswal in Narayan (Jaiswal in Narayan, 2002) poročala, da MMS inducira fosforilacijo proteina p53 ter poveča njegovo afiniteto za vezavo na DNA, s čimer pride do povečanega izražanja *p21*.

#### **4.3.2 Benzo(a)piren (BaP)**

BaP je posreden genotoksični karcinogen, ki ga encim citokrom P450 metabolizira in transformira v BPDE, ki se kovalentno veže na gvanozinske baze v DNA (Perlow in sod., 2002). Izpostavitve celic BaP se kaže kot indukcija aktivacije proteina p53, kar vpliva na regulacijo genov, vključno gena *p21* (Wang in sod., 2003; Sadikovic in Rodenhiser, 2006).

#### **4.3.3 Titanov dioksid (TiO<sub>2</sub>)**

TiO<sub>2</sub> je eden izmed najpogosteje komercialno in industrijsko uporabljenih nanodelcev, predvsem se uporabljajo za pigmente in barvila v industriji, za zaščito pred soncem v kozmetiki, kot aditivi v prehrabeni industriji, kot vezivo v medicini, itn. Njegove največje prednosti za uporabo so netopnost v vodi ter v številnih organskih spojinah, nereaktivnost, visoka stopnja kemične in termične stabilnosti, nevnetljivost ter nizka cena. V naravi najdemo tri polimorfne modifikacije, rutil, anataz ter brukit. Med seboj se razlikujejo po lomnih količnikih, fotokatalitični aktivnosti ter termični stabilnosti. V naravi je najpogostejša oblika rutil TiO<sub>2</sub>, ki je termodinamsko najstabilnejša oblika (Greenwood in Earnshaw, 1997).

Za izvedbo poskusov smo uporabili tri vrste titanovih nanodelcev, ki se razlikujejo po velikosti in obliki, in sicer: TiO<sub>2</sub> anataz nanometerske (~25 nm) (v nadaljevanju TiO<sub>2</sub>-An),

TiO<sub>2</sub> rutil nanometerske (<100 nm) (v nadaljevanju TiO<sub>2</sub>-Ru) ter TiO<sub>2</sub> anataz podmikronske velikosti (~50 μm) (v nadaljevanju TiO<sub>2</sub>-Bulk).

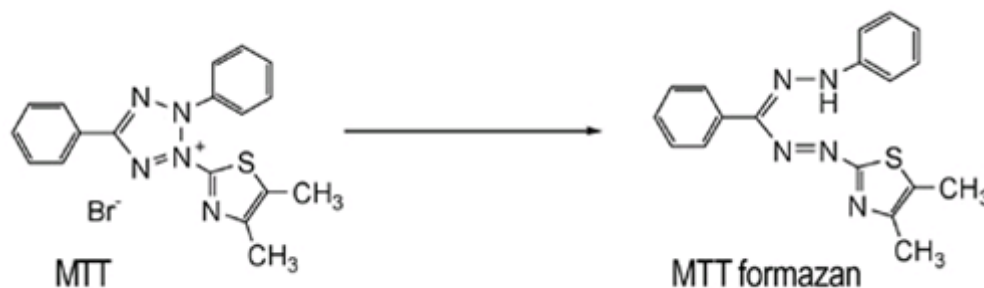
#### **4.3.4 Superparamagnetni železov oksid (SPIONs)**

Nanodelci, sestavljeni iz železa, niklja in/ali kobalta, ki imajo magnetne lastnosti, so magnetni nanodelci (Gubin, 2009). Nekateri nanodelci imajo magnetne lastnosti le ob prisotnosti magnetnega polja. V takem primeru so nanodelci superparamagnetni. Superparamagnetne lastnosti so bile opažene pri nanodelcih železovega oksida, velikosti do 15 nm. Nanodelce, ki so dovolj majhni in kažejo magnetne lastnosti le kadar je magnetno polje prisotno, imenujemo SPIONs. Primarno se magnetni nanodelci uporabljajo v slikovni diagnostiki, uporabljajo pa se tudi v raziskavah za povečevanje učinkovitosti protitumorskega delovanja na SPIONs vezanih protitumorskih zdravil ali plazmidnihDNA (povzeto po Prijic in Serša, 2011).

### **4.4 DOLOČANJE VIABILNOSTI CELIC, CITOTOKSIČNOSTI IN PREŽIVETJA CELIC**

#### **4.4.1 Test MTT**

Test MTT temelji na redukciji MTT tetrazolijevih soli (3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid). Leta 1983 je Mosmann razvil detekcijsko metodo MTT za določevanje viabilnosti in proliferacije sesalskih celic (Mosmann, 1983). Rumena tetrazolijeva MTT-sol se reducira v metabolno aktivnih celicah ob delovanju sukcinat dehidrogenaznih encimov v nevodotopni vijolični formazan (slika 5), ki ga raztopimo v primernem topilu in izmerimo absorbanco, ki je linearno povezana s številom celic.

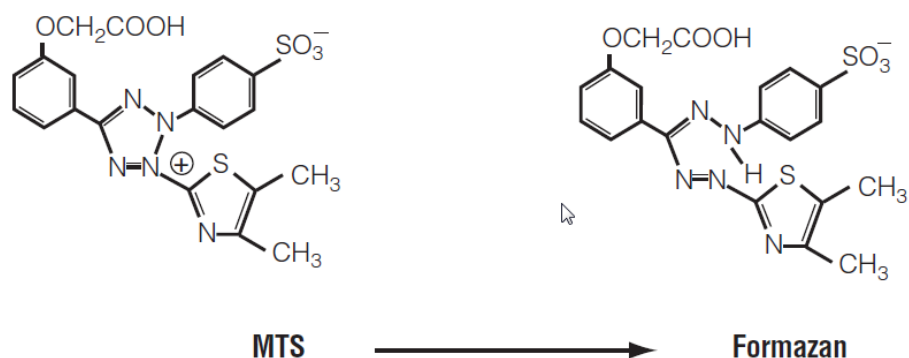


**Slika 5: Struktura MTT tetrazolijeve soli, ki se reducira v MTT-formazan** ([http://www.dojindo.com/home/index.php?page=shop.product\\_details&flypage=flypage.tpl&product\\_id=457&category\\_id=62&option=com\\_virtuemart&Itemid=58](http://www.dojindo.com/home/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=457&category_id=62&option=com_virtuemart&Itemid=58))

Celicam smo po končani inkubaciji z genotoksinom dodali 20  $\mu$ l reagenta MTT (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija) in inkubirali 3 ure. Po končani inkubaciji smo odlili gojišče in ga zamenjali s 100  $\mu$ l dimetilsulfoksida (DMSO angl. dimethyl sulphoxide) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija), v katerem je nastali produkt formazan topen. Ploščo z dodanim DMSO smo stresali 60 sekund ter s pomočjo spektrofluorimetra (Tecan Genios) pomerili absorbanco nastalega formazana pri valovnih dolžinah 570–690 nm.

#### 4.4.2 Test MTS

Reagent MTS je različica reagenta MTT, ki so jo leta 1991 razvili Cory in sod. za hitrejše določanje rasti in viabilnosti celic v celični kulturi (Cory in sod., 1991). Pri MTS- testu nastaja v metabolno aktivnih celicah formazan, ki ga določimo posredno preko absorpcije svetlobe pri valovni dolžini 490 nm. Formazan nastane iz MTS tetrazolijeve soli, kadar so prisotne mitohondrijske dehidrogenaze, živih, metabolno aktivnih celic (slika 6).

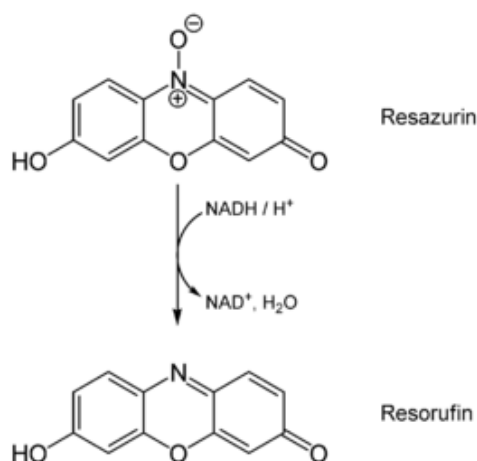


**Slika 6: Struktura MTS tetrazolijeve soli in nastalega produkta, formazana** (prirejeno po Henriques in sod., 2011)

V naši raziskavi smo uporabili različico testa MTS, ki je vključena v kompletu CellTiter96®AQ<sub>ueous</sub> Assay (Promega Corporation, Madison, ZDA). Primerna je za testiranje brezbarvnih substanc, ki ne motijo absorbance, oziroma tistih, ki nimajo delcev, ki sipajo svetlobo. Celicam smo po inkubaciji s kemikalijami dodali 20 µl reagenta MTS (Promega) ter inkubirali 3 ure. Po inkubaciji smo izmerili absorbanco nastalega formazana s spektrofotometrom (Tecan Genios) pri valovnih dolžinah 490–515 nm.

#### 4.4.3 Test Alamar Blue

Pred začetkom uporabe resazurina za merjenje *in vitro* proliferacije sesalski celic, je bil ta test poznan kot »resazurin redukcijski test«, ki je bil v uporabi od leta 1950 za ocenjevanje okuženosti bioloških tekočin in mleka z bakterijami in kvasovkami (O'Brien in sod., 2000). Ko so ga začeli uporabljati za merjenje proliferacije celic, pa so ga poimenovali test Alamar Blue (Alamar Blue® Assay (U.S. Patent No. 5,501,959)). Test združuje fluorimetrično/kolorimetrično zaznavo metabolne aktivnosti celic. Gre za oksido-redukcijske reakcije, pri katerih pride tako do spremembe fluorescence kot spremembe barve reagenta. Ob kemijski redukciji se resazurina reducira v resorufin, posledično pa je spremenjena barva in intenziteta fluorescence (Slika 7).



**Slika 7: Struktura Alamar Blue (moder resazurin), ki ima nizko fluorescenco, ter njegovega produkta (roza resorufin), ki je visoko fluorescenten** (<http://de.wikipedia.org/wiki/Resazurin>)

Z enostavnim testom Alamar Blue smo preverili viabilnost in preživetje pritrjenih celic. Celicam smo po inkubaciji s kemikalijami dodali 10  $\mu\text{l}$  reagenta Alamar Blue (Almar Blue, Invitrogen, VB) ter ponovno inkubirali 75 minut. Po 75-minutni inkubaciji smo s spektrofluorimetrom (Tecan Infinite F200) izmerili fluorescenco pri valovnih dolžinah 560–595 nm.

#### 4.5 SLIKANJE CELIC HepG2p21 DsRed

Celice smo opazovali in slikali z invertnim mikroskopom Olympus IX71 (Olympus, Hamburg, Nemčija), s kamero DP70 (Olympus) in uporabo programa Cell sense (Olympus).

#### 4.6 MERJENJE FLUORESCENCE IN ABSORBANCE

Indukcijo fluorescence poročevalskega proteina DsRed in preživetje celic, po izpostavitvi testiranim kemikalijam smo ugotavljali s spektrofluorimetrom Tecan Infinite F200 (Tecan, Avstrija) s pomočjo programa Magellan. Tecan Infinite F200 je filtrski spektrofluorimeter, uporaben za različne teste, pri katerih lahko opazujemo spremembe v fluorescenci, luminiscenci in absorbanci. Naprava je primerna za merjenje vzorcev namikrotiterskih ploščah s 6 do 384 vdolbinicami in za merjenje vzorcev v kivetah ali v PCR-epruветah.

Za validacijo spektrofluorimetrov smo intenziteto fluorescence merili s spektrofluorimetri Tecan Genios (Tecan, Avstrija), Tecan Infinite M200Pro (Tecan, Avstrija), Victor X5 (PerkinElmer, ZDA) in s hibridom Synergy H4 (Biotek, Winooski, ZDA).

Tecan Genios je filtrski spektrofluorimeter, ki nudi tri pomembne funkcije merjenja, fluorescenco, luminiscenco in absorbanco. Naprava je primerna za branje različnih mikrotitrskih formatov od 6 do 384 vdolbinic na ploščo.

Tecan Infinite M200Pro je monokromatorski spektrofluorimeter, ki meri vzorce na mikrotitrskih ploščah 6-384 vdolbinicami, PCR-epruветah ali kivetah. Meri fluorescenco, absorbanco in luminiscenco.

Victor X5 je filtrski spektrofluorimeter proizvajalca Perkin Elmer, ki lahko zazna spremembe v luminiscenci, fluorescenci in UV-absorbanci. Primeren je za merjenje vzorcev na mikrotitrskih ploščah z 1 do 1536 vdolbinicami, za petrijeve posodice in filtre.

Synergy H4 hibrid je multifunkcijski detektor, ki združuje optična sistema Synergy MX in Synergy 2 v eno napravo. Pri tem monokromatorski optični sistem zagotavlja visoko stopnjo fleksibilnosti merjenja, filtrski sistem pa nudi visoko stopnjo občutljivosti in hitrejše merjenje. S Synergy-em H4 lahko merimo fluorescenco, luminiscenco in absorbanco.

Intenziteto fluorescence poročevalskega proteina DsRed smo merili po ekscitaciji s svetlobo valovne dolžine 535 nm pri valovni dolžini 590 nm. Pri filtrskih spektrofluorimetrih smo



zaradi pomanjkanja filtrov valovne dolžine merjenja nekoliko prilagodili, in sicer smo pri Tecan Genios merili pri valovnih dolžinah 535–595 nm, pri Synergy H4 filtrskemu sistemu pa pri valovnih dolžinah 540–590 nm.

#### 4.7 DOLOČANJE RASTNIH KRIVULJ CELIČNIH LINIJ HepG2 IN HepG2p21 DsRed

##### Postopek:

Rastno krivuljo smo naredili za netransformirano celično linijo HepG2 in za transformirano celično linijo HepG2p21 DsRed. Ponovili smo jo v dveh neodvisnih poskusih.

##### a) Umeritvena krivulja

Celice smo poželi in jih prešteli. Na prozorno mikrotitersko ploščo s 96 vdolbinicami (TPP, Trasadingen, Švica, 96-well) smo nasadili po 100  $\mu$ l celične suspenzije na vdolbinico s koncentracijami celic  $2 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $6 \times 10^3$ ,  $9 \times 10^3$ ,  $12 \times 10^3$ ,  $15 \times 10^3$ ,  $20 \times 10^3$ ,  $25 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^4$ ,  $3,5 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ , v 8 paralelkah. V prvi stolpec plošče smo za slepo kontrolo vnesli le gojišče. Nasajene celice smo inkubirali 2 uri v vlagi, 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Po inkubaciji smo dodali reagent Alamar Blue in ponovno inkubirali 75 minut. Po 75 minutah smo s spektrofotometrom Tecan Infinite F200 pomerili intenziteto fluorescence pri valovnih dolžinah 560 nm in 595 nm. Dobljenim vrednostim intenzitete fluorescence pri različnem številu celic smo odšteli slepo kontrolotako, da smo dobili intenziteto fluorescence, ki je posledica samo redukcije resazurina v resorufin v metabolno aktivnih celicah.

##### b) Rastna krivulja in generacijski čas

Na prozorno mikrotitersko ploščo (TPP) smo nasadili 3000 celic na vdolbinico, kar ustreza  $3 \times 10^4$  celic/ml. Po nasaditvi smo celice inkubirali 2 uri, nato smo v prva dva stolpca, ki ustrezata dnevu 0 (0 ur), dodali Alamar Blue in zopet inkubirali 75 minut. Po inkubaciji smo intenziteto fluorescence pomerili s spektrofotometrom Tecan Infinite F200. Po merjenju smo ploščo z nasajenimi celicami hranili v inkubatorju v vlagi, 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Postopek smo tako v ostalih stolpcih ponavljali naslednje štiri dni, v tem času pa celic nismo presajali ali jim menjali gojišča.

Iz spremembe intenzitete fluorescence ter s primerjanjem z umeritveno krivuljo smo preračunali število celic v posameznem dnevu ter tako določili podvojitveni oziroma generacijski čas posamezne celične linije ter določili rastno krivuljo.

#### Računanje indukcije fluorescence (IF) in razmerja indukcije:

Najprej smo izmerjene vrednosti intenzitete fluorescence pri posamezni testni skupini normirali na negativno kontrolno vrednost intenzitete fluorescence, to smo naredili tako, da smo posamezne vrednosti intenzitete fluorescence testne skupine delili s povprečjem vrednosti negativne kontrolne skupine.

Pri vseh metodah merjenja preživetja, smo od vseh dobljenih vrednosti odšteli slepo kontrolo (samo gojišče), nato pa testne skupine normirali na preživetje negativne kontrole, pri kateri je bilo preživetje 100 %.

Z normiranimi vrednostimi preživetja smo v naslednjem koraku normirali preračunane vrednosti fluorescence, tako, da smo z vrednostmi preživetja delili vrednosti intenzitete fluorescence.

Razmerje indukcije smo dobili tako, da smo IF testnih skupin celic delili z IF kontrolne skupine.

#### 4.8 IZOLACIJA KLONOV CELIČNE LINIJE HepG2p21 DsRed

Z izolacijo in izbiro klonov smo želeli izolirati tiste kolonije celične kulture HepG2p21 DsRed, ki bodo imele bazalno raven fluorescence relativno nizko, ob izpostavitvi genotoksinom pa se bo ta znatno povišala.

Postopek:

## a) Nasajanje in izolacija klonov

Celice smo poželi, prešteli in preračunali število celic, ki smo jih želeli imeti v posamezni vrstici mikrotiterske plošče (preglednica 1). Nato smo naredili redčitveno lestvico celične suspenzije in posamezno redčitev nasadili na prozorno mikrotitersko ploščo (TPP) (preglednica 1), po 100  $\mu$ l suspenzije celic na vdolbinico.

**Preglednica 1: Prikaz nasaditve celic v postopku izolacije klonov**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000 celic/vdolbinico = $1 \times 10^4$ celic/ml											
B	500 celic/vdolbinico = $5 \times 10^3$ celic/ml											
C	250 celic/vdolbinico = $2,5 \times 10^3$ celic/ml											
D	125 celic/vdolbinico = $1,25 \times 10^3$ celic/ml											
E	63 celic/vdolbinico = $6,3 \times 10^2$ celic/ml											
F	31 celic/vdolbinico = $3,1 \times 10^2$ celic/ml											
G	16 celic/vdolbinico = $1,6 \times 10^2$ celic/ml											
H	8 celic/vdolbinico = 80 celic/ml											

Po nasaditvi smo celice gojili v inkubatorju 14 dni brez vmesne presaditve. Odvajali smo le staro in dovajali sveže gojišče.

## b) Izbira in testiranje ustreznih klonov

Na podlagi intenzitete fluorescence in površine kolonije smo izbrali različne klone, jih presadili na prozorno mikrotitersko ploščo s 24 vdolbinicami (TPP, 24-well) ter ponovno inkubirali do 80 % preraslosti površine vdolbinice. Po 80 % preraslosti površine smo kolonije celic presadili na prozorno mikrotitersko ploščo s 6 vdolbinicami (TPP, 6-well). Ko so se kolonije dovolj razrasle, smo jih zopet poželi ter jih nasadili na črno mikrotitersko ploščo s prozornim dnom in 96 vdolbinicami (Greiner BIO-ONE, Nuernberg, Nemčija, 96-well). Tako smo na eni plošči lahko testirali 6 različnih klonov, za 1 klon pa smo porabili dva stolpca

vdolbinic. Pri tem smo na vdolbinico nasadili 30.000 celic, kar ustreza  $3 \times 10^5$  celic/ml. Na vdolbinico smo nasadili 80  $\mu$ l celične suspenzije z ustrežno gostoto celic. Takoj po nasaditvi smo celični suspenziji v vdolbinici dodali 20  $\mu$ l MMS v dveh koncentracijah – 10 in 40  $\mu$ g/ml. Za negativno kontrolo posameznega klona smo štirim vdolbinicam s celično suspenzijo namesto kemikalije MMS dodali gojišče. Tako nasajeno ploščo smo nato inkubirali 48 ur.

Po 48 urah inkubacije smo celice opazovali in slikali z invertnim mikroskopom, nato pa smo s pomočjo spektrofluorimetra Tecan Infinite F200 izmerili intenziteto fluorescence. Po izmerjeni intenziteti fluorescence smo dodali 10  $\mu$ l Alamar Blue v vsako vdolbinico, inkubirali 75 minut in preverili preživetje celic.

Glede na inducirano fluorescenco poročevalskega proteina DsRed smo izbrali klone, pri katerih je bilo končno razmerje indukcije najvišje. Take klone smo presadili na mikrotitersko ploščo s 6 vdolbinicami (TPP). Ko so celice prerasle 80 % površine vdolbinice, smo izbrane klone nasadili na T-25 (TPP) oziroma na T-75 (TPP).

#### 4.9 PRIMERJAVA VREDNOSTI INTENZITETE FLUORESCENCE MED POSAMEZNI MI PASAŽAMI CELIČNE LINIJE HepG2p21 DsRed

##### Postopek:

Primerjava vrednosti intenzitete fluorescence med posameznimi pasažami je potekala podobno kot izolacija klonov. Celice smo poželi, prešteli in jih nasadili na črno mikrotitersko ploščo s prozornim dnom (Greiner BIO-ONE). V vsako vdolbinico smo nasadili 30.000 celic, kar ustreza  $3 \times 10^5$  celic/ml. Na vdolbinico smo nasadili 80  $\mu$ l celične suspenzije z ustrežno gostoto celic. Takoj po nasaditvi smo celični suspenziji v vdolbinici dodali 20  $\mu$ l MMS v dveh koncentracijah – 10 in 40  $\mu$ g/ml. Za negativno kontrolo smo štirim vdolbinicam s celično suspenzijo namesto gojišča z MMS dodali le gojišče. Tako nasajeno ploščo smo nato inkubirali 48 ur.

Po 48 urah inkubacije smo celice opazovali in slikali z invertnim mikroskopom, nato pa smo s pomočjo spektrofleurimetra Tecan Infinite F200 izmerili intenziteto fluorescence. Po izmerjeni intenziteti fluorescence smo dodali 10 µl Alamar Blue v vsako vdolbinico, inkubirali 75 minut, nato pa pomerili preživetje celic.

#### 4.10 VALIDACIJA SPEKTROFLUORIMETROV

S primerjavo in validacijo spektrofleurimetrov smo skušali določiti občutljivost posameznega spektrofleurimetra. Testirali smo 5 različnih spektrofleurimetrov, in sicer (1) Tecan Genios, (2) Tecan Infinite M200Pro, (3) Victor X5 ter Synergy H4 hibrid – (4) filter in (5) monokromator. Pri slednjem je bilo možno merjenje s filtrskim ali monokromatorskim optičnim sistemom, kar smo obravnavali kot dva različna spektrofleurimetra (Synergy H4 filter in Synergy H4 monokromator). Za primerjavo smo uporabili dve kemikaliji v petih koncentracijah: 0, 5, 10, 20, 40 in 50 µg/ml MMS ter 0, 0,05, 0,13, 0,25, 0,50 in 1,26 µg/ml BaP.

##### Postopek:

Celice smo poželi, prešteli in pripravili suspenzijo celic z gostoto  $3 \times 10^5$  celic/ml, kar ustreza 30.000 celic/vdolbinico. Po 100 µl celic smo nasadili v črne mikrotitrne plošče s prozornim dnom (Greiner BIO-ONE). Končni volumen reakcije po dodatku genotoksina je bil 200 µl.

##### a) Priprava redčitvenih lestvic kemikalij in izpostavitve celic

Celice smo izpostavili različnim koncentracijam MMS in BaP. Za vsako kemikalijo smo naredili redčitveno lestvico. Ker je bil končni volumen reakcije 200 µl na vdolbinico, smo pripravili redčitvene lestvice z dvakratno koncentracijo končne, za MMS 10, 20, 40, 80 in 100 µg/ml ter za BaP 0,10, 0,26, 0,50, 1 in 2,52 µg/ml. Koncentracije smo preračunali po formuli (1).

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2 \quad \dots(1)$$

Začetna koncentracija MMS je bila 50 mg/ml, BaP pa 2,523 mg/ml.

Celice smo po nasaditvi brez predhodne inkubacije izpostavili genotoksinoma (preglednica 2). Vsako koncentracijo, slepo in negativno kontrolo smo merili v 5 paralelkah.

**Preglednica 2: Nasaditev in izpostavitve celic različnim koncentracijam MMS in BaP**

MMS (metilmetan sulfonat), BaP (benzo(a)piren)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		Slepa kontrola					Slepa kontrola					
B		Negativna kontrola					Negativna kontrola					
C		5µg/ml					0,05µg/ml					
D		10µg/ml					0,13µg/ml					
E		20µg/ml					0,25µg/ml					
F		40µg/ml					0,50µg/ml					
G		50µg/ml					1,26µg/ml					
H		<b>MMS</b>					<b>BaP</b>					

Celice smo inkubirali 24, 48 in 72 ur v vlagi, 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Po 24-, 48- in 72-urah smo pomerili intenziteto fluorescence z omenjenimi spektrofluorimetri.

#### 4.11 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV

##### 4.11.1 Superparamagnetni železov oksid

Za testiranje superparamagnetnih železovih nanodelcev, prevlečenih s poliakrilno kislino (SPIONs-PAA), polietilamina (PEI angl. polyethyleamine) (Nanotesla, Ljubljana, SLO) in DNA (pEGFP N1 CMV) (Onkološki inštitut, Eks. onkologija, Ljubljana, SLO) smo uporabili izoliran klon F5, ki je kazal najvišjo indukcijo fluorescence po izpostavitvi 10 in 40 µg/ml MMS. Poskus smo ponovili v petih neodvisnih ponovitvah.

##### Postopek:

###### a) Nasaditev celic

Celice smo poželi, jih prešteli in preračunali na željeno gostoto celic  $3,33 \times 10^5$  celic/ml. Po 90 µl celične suspenzije na vdolbinico smo nasadilina črno mikrotitersko ploščo s prozornim dnom (Greiner BIO-ONE) v 8 stolpcev. Za vsako testno skupino smo naredili 8 paralelk s skupnim volumnom 100 µl na vdolbinico. Po nasaditvi smo celicam dodali različne volumne gojišča (preglednica 3).

**Preglednica 3: Prikaz nanosa različnihvolumnov gojiščav posamezni stolpec**

Prvi stolpec preglednice prikazuje stolpce vdolbinic na mikrotiterski plošči (od 1-9).

	<b>Volumen dodanega gojišča (µl/vdolbinico)</b>
<b>Stolpec 1</b>	10,00
<b>Stolpec 2</b>	9,80
<b>Stolpec 3</b>	8,00
<b>Stolpec 4</b>	9,88
<b>Stolpec 5</b>	7,80
<b>Stolpec 6</b>	7,88
<b>Stolpec 7</b>	9,68
<b>Stolpec 8</b>	7,68
<b>Stolpec 9</b>	100

**b) Priprava kompleksov in izpostavitve celic**

Tik pred izpostavitvijo celic smo pripravili komplekse, sestavljene iz DNA, SPIONs-PAA in PEI (preglednica 4). Komplekse smo pripravili v 1,5 ml mikrocentrifugirkah za 8 paralelk z dvema rezervnima paralelkama.

**Preglednica 4: Priprava kompleksov: PEI + DNA; PEI + SPIONs-PAA; SPIONs-PAA + DNA; PEI + SPIONs-PAA + DNA**

PEI (polietilamin), SPIONs-PAA (superparamagnetni železov oksid prevlečen s poliakrilno kislino), DNA (pEGFP N1 CMV)

	Volumen 2 µg/ml PEI (µl)	Volumen 1,2 µg/ml SPIONs-PAA (µl)	Volumen 2 µg/ml DNA (µl)
<b>kompleks 1</b>	20	0	2
<b>kompleks 2</b>	20	1,2	0
<b>kompleks 3</b>	0	1,2	2
<b>kompleks 4</b>	20	1,2	2

Celice smo izpostavili kemikaljam in pripravljenim kompleksom (preglednica 5).

**Preglednica 5: Izpostavitve celic DNA, PEI in SPIONs-PAA**

PEI (polietilamin), SPIONs-PAA (superparamagnetni železov oksid prevlečen s poliakrilno kislino), DNA (pEGFP N1 CMV)

	Testne skupine	Volumen dodane kemikalije (µl/vdolbinico)
stolpec 1	kontrola	/
stolpec 2	DNA (2 µg/ml)	0,20
stolpec 3	PEI (2 µg/ml)	2,00
stolpec 4	SPIONs-PAA (1,2 µg/ml)	0,12
stolpec 5	kompleks 1 (PEI + DNA)	2,20
stolpec 6	kompleks 2 (PEI + SPIONs-PAA)	2,12
stolpec 7	kompleks 3 (SPIONs-PAA + DNA)	0,32
stolpec 8	kompleks 4 (PEI + SPIONs-PAA + DNA)	2,32
stolpec 9	slepa kontrola	/

Po izpostavitvi smo celice 48 ur inkubirali v vlagi, 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Po 48 urah smo pomerili intenziteto fluorescence poročevalskega proteina DsRed, slikali in z Alamar Blue preverili preživetje.



#### 4.11.2 Titanov dioksid

TiO<sub>2</sub> smo uporabili za preverjanje uporabnosti biosenzorskega sistema HepG2p21 DsRed. Celice smo izpostavili trem vrstam TiO<sub>2</sub> dveh različnih velikosti – nanometerske in podmikronske velikosti (TiO<sub>2</sub>-An, TiO<sub>2</sub>-Ru, TiO<sub>2</sub>-Bulk).

##### Postopek:

Celice smo poželi ter jih nasadili na tri črne mikrotiterske plošče s prozornim dnom (Greiner BIO-ONE). Ker smo izvedli tri različne metode merjenja preživetja in viabilnosti celic (Alamar Blue-test, MTT-test, MTS-test), smo zaradi predpisane gostote celic nasadili različno gostoto na plošče. Na ploščo Alamar Blue in MTT smo nasadili približno gostoto  $3 \times 10^5$  celic/ml, kar ustreza 30.000 celicam na vdolbinico, na ploščo MTS pa  $1 \times 10^5$  celic/ml, kar ustreza 10.000 celicam na vdolbinico. Celice smo nasadili tako, da smo lahko na eni plošči testirali vse 3 vrste nanodelcev (TiO<sub>2</sub>-An, TiO<sub>2</sub>-Ru, TiO<sub>2</sub>-Bulk) (preglednica 6). Nasadili smo 100 µl celične suspenzije na vdolbinico.

Nato smo pripravili redčitveno lestvico. Ker je TiO<sub>2</sub> netopen v vseh tekočinah, smo pred uporabo nanodelce sonificirali 30 minut. Zaradi fotoaktivacije ob osvetljevanju nanodelcev TiO<sub>2</sub>, smo delo z nanodelci opravili v neosvetljenem laminariju. Začetna koncentracija TiO<sub>2</sub> je bila 10 mg/ml. Celice smo izpostavili štirim koncentracijam anataznih in rutilnih TiO<sub>2</sub>, nanometerskih in podmikronskih velikosti – 1, 10, 100 in 250 µg/ml. Za vse smo dodatno pripravili negativno in slepo kontrolo. V vsako vdolbinico smo dodali 100 µl raztopine s primerno koncentracijo nanodelcev, v primeru slepe in negativne kontrole pa 100 µl gojišča. Zaradi netopnosti nanodelcev v celičnem gojišču smo preverili tudi morebitne interakcije gojišča s TiO<sub>2</sub>.

Celice smo nato inkubirali 48 ur v vlagi, 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>. Po 48 urah inkubacije smo s Tecan Genios pomerili intenziteto fluorescence proteina DsRed pri valovni dolžini 535–595 nm, nato pa dodali reagente MTT, MTS in Alamar Blue ter pomerili preživetje celic.

Test smo ponovili v štirih neodvisnih poskusih z merjenjem preživetja z metodo Alamar Blue, v dveh neodvisnih poskusih z merjenjem preživetja z metodo MTS ter v enem poskusu z merjenjem preživetja z metodo MTT.

**Preglednica 6: Prikaz nasaditve celic in izpostavitve titanovim nanodelcem TiO<sub>2</sub>**

TiO<sub>2</sub>-An (anatazni TiO<sub>2</sub> nanometerskih velikosti), TiO<sub>2</sub>-Ru (rutilni TiO<sub>2</sub> nanometerskih velikosti), TiO<sub>2</sub>-Bulk (TiO<sub>2</sub> podmikronskih velikosti)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Slepa kontrola				Slepa kontrola				Slepa kontrola			
B	Negativna kontrola				Negativna kontrola				Negativna kontrola			
C	1 µg/ml				1 µg/ml				1 µg/ml			
D	10 µg/ml				10 µg/ml				10 µg/ml			
E	100 µg/ml				100 µg/ml				100 µg/ml			
F	250 µg/ml				250 µg/ml				250 µg/ml			
G	<b>TiO<sub>2</sub>-An</b>				<b>TiO<sub>2</sub>-Ru</b>				<b>TiO<sub>2</sub>-Bulk</b>			
H	<b>(velikost: ~25 nm)</b>				<b>(velikost: &lt;100 nm)</b>				<b>(velikost: ~5 µm)</b>			

#### 4.12 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV

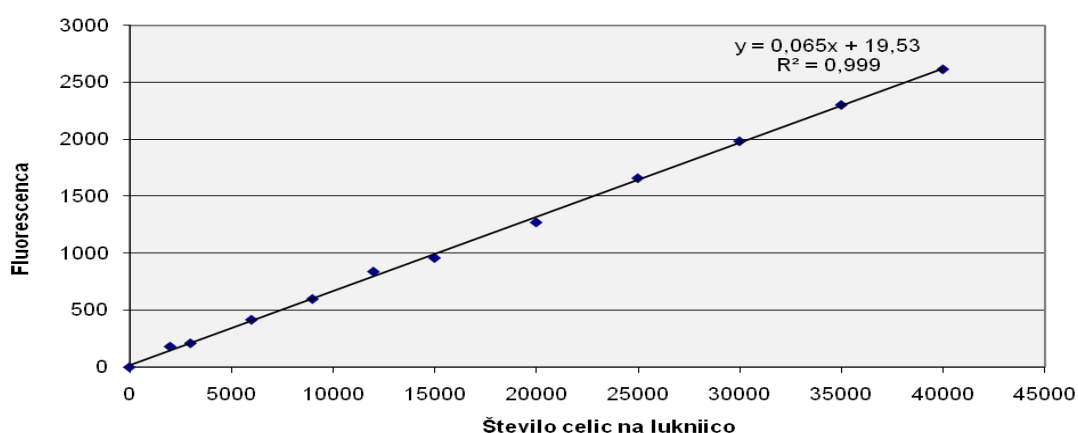
Rezultate smo statistično obdelali s programom SigmaPlot (Systat Software, Inc., London, VB). Za vsako proučevano skupino smo izračunali aritmetično sredino in njeno standardno deviacijo. Več skupin smo med seboj primerjali z enosmerno analizo varianc; v primeru da so bile skupine med seboj statistično značilno različne, smo jih primerjali po Holm-Sidakovi metodi.

Statistično značilno povečanje poškodbe dednine v primerjavi z negativnim kontrolnim vzorcem smo vzeli kot pozitiven rezultat. Za testirano snov, ki ne kaže statistično značilnega povečanja poškodbe dednine, lahko trdimo, da v uporabljenem testnem sistemu nima genotoksičnega vpliva.

## 5 REZULTATI

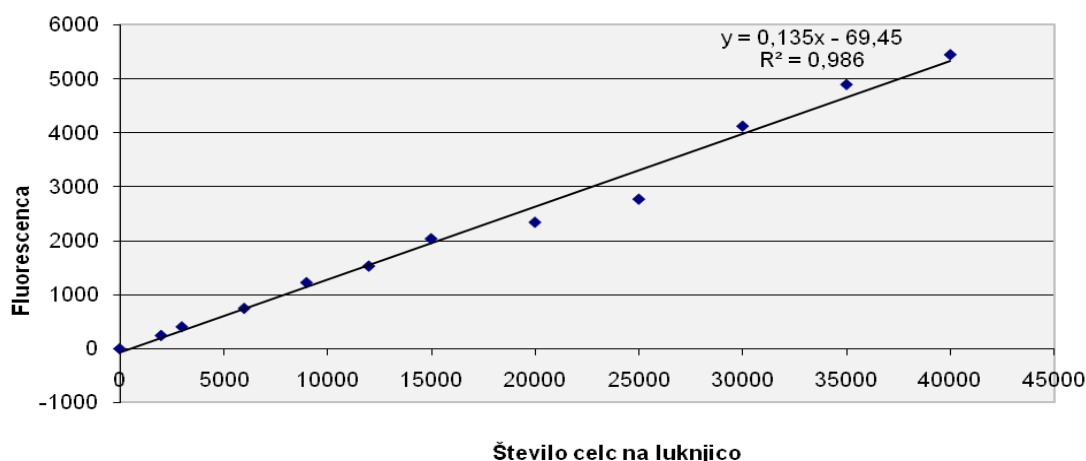
### 5.1 DOLOČANJE RASTNIH KRIVULJ CELIČNIH LINIJ HepG2 IN HepG2p21 DsRed

Namnoževanje celičnih linij smo naredili za določitev podvojitvenega časa netransfecirane celične linije HepG2 v primerjavi s stabilno transfecirano celično linijo HepG2p21 DsRed. Na podlagi umeritvenih krivulj (sliki 8, 9) in dobljene rastne krivulje (slika 10) pri posamezni celični liniji smo določili, da je podvojitveni čas transfeciranih celic HepG2p21 DsRed 22,4 ure, podvojitveni čas celic HepG2 pa 17,6 ure.



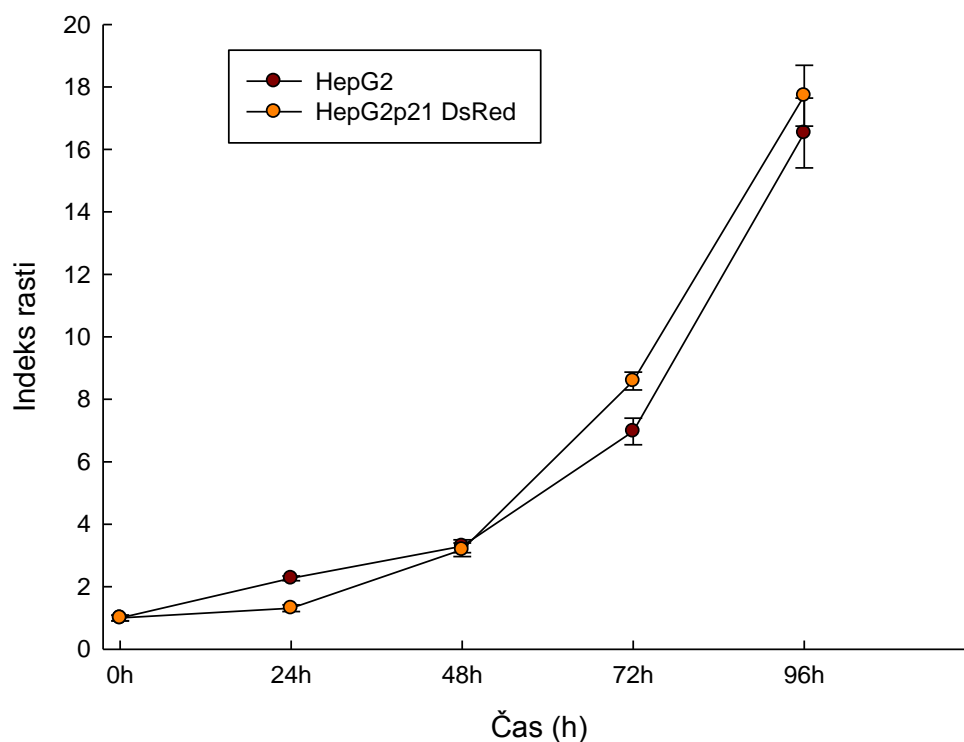
**Slika 8: Umeritvena krivulja celične linije HepG2**

Slika prikazuje umeritveno krivuljo celične linije HepG2. X os predstavlja število nasajenih celic, Y os pa ustrezno fluorescenco reagenta Alamar Blue (resazurin), ki se v metabolno aktivnih celicah reducira v resorufin.



**Slika 9: Umeritvena krivulja celične linije HepG2p21 DsRed**

Slika prikazuje umeritveno krivuljo celične linije HepG2p21 DsRed. X os predstavlja število nasajenih celic, Y os pa ustrezno fluorescenco reagenta Alamar Blue (resazurin), ki se v metabolno aktivnih celicah reducira v resorufin.

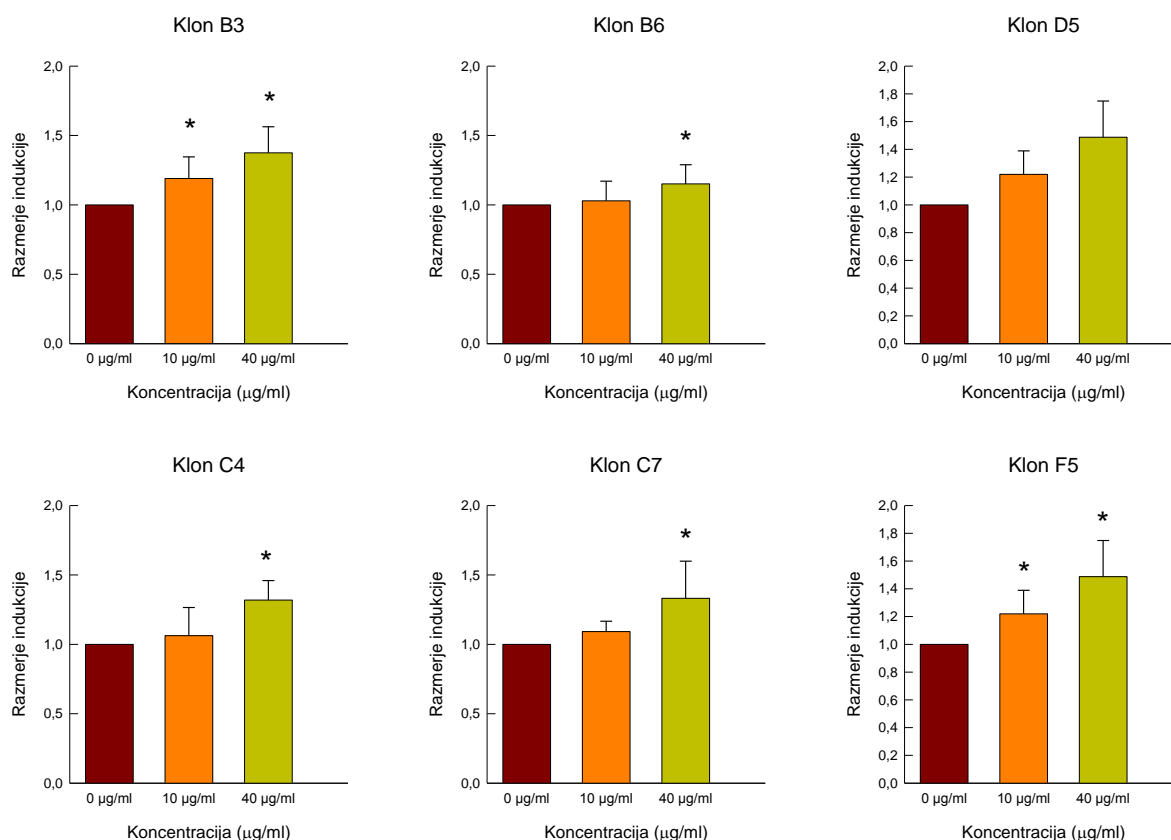


**Slika 10: Rastni krivulji celičnih linij HepG2 in HepG2p21 DsRed**

Na sliki sta prikazani rastni krivulji celičnih linij HepG2 in HepG2p21 DsRed. X os se nanaša na čas inkubacije celic, Y os pa prikazuje indeks rasti celic, pri katerem je število celic po določenem inkubacijskem času (število celic je preračunano s pomočjo umeritvene krivulje glede na intenziteto fluorescence) normirano na začetno (nasajeno) število celic z indeksom rasti 1.

## 5.2 IZOLACIJA KLONOV CELIČNE LINIJE HepG2p21 DsRed

Z izolacijo klonov smo želeli izolirati tiste kolonije celic, ki se bodo najbolj obnesle ob izpostavitvi celic testiranim kemikalijam, bodonajbolj občutljive. Izolirali in testirali smo več kot 35 različnih klonov in na podlagi rezultatov izbrali tiste, ki so pokazali največjo indukcijo fluorescence poročevalskega proteina DsRed. Klone smo poimenovali glede na pozicijo na mikrotiterski plošči – klon B3, B6, C4, C7, D5 in F5.



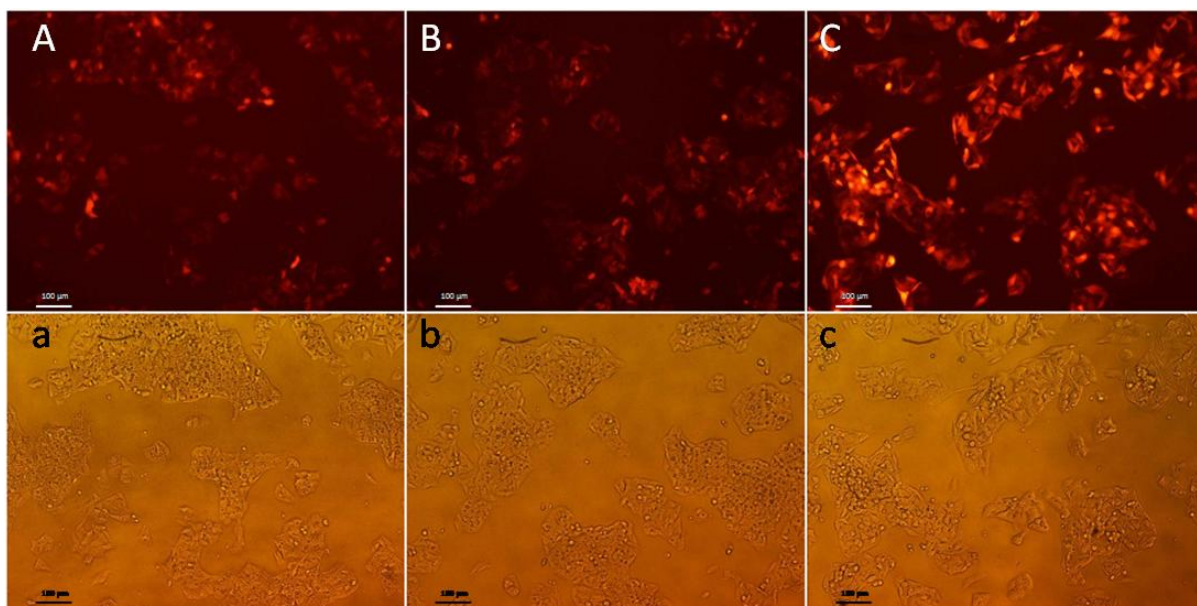
**Slika 11: Izolirani kloni celične linije HepG2p21 DsRed na podlagi 48-urne izpostavitve različnim koncentracijam MMS (0, 10, 40 µg/ml)**

Rezultate smo podali v razmerju indukcije, kjer je intenziteta fluorescence normirana na kontrolo ( $\pm$  STD). \*:  $P < 0,05$ ; statistično značilna različna vrednost razmerja indukcije fluorescence v primerjavi s kontrolo in z drugo testirano koncentracijo MMS.

Slika 11 prikazuje izbrane izolirane klone, pri katerih smo določili najvišjo indukcijo fluorescence poročevalskega proteina DsRed. Pri klonih B3 in F5 se je vrednost pri obeh koncentracijah MMS (10 in 40 µg/ml) statistično značilno razlikovala v primerjavi s kontrolo in hkrati med seboj. Pri klonih B6, C4 in C7 je prišlo do statistično značilne razlike le pri vrednosti razmerja indukcije fluorescence po izpostavitvi 40 µg/ml MMS v primerjavi s kontrolo, medtem ko pri klonu D5 ni bilo statistično značilnih razlik.

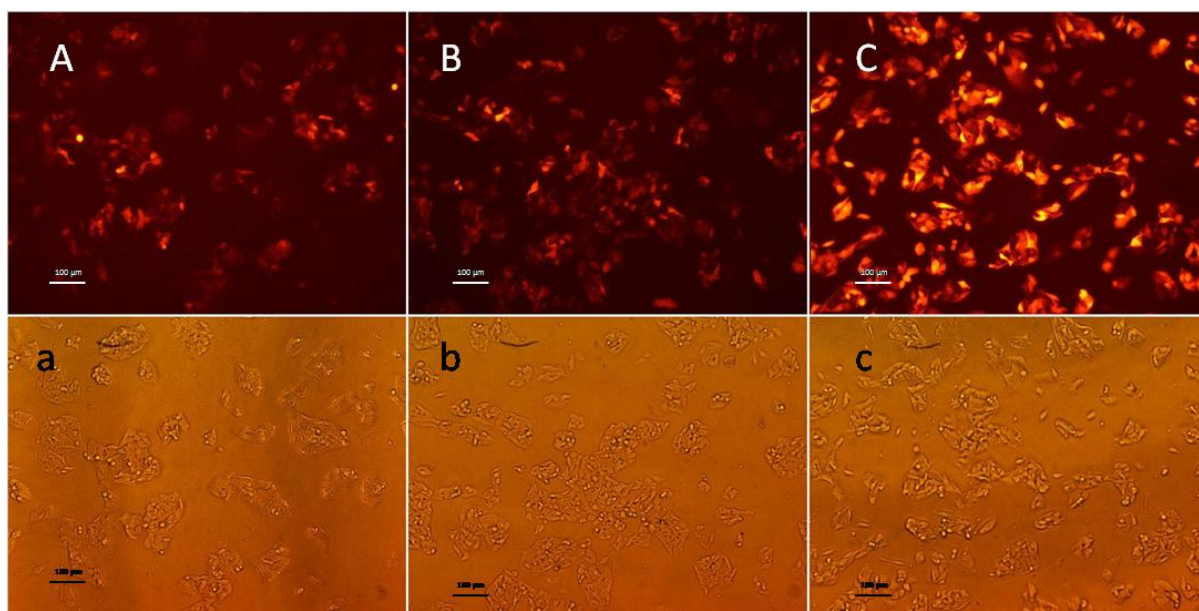
Najvišje razmerje indukcije se je pokazalo pri klonih F5 in B3, kjer je razmerje glede na kontrolo v primeru klona F5segalo pri koncentraciji 10 µg/ml MMS do 1,22 ter pri koncentraciji 40 µg/ml do 1,49, v primeru klona B3 pa je bilo razmerje indukcije nekoliko nižje, pri koncentraciji 10 µg/ml MMS 1,19 ter pri koncentraciji 40 µg/ml 1,38.

Sliki 12 in 13 prikazujeta klon B3 oziroma F5, slikan s fluorescenčnim in svetlobnim mikroskopom, po 48-urni inkubaciji z MMS (10 in 40  $\mu\text{g/ml}$ ) in negativno kontrolo.



**Slika 12: Klon B3**

Inducirana fluorescenca klona B3, slikana s fluorescenčnim (A-C) in svetlobnim (a-c) mikroskopom po 48-urni inkubaciji brez MMS (A, a) ter s koncentracijama 10  $\mu\text{g/ml}$  (B, b) in 40  $\mu\text{g/ml}$  (C, c) MMS.



**Slika 13: Klon F5**

Inducirana fluorescenca klona F5, slikana s fluorescenčnim (A-C) in svetlobnim (a-c) mikroskopom po 48-urni inkubaciji brez MMS (A, a) ter s koncentracijama 10  $\mu\text{g/ml}$  (B, b) in 40  $\mu\text{g/ml}$  (C, c) MMS.

### 5.3 PRIMERJAVA VREDNOSTI INTENZITETE FLUORESCENCE MED POSAMEZNIMI PASAŽAMI CELIČNE LINIJE HepG2p21 DsRed

S primerjavo pasaž smo želeli preveriti povezavo med občutljivostjo celic in njihovim številom presajanj. Celice po določenem številu presaditev – pasaž preidejo v fazo stagnacije, kar pomeni, da se njihova metabolna aktivnost zmanjša. Celice smo ob rutinskem presajanju nasajali tudi na črno mikrotitersko ploščo s prozornim dnom (Greiner, BIO-ONE). Izpostavili smo jih dvema koncentracijama MMS (10 in 40  $\mu\text{g/ml}$ ).

V preglednici 7 so prikazane dobljene vrednosti razmerja indukcije, kjer so vrednosti inducirane fluorescence normirane na kontrolo in preživetje, ter vrednosti preživetja celične linije v posamezni pasaži. Iz rezultatov je razvidno, da presajanje celic oziroma število pasaž ne vpliva na njihovo občutljivost.

**Preglednica 7: Prikazvrednosti razmerja indukcije in preživetja celic pri različnih pasažah**

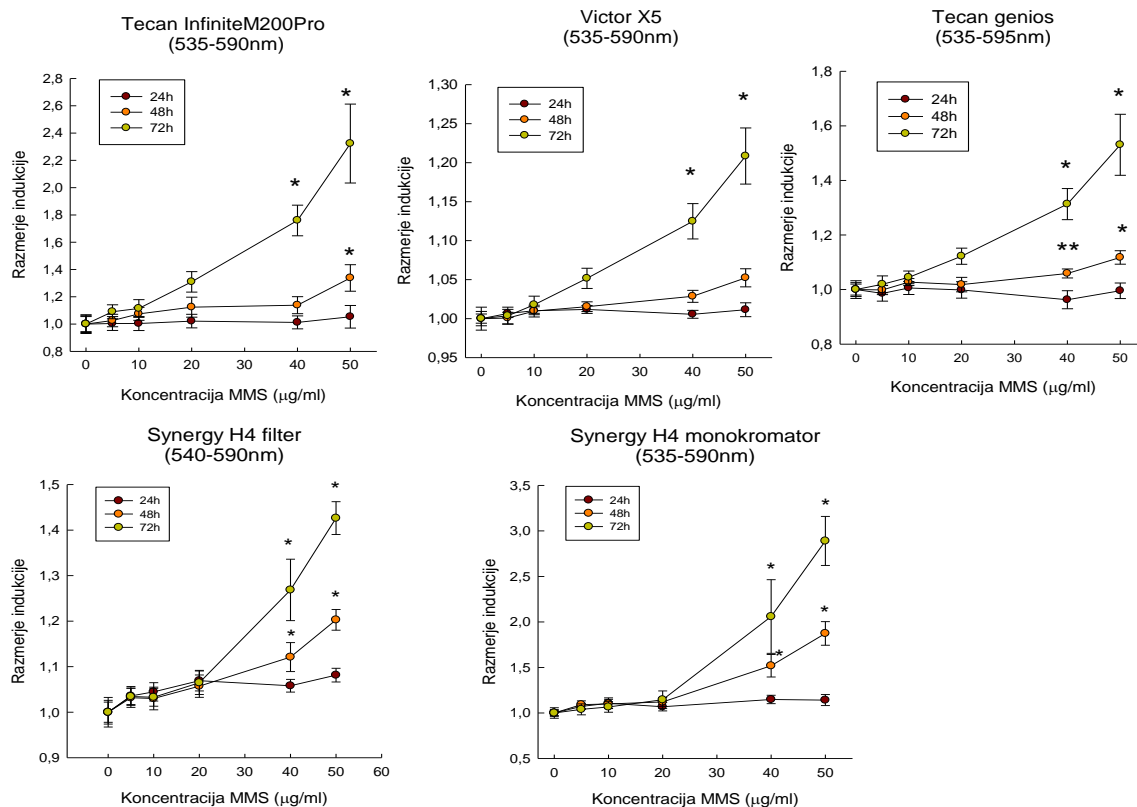
Pasaža	Razmerje indukcije			Preživetje (%)		
	Kontrola	10 µg/ml	40 µg/ml	Kontrola	10 µg/ml	40 µg/ml
2	1	1,12	1,23	100	86	86
3	1	1,03	1,22	100	95	92
4	1	1,11	1,14	100	87	91
5	1	1,11	1,26	100	90	85
6	1	1,1	1,21	100	92	91
7	1	1,17	1,34	100	84	79
8	1	1,01	1,1	100	95	88
9	1	1,07	1,17	100	88	79
12	1	1,16	1,32	100	84	82
13	1	1,2	1,24	100	77	71
14	1	1,15	1,24	100	85	82
15	1	1,12	1,2	100	87	90
16	1	1,13	1,27	100	88	88
17	1	1,06	1,19	100	92	86
18	1	1,17	1,26	100	82	76
19	1	1,09	1,19	100	91	88
20	1	1,17	1,31	100	82	79
30	1	1,08	1,2	100	89	81
35	1	1,11	1,22	100	86	85
40	1	0,96	1,16	100	99	96

#### 5.4 VALIDACIJA SPEKTROFLUORIMETROV

Za validacijo in primerjavo spektrofluorimetrov različnih proizvajalcev smo preverjali občutljivost posameznega spektrofluorimetra ter vpliv spektrofluorimetra na dobljene rezultate. V okviru validacije spektrofluorimetrov smo testirali pet spektrofluorimetrov, ki so se razlikovali predvsem glede na tip optično-zaznavnega sistema – monokromatorski sistem in filtrski sistem. Validacija je potekala z dvema kemikalijama z znanim delovanjem – MMS in BaP. Zaradi različne občutljivosti spektrofluorimetrov so skale na Y-oseh različne.



### 5.4.1 MMS



**Slika 14: Primerjava občutljivosti spektrofotrometrov za merjenje intenzitete fluorescence poizpostavitvi celične linije HepG2p21 DsRed različnim koncentracijam MMS (0, 5, 10, 20, 40 in 50 µg/ml)**

Rezultate smo podali v razmerju indukcije, kjer je indukcija fluorescence normirana na kontrolo ( $\pm$ STD): \* :  $P < 0,05$ ; statistično značilna razlika v primerjavi z vsemi ostalimi koncentracijami po 24-, 48- ali 72-urah inkubacije. \*\* :  $P < 0,05$ ; statistično značilna razlika v primerjavi z vrednostmi pri koncentracijah 0, 5, 20, 40 in 50 µg/ml.

Za primerjavo občutljivosti spektrofotrometrov smo uporabili pet koncentracij MMS (5, 10, 20, 40 in 50 µg/ml) in negativno kontrolo. Celice smo inkubirali 24, 48 in 72 ur v MMS.

Slika 14 prikazuje razmerje indukcije po izpostavitvi različnim koncentracijam MMS za 24, 48 in 72 ur. Z višanjem koncentracije MMS se je razmerje indukcije povečevalo predvsem po 48- oziroma 72-urni izpostavitvi, kjer so dobljene vrednosti razmerja indukcije pri najvišjih koncentracijah (40 in 50 µg/ml) pri spektrofotrometrih Synergy H4 filter in Synergy H4 monokromator statistično značilno različne v primerjavi z negativno kontrolo ter vrednostjo ostalih koncentracij. Pri spektrofotrometru Tecan Infinite M200Pro so bile vrednosti

razmerja indukcije pri najvišjih koncentracijah (40 in 50  $\mu\text{g/ml}$ ) po 72-urni inkubaciji statistično značilno različne v primerjavi z vrednostmi negativne kontrole in z vrednostmi pri ostalih koncentracijah. Prav tako smo pri merjenju s Tecan Infinite M200Pro po 48-urni inkubaciji s 50  $\mu\text{g/ml}$  MMS ugotovili statistično značilno razliko vrednosti inducirane fluorescence v primerjavi z ostalimi vrednostmi. Po 24-urni inkubaciji pri nobenem spektrofotometru nismo ugotovili statistično značilnih razlik med posameznimi koncentracijami.

Posamezne vrednosti razmerja indukcije pri posamezni koncentraciji po 24-, 48- oziroma 72-urni izpostavitvi so prikazane v preglednici 8.

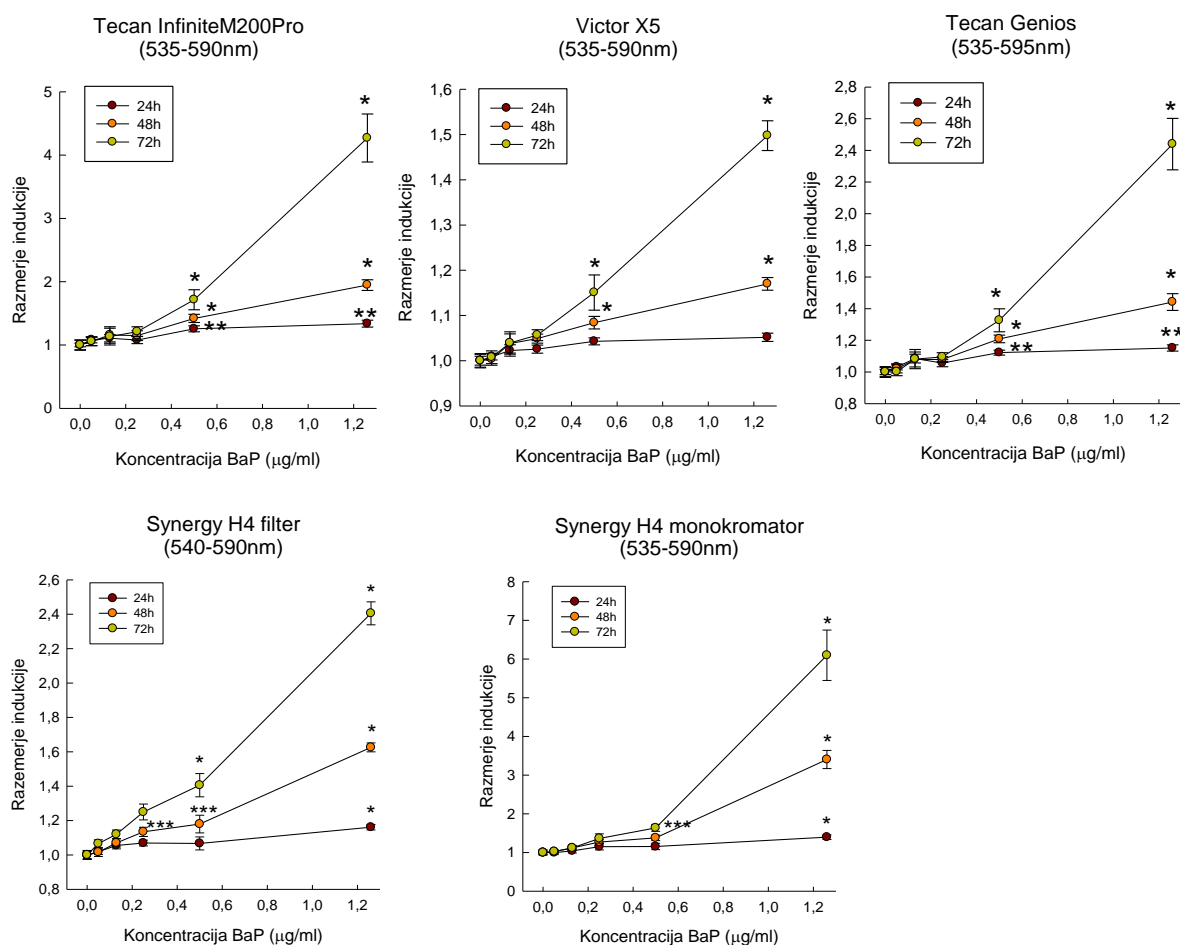
**Preglednica 8: Vrednosti razmerja inducirane fluorescence proteina DsRed**

Na levi strani preglednice so nanešeni testirani spektrofotometri, na desni pa vrednosti razmerja indukcije po 24-, 48-, 72-urni izpostavitvi različnim koncentracijam MMS (0, 5, 10, 20, 40, 50  $\mu\text{g/ml}$ )

	MMS					
	0 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
	<b>24 h</b>					
<b>Tecan Genios</b>	1,000	0,986	1,006	0,999	0,963	0,996
<b>Victor X5</b>	1,000	1,007	1,010	1,012	1,006	1,011
<b>Tecan Infinite M200Pro</b>	1,000	1,004	1,004	1,022	1,013	1,054
<b>Synergy H4 filter</b>	1,000	1,036	1,045	1,069	1,058	1,081
<b>Synergy H4 monokromator</b>	1,000	1,072	1,107	1,069	1,148	1,142
	<b>48 h</b>					
<b>Victor X5</b>	1,000	1,001	1,010	1,015	1,029	1,052
<b>Tecan Genios</b>	1,000	0,999	1,027	1,018	1,059	1,118
<b>Synergy H4 filter</b>	1,000	1,032	1,030	1,057	1,121	1,203
<b>Tecan Infinite M200Pro</b>	1,000	1,026	1,075	1,124	1,139	1,338
<b>Synergy H4 monokromator</b>	1,000	1,091	1,099	1,121	1,519	1,874
	<b>72 h</b>					
<b>Victor X5</b>	1,000	1,004	1,018	1,052	1,125	1,209
<b>Tecan Genios</b>	1,000	1,019	1,045	1,122	1,313	1,531
<b>Synergy H4 filter</b>	1,000	1,035	1,033	1,065	1,269	1,426
<b>Tecan Infinite M200Pro</b>	1,000	1,090	1,114	1,310	1,759	2,323
<b>Synergy H4 monokromator</b>	1,000	1,040	1,066	1,145	2,060	2,890

## 5.4.2 BaP

Za primerjavo občutljivosti spektrofleurimetrov smo uporabili tudi BaP v petih koncentracijah (0, 0,05, 0,13, 0,25, 0,50 in 1,26  $\mu\text{g/ml}$ ) in negativno kontrolo. Celice smo kemikaliji BaP izpostavili za 24, 48 oziroma 72 ur. Zaradi različne občutljivosti spektrofleurimetrov so skale na Y-oseh različne.



**Slika 15: Primerjava občutljivosti spektrofleurimetrov za merjenje intenzitete fluorescence poizpostavitvi celične linije HepG2p21 DsRed različnim koncentracijam BaP (0, 0,05, 0,13, 0,25, 0,50 in 1,26  $\mu\text{g/ml}$ )**

Rezultate smo podali v razmerju indukcije, kjer je inducirana intenziteta fluorescence normirana na kontrolo ( $\pm\text{STD}$ ). \*: P < 0,05; statistično značilna razlika v primerjavi z vsemi ostalimi koncentracijami po 24, 48 ali 72 urah inkubacije. \*\*: P < 0,05; statistično značilna razlika v primerjavi z vrednostmi pri koncentracijah 0, 0,05, 0,13, 0,25  $\mu\text{g/ml}$ . \*\*\*: P < 0,05; statistično značilna razlika v vrednosti indukcije fluorescence v primerjavi z vrednostmi pri kontroli ter pri koncentracijah 0,05, 0,13 in 1,26  $\mu\text{g/ml}$ .

Slika 15 prikazuje razmerje indukcije po izpostavitvi različnim koncentracijam BaP po 24-, 48- oziroma 72-urni inkubaciji. Z višanjem koncentracije BaP se je povečevalo tudi razmerje indukcije glede na kontrolo. S spektrofotometrom Synergy H4monokromatorjem smo izmerili najvišje razmerje indukcije, temu je sledil spektrofotometer Tecan Infinite M200Pro. Do statistično značilnih razlik v primerjavi z vsemi ostalimi koncentracijami in negativno kontrolo je prišlo pri najvišji koncentraciji BaP (1,26 µg/ml) po 48- oziroma 72-urni inkubaciji pri vseh testiranih spektrofotometrih.

Posamezne vrednosti razmerja indukcije fluorescence pri posamezni koncentraciji BaP po 24-, 48- oziroma 72-urni izpostavitvi kemikaliji so prikazane v spodnji preglednici.

**Preglednica 9: Vrednosti razmerja inducirane fluorescence proteina DsRed**

Na levi strani preglednice so nanešeni testirani spektrofotometri, na desni pa vrednosti razmerja indukcije po 24-, 48-, 72-urni izpostavitvi različnim koncentracijam BaP (0, 0,05, 0,13, 0,25, 0,50, 1,26 µg/ml)

	<b>BaP</b>					
	<b>0µg/ml</b>	<b>0,05µg/ml</b>	<b>0,13µg/ml</b>	<b>0,25µg/ml</b>	<b>0,5µg/ml</b>	<b>1,26µg/ml</b>
	<b>24 h</b>					
<b>Victor X5</b>	1,000	1,009	1,023	1,026	1,043	1,052
<b>Tecan Genios</b>	1,000	1,032	1,085	1,057	1,122	1,151
<b>Synergy H4 filter</b>	1,000	1,019	1,055	1,070	1,067	1,161
<b>Tecan Infinite M200Pro</b>	1,000	1,082	1,107	1,079	1,257	1,338
<b>Synergy H4 monokromator</b>	1,000	0,997	1,043	1,150	1,156	1,396
	<b>48 h</b>					
<b>Victor X5</b>	1,000	1,003	1,038	1,049	1,084	1,170
<b>Tecan Genios</b>	1,000	1,019	1,079	1,079	1,209	1,442
<b>Synergy H4 filter</b>	1,000	1,016	1,070	1,134	1,180	1,626
<b>Tecan Infinite M200Pro</b>	1,000	1,058	1,159	1,149	1,420	1,947
<b>Synergy H4 monokromator</b>	1,000	1,022	1,118	1,269	1,379	3,404
	<b>72 h</b>					
<b>Victor X5</b>	1,000	1,008	1,039	1,057	1,151	1,498
<b>Tecan Genios</b>	1,000	1,001	1,081	1,095	1,327	2,440
<b>Synergy H4 filter</b>	1,000	1,066	1,121	1,250	1,406	2,405
<b>Tecan Infinite M200Pro</b>	1,000	1,057	1,133	1,212	1,716	4,269
<b>Synergy H4 monokromator</b>	1,000	1,024	1,120	1,362	1,636	6,098

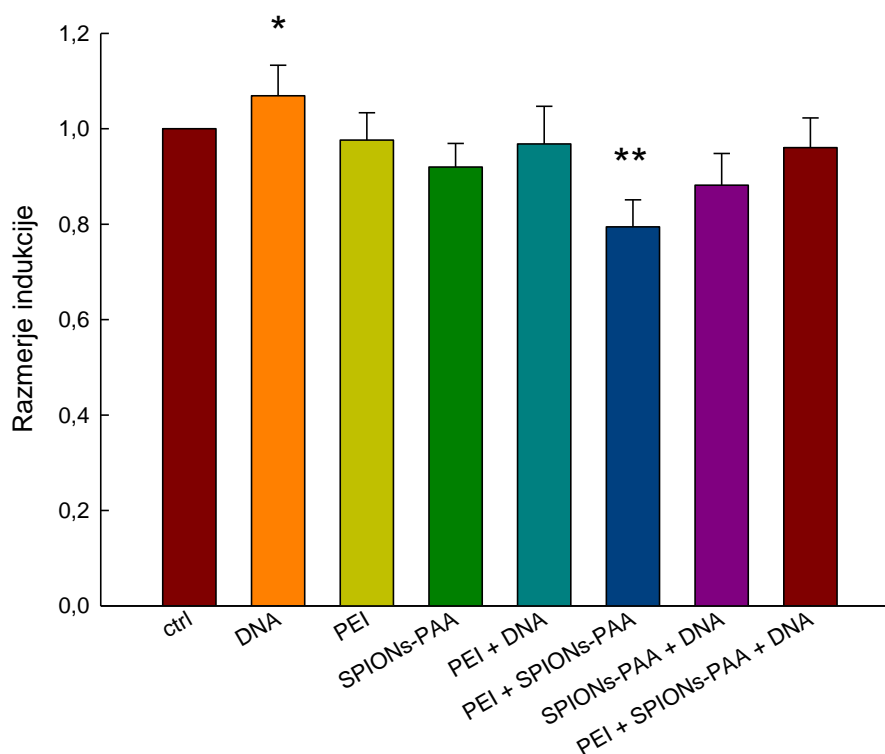
## 5.5 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV

S testiranjem različnih vrst nanodelcev smo želeli preveriti njihovo morebitno genotoksičnost in ali je biosenzorski sistem HepG2p21 DsRed primeren za določevanje ter ocenjevanje genotoksičnega delovanja nanodelcev.

Veliko nanodelcev je čedalje bolj uporabnih v medicini, farmaciji, kozmetični in prehrabni industriji, zato je treba natančno določiti njihove lastnosti in delovanje ter oceniti stopnjo tveganja za zdravje ljudi ob njihovi uporabi. Superparamagnetni železov oksid (SPIONs) se pogosto uporablja v slikovni diagnostiki in tudi v raziskavah za povečanje protitumorskega učinka zdravil in rekombinantne plazmidne DNA. Titanovi nanodelci se uporabljajo kot pigmenti in barvila, kot aditivi v prehrabni industriji, kot vezivo v medicini ter kot UV zaščitav kozmetični industriji.

### 5.5.1 Superparamagnetni železov oksid (SPIONs)

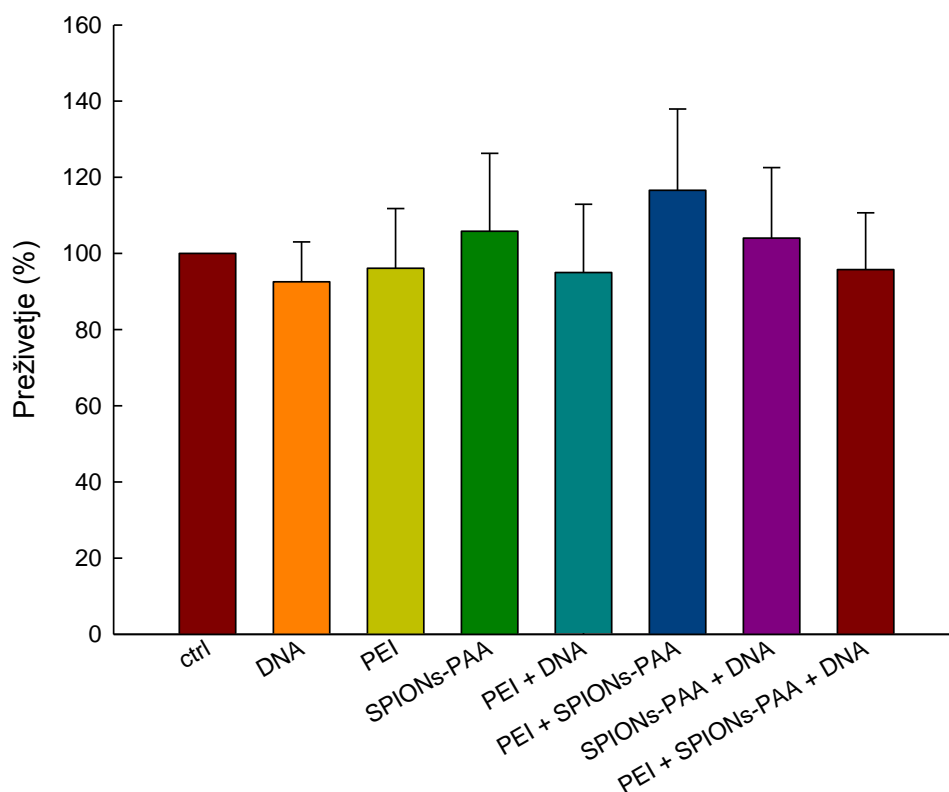
Genotoksičnost smo določali z indukcijo fluorescence s spektrofluorimetrom Tecan Infinite F200 pri valovnih dolžinah 535–590 nm. Fluorescenco smo normirali na kontrolo in preživetje ter rezultate tako podali v razmerju indukcije s standardno deviacijo (slika 16). Preživetje smo določili z metodo Alamar Blue, s katero preko redukcije resazurina v resorufin v metabolno aktivnih celicah ugotovimo viabilnost celic (slika 17).



**Slika 16: Indukcija fluorescence, normirana na preživetje po 48-urni izpostavitvi superparamagnetnim nanodelcem, prevlečenih s poliakrilno kislino (SPIONs-PAA), DNA (pEGFP- N1- CMV) in polietilaminu (PEI)**

Celice smo za 48 ur izpostavili superparamagnetnim železovim nanodelcem, DNA in PEI, z njihovim kompleksom. Rezultate smo podali v razmerju indukcije, kjer je indukcija fluorescence(IF) normirana na preživetje ter na kontrolo ( $\pm$ STD).\*:  $P < 0,05$ ; statistično značilno povišanje vrednosti indukcije fluorescence ob izpostavitvi DNA, v primerjavi z vsemi ostalimi testnimi skupinami, razen od kontrolne vrednosti. \*\*:  $P < 0,05$ ; statistično značilno zmanjšanje vrednosti indukcije fluorescence ob izpostavitvi kompleksu PEI + SPIONs-PAA v primerjavi s kontrolno vrednostjo ter z vrednostmi pri ostalih izpostavitvah, razen pri izpostavitvi kompleksom SPIONs-PAA + DNA.

Do statistično značilno povišane vrednosti indukcije fluorescence v primerjavi z vsemi ostalimi testnimi skupinami in kontrolno skupino pride le pri izpostavitvi DNA. Pri izpostavitvi kompleksom, ki vsebujejo PEI in SPIONs-PAA, je vidna statistično značilna zmanjšana vrednost indukcije fluorescence v primerjavi z vsemi skupinami, le v primerjavi s kompleksom, ki vsebuje SPIONs-PAA in DNA, ni opazne statistično značilne razlike.



**Slika 17: Preživetje celic po 48-urni izpostavitvi superparamagnetnim nanodelcem, prevlečenih s poliakrilno kislino (SPIONs-PAA), DNA (pEGFP- N1- CMV) in polietilaminu (PEI)**

Celice smo za 48 ur izpostavili superparamagnetnim železovim nanodelcem, DNA in PEI ter njihovim kompleksom, nato pa po 48 urah pomerili preživetje celic z reagentom Alamar Blue. Rezultate smo podali v odstotkih preživetja v primerjavi s kontrolo ( $\pm$ STD).

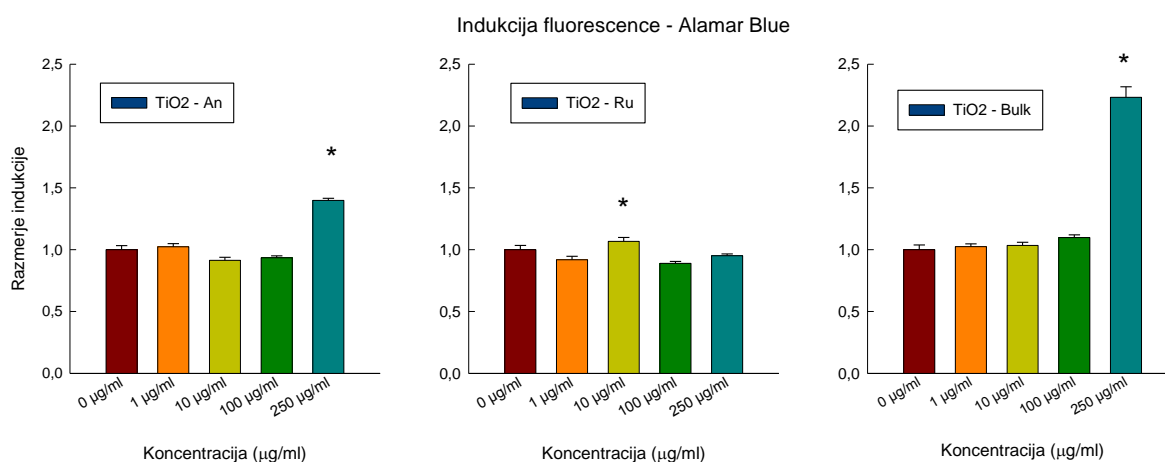
Merjenje viabilnosti in preživetja celic po 48-urni izpostavitvi testiranim nanodelcem ni pokazalo statistično značilnih razlik med vrednostmi preživetja pri posamezni skupini.

### 5.5.2 Titanov dioksid ( $\text{TiO}_2$ )

Za preverjanje primernosti biosenzorskega celičnega sistema HepG2p21 DsRed za določanje genotoksičnosti nanodelcev smo uporabili titanov dioksid različnih vrst, velikosti in koncentracij. Uporabili smo dve vrsti nanodelcev dveh različnih velikosti:  $\text{TiO}_2$ -An,  $\text{TiO}_2$ -Ru ter  $\text{TiO}_2$ -Bulk. Celice smo za 48 ur izpostavili štirim koncentracijam  $\text{TiO}_2$  (0, 1, 10, 100 in 250  $\mu\text{g/ml}$ ). Za določevanje viabilnosti celic in preživetja pri posamezni koncentraciji smo uporabili tri metode: Alamar Blue, MTS- in MTT-test, saj smo želeli preveriti, za koliko lahko rezultati odstopajo, če izbrana metoda odkrivanja ni primerno izbrana.

### 5.5.2.1 Alamar Blue

Vrednost razmerja indukcije, kjer je intenziteta fluorescence normirana na kontrolo in preživetje merjeno z metodo Alamar Blue, je statistično značilno narasla v primeru TiO<sub>2</sub>-An in TiO<sub>2</sub>-Bulk po izpostavitvi najvišji koncentraciji nanodelcev (250 µg/ml). V primeru TiO<sub>2</sub>-Ru je do statistično značilne povišane vrednosti fluorescence prišlo pri koncentraciji 10 µg/ml nanodelcev TiO<sub>2</sub>-Ru (slika 18).

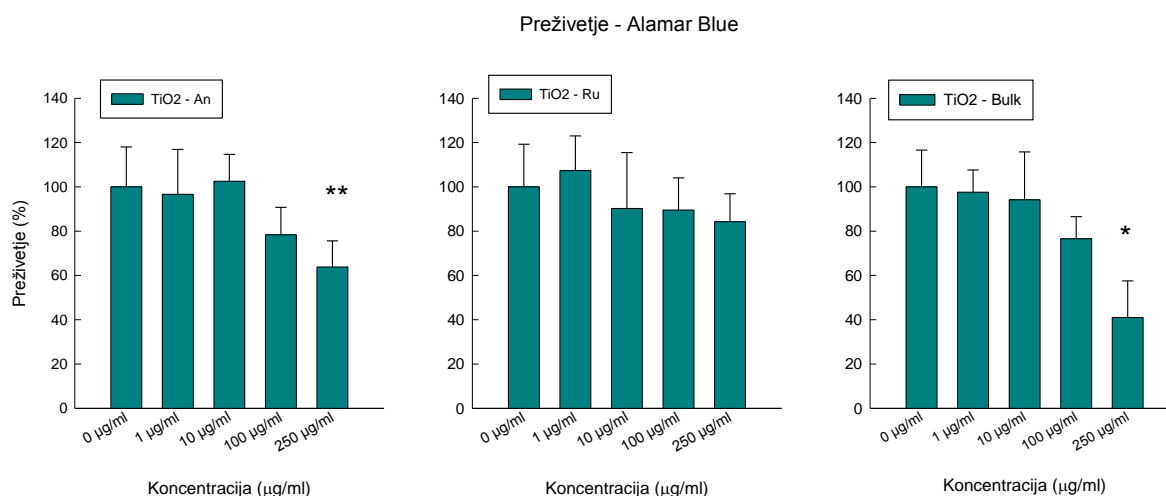


**Slika 18: Indukcija fluorescence po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovega dioksida (TiO<sub>2</sub>) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), normirana na preživetje celic dobljeno s testom Alamar Blue**

Rezultate smo podali kot razmerje indukcije, kjer je indukcija fluorescence (IF) normirana na preživetje pri posamezni koncentraciji ( $\pm$ STD).\*:  $P < 0,05$ ; statistično značilno povišana vrednost indukcije fluorescence pri eni koncentraciji v primerjavi z ostalimi koncentracijami ene vrste TiO<sub>2</sub>.

Iz rezultatov preživetja oziroma viabilnosti celic, ki smo jih izmerili z reagentom Alamar Blue (slika 19), smo razbrali, da je preživetje močno upadlo po 48-urni izpostavitvi 250 µg/ml TiO<sub>2</sub>-Bulk, in sicer iz 100% na 41,3%, kar je statistično značilno zmanjšanje preživetja v primerjavi s preživetjem pri ostalih koncentracijah. Pri koncentraciji 250 µg/ml TiO<sub>2</sub>-An pride do zmanjšanja preživetja, in sicer iz 100% na 63,8%, kar se statistično značilno razlikuje le od kontrolne skupine ter od vrednosti preživetja po izpostavitvi 10 µg/ml TiO<sub>2</sub>-An. Pri TiO<sub>2</sub>-Ru je preživetje padlo za 15,7%, pri čemer pa nismo zaznali statistično značilnih razlik v primerjavi z vrednostmi preživetja pri ostalih koncentracijah in kontroli.



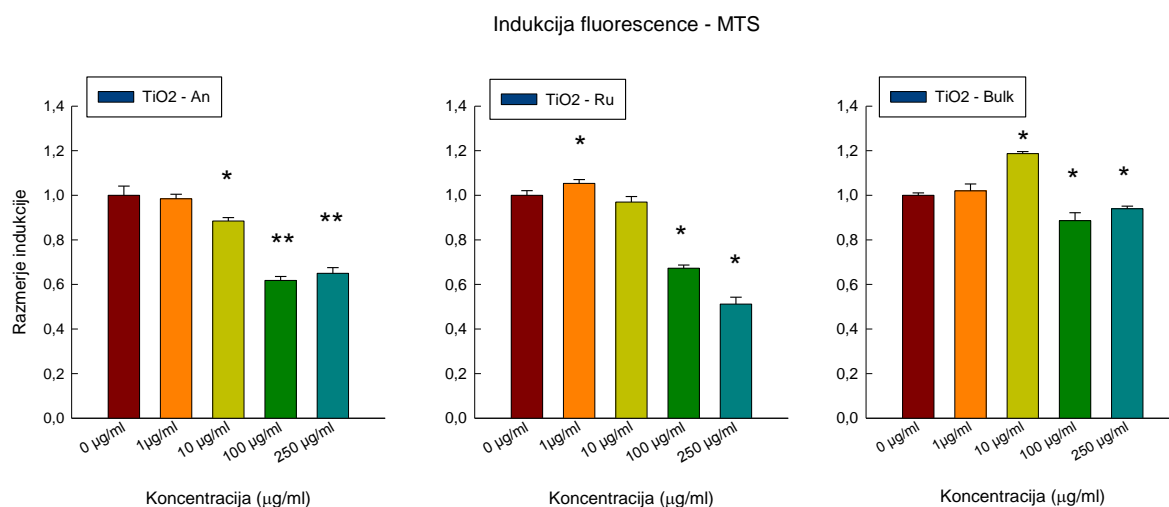


**Slika 19: Preživetje celic po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovega dioksida (TiO<sub>2</sub>) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), dobljeno s testom Alamar Blue**

Rezultate smo podali v odstotkih preživetja v primerjavi s kontrolo ( $\pm$ STD).\*:  $P < 0,05$ ; statistično značilno zmanjšana vrednost preživetja v primerjavi z ostalimi koncentracijami ene vrste TiO<sub>2</sub>. \*\*:  $P < 0,05$ ; statistično značilno zmanjšanje preživetja najvišje koncentracije TiO<sub>2</sub> v primerjavi s kontrolno vrednostjo in vrednostjo pri koncentraciji 10 µg/ml.

#### 5.5.2.2 MTS

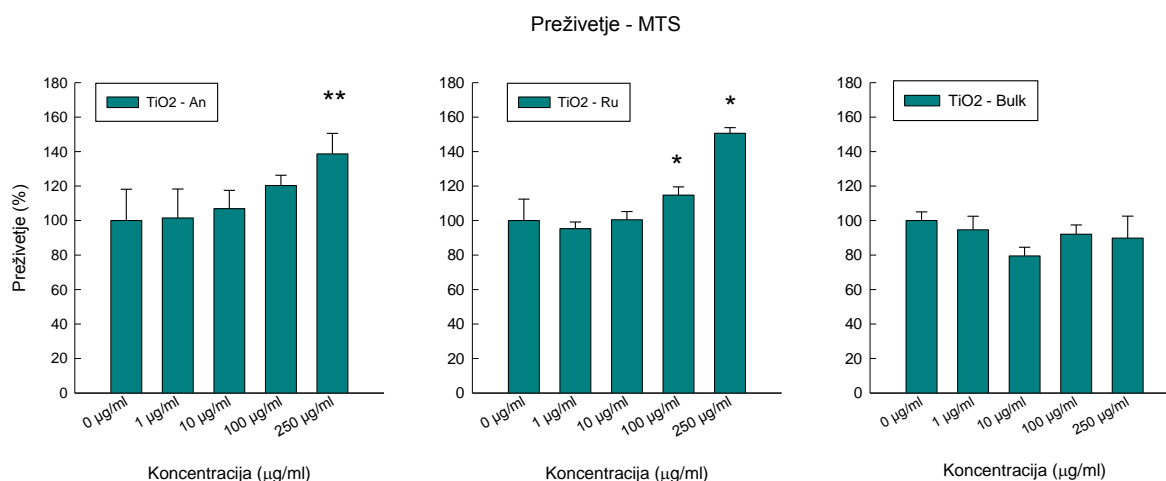
Inducirano intenziteto fluorescence smo po izpostavitvi različnim koncentracijam TiO<sub>2</sub>-An, TiO<sub>2</sub>-Ru in TiO<sub>2</sub>-Bulk normirali na vrednosti preživetja, ugotovljene s testom MTS, ter tako dobili razmerje indukcije (slika 20). Iz rezultatov smo ugotovili statistično značilno zmanjšano oziroma povečano razmerje indukcije po inkubaciji z 10 µg/ml TiO<sub>2</sub>-An v primerjavi z vsemi testnimi skupinami in negativno kontrolo. Razmerje indukcije ob izpostavitvi koncentracijam 100 in 250 µg/ml TiO<sub>2</sub>-An je statistično značilno zmanjšano le v primerjavi z negativno kontrolo ter s koncentracijami 1 in 10 µg/ml. Ob izpostavitvi celic TiO<sub>2</sub>-Ru lahko iz rezultatov razberemo, da je statistično značilno povečanje razmerja indukcije v primerjavi z vsemi ostalimi koncentracijami nanodelcev le v primeru koncentracije 1 µg/ml, medtem ko se je statistično značilno zmanjšana vrednost razmerja glede na vse ostale testne skupine pojavila pri najvišjih koncentracijah, 100 in 250 µg/ml TiO<sub>2</sub>-Ru. V primeru nanodelcev TiO<sub>2</sub>-Bulk je statistično značilno povečano/zmanjšano razmerje indukcije po 48-urni izpostavitvi koncentracijam 10, 100, 250 µg/ml.



**Slika 20: Indukcija fluorescence po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovega dioksida (TiO<sub>2</sub>) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), normirana na preživetje celic dobljeno s testom MTS**

Rezultate smo podali kot razmerje indukcije, kjer je indukcija fluorescence (IF) normirana na preživetje pri posamezni koncentraciji ( $\pm$ STD).\*:  $P < 0,05$ ; statistično značilno povišanje/zmanjšanje vrednosti indukcije fluorescence v primerjavi z vsemi koncentracijami ene vrste TiO<sub>2</sub>. \*\*:  $P < 0,05$ ; statistično značilno zmanjšanje indukcije fluorescence v primerjavi z vrednostmi pri kontroli ter pri koncentracijah 1 in 10 µg/ml.

Iz rezultatov preživetja, merjenega z metodo MTS (slika 21), smo razbrali statistično značilno povišanje/zmanjšanje vrednosti preživetja le ob izpostavitvi celic TiO<sub>2</sub>-An in TiO<sub>2</sub>-Ru. Pri prvem se v primerjavi s kontrolo in koncentracijama 1 in 10 µg/ml statistično značilno poviša vrednost preživetja ob izpostavitvi 250 µg/ml. Pri tej koncentraciji se je preživetje povišalo za 38,7% v primerjavi s kontrolo. Prav tako pride do statistično značilnega povišanja preživetja po izpostavitvi 100 oziroma z 250 µg/ml TiO<sub>2</sub>-Ru, pri koncentraciji 100 µg/ml znaša razlika v primerjavi s kontrolno vrednostjo 14,8%, pri koncentraciji 250 µg/ml pa ta razlika naraste na 50,5%. Po izpostavitvi nanodelcem TiO<sub>2</sub>-Bulk, nismo opazili večjih razlik v preživetju.

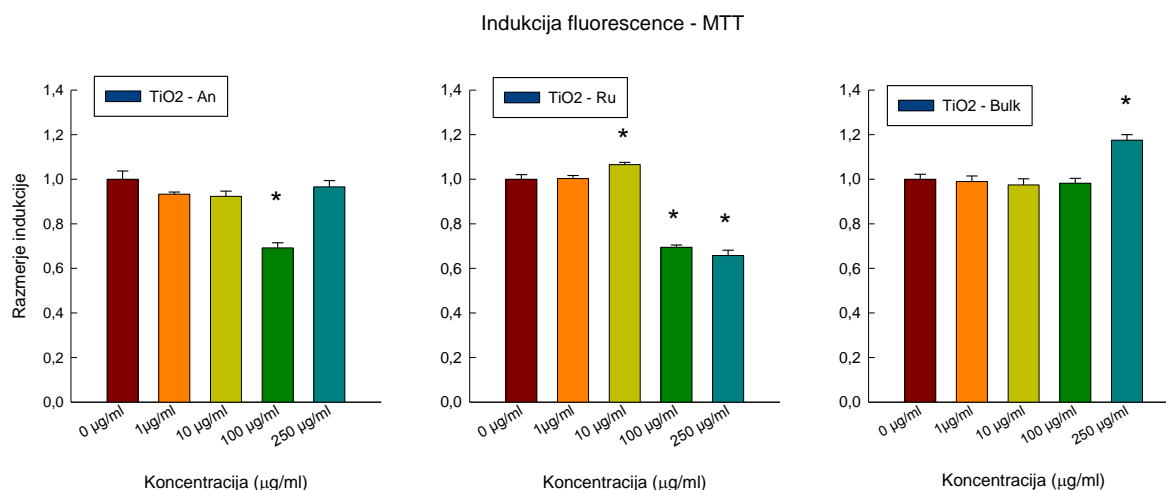


**Slika 21: Preživetje celic po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovga dioksida (TiO<sub>2</sub>) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), dobljeno s testom MTS**

Rezultate smo podali v odstotkih preživetja v primerjavi s kontrolo ( $\pm$ STD).\*:  $P < 0,05$ ; statistično značilno povešanje/zmanjšanje preživetja v primerjavi z vsemi ostalimi koncentracijami ene vrste TiO<sub>2</sub>. \*\*:  $P < 0,05$ ; statistično značilno povešanje vrednosti preživetja pri koncentraciji 250 µg/ml v primerjavi z vrednostmi preživetja pri kontroli ter pri koncentracijah 1 in 10 µg/ml.

### 5.5.2.3 MTT

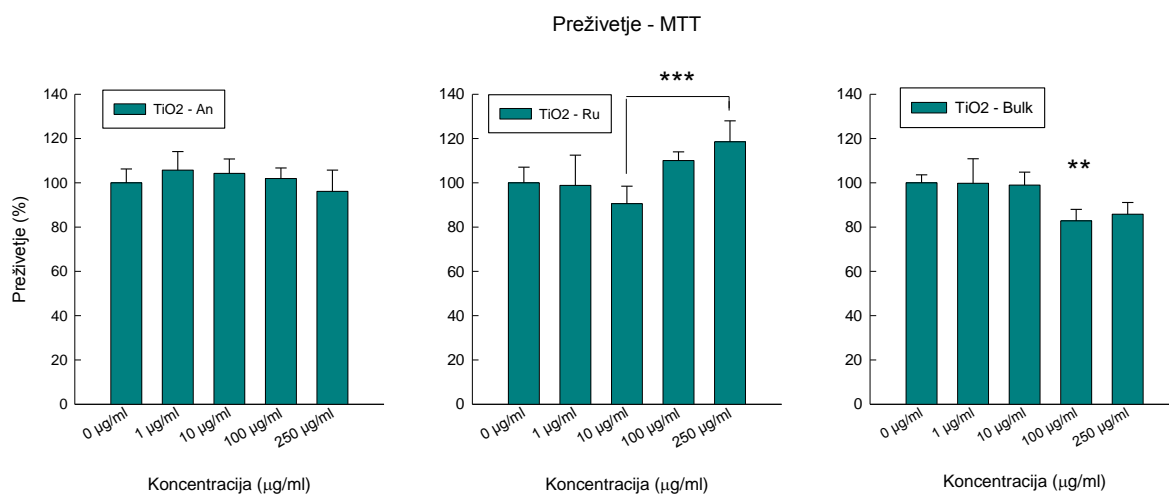
Vrednosti intenzitete fluorescence smo normirali na preživetje celic, ki smo ga izmerili s testom MTT ter s tem dobili vrednosti razmerja indukcije (slika 22). Po 48-urni izpostavitvi 100 µg/ml TiO<sub>2</sub>-An je vrednost razmerja indukcije statistično značilno zmanjšana v primerjavi z vrednostmi pri ostalih koncentracijah. Po izpostavitvi celic 10, 100 in 250 µg/ml TiO<sub>2</sub>-Ru smo opazili statistično značilno povešanje/zmanjšanje vrednosti razmerja indukcije v primerjavi z vrednostmi pri ostalih koncentracijah. Po 48-urni inkubaciji celic s TiO<sub>2</sub>-Bulk je prišlo do povešanja vrednosti razmerja fluorescence le po izpostavitvi koncentraciji 250 µg/ml. Ta vrednost je v primerjavi z ostalimi statistično značilno različna.



**Slika 22: Indukcija fluorescence po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovega dioksida (TiO<sub>2</sub>) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), normirana na preživetje celic dobljeno s testom MTT**

Rezultate smo podali kot razmerje indukcije, kjer je indukcija fluorescence (IF) normirana na preživetje pri posamezni koncentraciji ( $\pm$ STD).\*:  $P < 0,05$ ; statistično značilno povišanje/zmanjšanje vrednosti indukcije fluorescence v primerjavi z vsemi koncentracijami ene vrste TiO<sub>2</sub>.

Pri obdelavi rezultatov preživetja, merjenih s testom MTT (slika 23), smo ugotovili, da po izpostavitvi TiO<sub>2</sub>-An ne pride do večjih razlik v preživetju celic, nobena vrednost ni statistično značilno povišana/zmanjšana. Po izpostavitvi celic TiO<sub>2</sub>-Ru smo opazili statistično značilne razlike med vrednostmi pri koncentracijah 10 µg/ml, kjer je preživetje 90,5%, in 250 µg/ml, kjer je preživetje celic 118,5%. Po izpostavitvi celic TiO<sub>2</sub>-Bulk pride do znižanja preživetja le pri koncentraciji 100 µg/ml, kjer je preživetje le 82%. V primerjavi z negativno kontrolo in vrednostjo pri 1 in 10 µg/ml TiO<sub>2</sub>-Bulk je ta vrednost tudi statistično značilno znižana.



**Slika 23: Preživetje celic po 48-urni izpostavitvi različnim koncentracijam titanovega dioksida (TiO<sub>2</sub>) (0, 1, 10, 100, 250 µg/ml), dobljeno s testom MTT**

Rezultate smo podali v odstotkih preživetja v primerjavi s kontrolo ( $\pm$ STD). \*\*: P < 0,05; statistično značilno zmanjšanje vrednosti preživetja pri koncentraciji 100 µg/ml TiO<sub>2</sub> v primerjavi z vrednostmi preživetja pri koncentracijah 1 in 10 µg/ml; \*\*\*: P < 0,05; statistično značilno povešanje vrednosti preživetja pri koncentraciji 250 µg/ml v primerjavi z vrednostjo preživetja pri koncentraciji 10µg/ml TiO<sub>2</sub>.

## 6 RAZPRAVA IN SKLEPI

V okviru diplomske naloge smo želeli optimizirati, ovrednotiti in preveriti pred kratkim izdelan biosenzorski sistem HepG2p21 DsRed, ki bi ga lahko uporabljali kot hitro presajalno metodo za določanje genotoksičnih lastnosti kemikalij. Testiran biosenzorski sistem temelji na izražanju poročevalskega proteina DsRed, ki je bil predhodno vnešen v celično linijo HepG2. Po Elespuru in sod. (2009) je eden izmed glavnih ciljev razvojnih trendov genotoksičnih testov zaznati čimbolj širok spekter genotoksičnih substanc, delujočih preko različnih mehanizmov, ter s tem podati čimbolj zanesljivo, natančno in obsežno oceno tveganja za ljudi.

V preteklih letih je bilo opisanih več genotoksičnih testov z uporabo sesalskih celic, ki temeljijo na zaznavanju sprememb izražanja poročevalskih genov, ki so sklopljeni z geni, ki se odzivajo na poškodbe DNA (Ohno in sod., 2005; Zhang in sod., 2009; Jagger in sod., 2009; Hastwell in sod. 2006). Gen *p21* je tumor-supresor, ki je uravnavan z genom *p53* in je odgovoren za inhibicijo od ciklina odvisnih kinaz, regulacijo celičnega cikla in sodeluje v popravilnih mehanizmih poškodovane DNA. Spremembe v prepisovanju promotorja za gen *p21* lahko kažejo na genotoksične poškodbe, pa vendar do nedavnega še ni bil uporabljen v testih za zaznavanje genotoksičnosti. Leto dni nazaj so Žager in sod. (Žager in sod., 2010) objavili rezultate raziskave občutljivosti in primernosti sistema s celicami p21HepG2GFP za hitro odkrivanje genotoksičnih snovi ob uporabi promotorja za gen *p21*. Celice p21HepG2GFP in celice HepG2p21 DsRed se med seboj razlikujejo le v uporabljenem poročevalskem genu, ki ima pri prvih zapis za poročevalski protein EGFP, pri drugih pa za DsRed. Fluorescenčni protein GFP in njegove mutante so od odkritja do danes zelo uporabni in cenjeni poročevalski proteini, kljub temu pa imajo nekaj slabosti, kar je vodilo k iskanju zamenjave. GFP je znan po svoji avtofluorescenci, DsRed pa, kot so zapisali Hakkila in sod., avtofluorescira pri nižji emisijski valovni dolžini, kar se odraža v manjšem signalu ozadja v primerjavi z GFP (Hakkila in sod., 2002). Poleg tega ima protein DsRed v primerjavi z GFP, kot so dokazali Baird in sod. (2000), višji ekstinkcijski koeficient in večje kvantno polje, hkrati pa je odporen protipH-ekstremom in barvnem bledenju.

Celice, v katere je bil vstavljen del dednega zapisa tuje celice imenujemo transfecirane celice. Ne glede na način vnosa (virusni vektorji, kemijske ali fizikalne metode), je nemogoče zagotoviti željeno transfekcijo vseh celic v celični populaciji, zato pogosto pride do heterogene populacije transfeciranih in netransfeciranih celic. Druga težava, ki se pojavi pri transfekciji celic, je, da se pri vseh DNA ne vstavi na enaka mesta v genomu. Zato je potrebna ločitev netransfeciranih celic od transfeciranih ter v nadaljnjem koraku izolacija klonov, s katero lahko zaradi nespolnega razmnoževanja celic dobimo genetsko enake potomke posamezne kolonije, ki so primerne za raziskovanje delovanja mutagenih in toksičnih snovi (Puck, 1972:1). Za odkrivanje genotoksičnih lastnosti snovi je primernejša uporaba metode izolacije, saj s tem zmanjšamo morebitne napake in odstopanja, ki se lahko pojavijo ob uporabi neselekcijiranih celičnih kultur. Z izolacijo klonov smo želeli preveriti, ali so izolirane kolonije, zrasle iz manjšega števila celic, bolj primerne za odkrivanje genotoksičnosti, v primerjavi s heterogeno celično linijo HepG2p21 DsRed. Z našo raziskavo smo ugotovili, da so selekcijirani kloni bolj občutljivi za genotoksične lastnosti snovi, saj je pri njih indukcija fluorescence proteina DsRed povišana. Najvišjo indukcijo smo zasledili pri izoliranem klonu F5, kjer je razmerje v primerjavi s kontrolo pri 40 µg/ml koncentraciji MMS 1: 1,49, pri 10 µg/ml koncentraciji MMS pa 1: 1,22. Pri heterogeni celični kulturi smo najvišje razmerje indukcije zasledili v pasaži 7, kjer je razmerje indukcije pri koncentraciji 40 µg/ml MMS v primerjavi s kontrolo 1: 1,34, pri koncentraciji 10 µg/ml MMS 1:1,17. Med 35 izoliranimi kloni smo zasledili dva klona, ki sta imela nizko bazalno vrednost in visoko inducirano vrednost intenzitete fluorescence, kar je pokazalo na višjo občutljivost celic za genotoksično delovanje snovi.

Pri primerjavi intenzitete fluorescence med različnimi pasažami celične linije HepG2p21 DsRed smo želeli preveriti odvisnost fluorescence od števila presajanj celic. V nekaterih virih lahko zasledimo, da je neprimerna uporaba višjih pasaž, saj se morfologija in fiziologija celic spremenita. Hayflick je leta 1968 predlagal, da so sesalske celice zmožne le določenega števila razmnoževalnih ciklov, kar je posledica procesa staranja (Hayflick, 1968, cit. po Puck, 1972:11). Wilkening in Bader (2003) sta glede na dobljene rezultate v raziskavi primerjave primarnih hepatocit in celic hepatoma HepG2 ter vpliva časa izpostavitve kemikalijam na metabolizem zapisala, da sta opazila razlike v izražanju genov med 1–10 pasažo ter da so celice hepatoma HepG2 na izpostavitve BaP najbolj občutljive med 5. in 10. pasažo. Dobljeni

rezultati so pokazali, da presajanje celic do 40. pasaže ne vpliva na intenziteto fluorescence in občutljivost celic.

V zadnjem času je bilo razvitih veliko različnih testov za določanje toksičnosti oziroma genotoksičnosti kemikalij, s katerimi želimo hitro in zanesljivo testirati čim več kemikalij, ki so za naše okolje in nas potencialno škodljive. Za izvedljivost testov so nujno potrebne metode odkrivanja, ki so dovolj občutljive, hitre in natančne za zaznavo signalnih molekul. Dobro poznani metodi odkrivanja sta mikroskopija ter pretočna citometrija, ki pa ne podata kvantitativnih podatkov (mikroskopija) ali pa je priprava vzorcev zahtevna in izvedba meritev dolgotrajna (pretočna citometrija). Zato se uveljavljajo in priporočajo detekcijske naprave ali spektrofleurimetri, s katerimi lahko merimo več vzorcev hkrati ter zaznavamo različne signale (fluorescenca, luminiscenca, absorbanca). Če želimo lastnosti neke snovi čimbolje definirati, je trebanajprej preveriti in ovrednotiti metodo odkrivanja. Tako smo v okviru diplomske naloge testirali in ovrednotili različne spektrofleurimetre, pri katerih smo občutljivost posameznega ocenjevali na podlagi zaznavanja intenzitete fluorescence izraženega poročevalskega proteina DsRed. Spektrofleurimetri so se razlikovali glede na proizvajalca in glede na optično-zaznavni sistem. Z dobljenimi rezultati smo ugotovili, da je monokromatorski optični sistem bolj občutljiv, hitrejši in primernejši za merjenje fluorescence poročevalskih proteinov. V okviru naše študije merjenja intenzitete fluorescence celičnega biosenzorskega sistema se dobljeni rezultati ne ujemajo s trditvami proizvajalcev, ki pravijo, da je filtrski sistem občutljivejši, medtem ko je monokromatorski sistem le hitrejši.

Superparamagnetni nanodelci, ki vsebujejo železov oksid (SPIONs) se v zadnjem času uporabljajo predvsem na področju zdravstva predvsem onkologije. Ti nanodelci niso vzbudili veliko pozornosti le zaradi superparamagnetnih lastnosti, ampak tudi zato, ker so bili prikazani kot nizko toksični v človeškem telesu (Hussain in sod., 2005; Jeng in Swanson; 2006). V naši raziskavi smo želeli preveriti njihovo potencialno genotoksičnost z uporabo biosenzorskega testnega sistema HepG2p21 DsRed. Železo in njegova oksidacijska stanja ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) so nujno potrebna za normalen potek celičnega cikla in rasti celic. Kelacija znotrajceličnega železa se lahko odraža v apoptozi in fragmentaciji DNA (Fukuchi in sod., 1994; Porreca 1994). Ob povečanju znotrajceličnega prostega železa lahko pride do oksidativnega stresa in celičnih poškodb zaradi tvorbe reaktivnih zvrsti kisika (ROS angl.



reactive oxygen species) ter s tem do poškodb DNA ali celične smrti (Emrit in sod., 2001; Gutteridge in sod., 1982). Rezultati naše raziskave so pokazali, da superparamagnetni nanodelci železovega oksida, prevlečeni s poliakrilno kislino, pri koncentraciji 1,2  $\mu\text{g/ml}$  nimajo genotoksičnih lastnosti, saj nismo ugotovili statistično značilnega povišanja indukcije fluorescence. Prav tako pri dobljenih rezultatih nismo opazili morebitne citotoksičnosti, saj ni prišlo do statistično značilnega zmanjšanja preživetja v primerjavi s kontrolo. Podobne rezultate so dobili Arbab in sod. (2003) na celični liniji HeLa, koso poskušali ugotoviti biofizikalne ter metabolne značilnosti celic, označenih s superparamagnetnimi železovimi nanodelci (SPIO angl. superparamagnetic iron oxide). Testirani nanodelci, uporabljeni v njihovi raziskavi, so bili prevlečeni z dekstranom. Po inkubaciji celic z nanodelci niso zaznali oksidativnih poškodb celic, s čimer so ugotovili, da ne pride do kratkoročnih oziroma dolgoročnih toksičnih učinkov na sesalske celice. Z ugotavljanjem preživetja celic s testom MTT so ugotovili, da se viabilnost celic po izpostavitvi nanodelcem ne spremeni. V nasprotju s tem so Auffan in sod. (2006) v svoji raziskavi zasledili genotoksičen učinek z meso-2,3-dimerkaptosucinično kislino (DMSA angl. meso-2,3-dimercaptosuccinic acid) prevlečenih SPION pri koncentracijah 10–100  $\mu\text{g/ml}$ , medtem ko citotoksičnosti niso zaznali. Naqvi in sod. (2010) so v svoji raziskavi testirali različne koncentracije (25, 100, 200, 300, 400, 500  $\mu\text{g/ml}$ ) s Tween 80 prevlečenih SPION na celični liniji makrofagov (J774) in ugotovili, da visoke koncentracije nanodelcev inducirajo ROS oksidativni stres v celici, kar se lahko odraža v poškodbah celic in celični smrti.

Ena izmed najbolj uporabljenih vrst nanodelcev je sestavljena iz titanovega dioksida ( $\text{TiO}_2$ ).  $\text{TiO}_2$  delci, ki so večji od nanometerskih oblik ( $>100\text{nm}$ ), so klasificirani kot biološko inertni v ljudeh in živalih (Chen in Fayweweather, 1988; Bernard in sod., 1990) in so široko uporabljeni kot beli pigmenti v industriji barv, papirja, plastike, keramike in kot prehranski aditivi (Nordman in Berlin, 1986; Gurr in sod., 2005). Zaradi močne absorpcije UV-sevanja so  $\text{TiO}_2$  primerni za uporabo v kozmetični industriji (Gelis in sod., 2003), vendar pa lahko, kljub svoji uporabnosti, povzročijo oksidativni stres ter posledično vrsto toksičnih učinkov na različne celice in tkiva (Zhang in Sun, 2004; Gurr in sod., 2005; Hussain in sod., 2005), vključno s poškodbami DNA (Gurr in sod., 2005), vnetnimi reakcijami (Grassian in sod., 2007), fibrozo (Baggs in sod., 1997) in poškodbo pljuč (Park in sod., 2009).

V naši raziskavi smo želeli preveriti genotoksičnost in citotoksičnost titanovih nanodelcev z uporabo biosenzorskega sistema HepG2p21 DsRed. Pri testiranju smo ugotovili, da so vrednosti inducirane fluorescence povišane pri najvišjih koncentracijah TiO<sub>2</sub>-An in TiO<sub>2</sub>-Bulk ter pri koncentraciji 10 µg/ml TiO<sub>2</sub>-Ru, ko so te normirane na preživetje, merjeno z metodo Alamar Blue. Pri tej metodi je koncentracija 250 µg/ml TiO<sub>2</sub>-An (64%) in TiO<sub>2</sub>-Bulk (35,1%), sodeč po rezultatih, citotoksična, kar se ne sklada z rezultati raziskave, ki so jo opravili Petković in sod. (2010), ki so pokazali, da izpostavitve celic HepG2 titanovim nanodelcem ne kaže zmanjšane viabilnosti in preživetja celic. Po izpostavitvi celic nanodelcem TiO<sub>2</sub> ter po uporabi testa MTS za preverjanje preživetja smo ugotovili statistično značilno povišane vrednosti inducirane fluorescence le pri 1 µg/ml TiO<sub>2</sub>-Ru ter pri 10 µg/ml TiO<sub>2</sub>-Bulk, kljub temu da pri tej koncentraciji ni prišlo do statistično značilne spremembe v preživetju. Hkrati je bila pri najvišjih koncentracijah vseh testiranih nanodelcev zaznana statistično značilna zmanjšana vrednost indukcije fluorescence. Po merjenju s testom MTT se število celic v času inkubacije s TiO<sub>2</sub> ni bistveno spremenilo, do povišanja vrednosti fluorescence je prišlo po izpostavitvi celic 250 µg/ml TiO<sub>2</sub>-Bulk in 10 µg/ml TiO<sub>2</sub>-Ru. Iz tega bi lahko sklepali, da nanodelci TiO<sub>2</sub> lahko inducirajo oksidativne poškodbe DNA in zato so genotoksični. Petković in sod. so zapisali, da TiO<sub>2</sub> povečajo oksidativno poškodbo DNA, ki je povezana s produkcijo intracelularnih ROS, ter da izpostavitve celic TiO<sub>2</sub> inducira spremembe v izražanju p53 ter posledično v izražanju zaščitnih genov, kot so *p21*, *gadd45a* in *mdm2*, kar je dokaz, da so nanodelci TiO<sub>2</sub> genotoksični. Podobno so prikazale raziskave, ki so jih opravili Turkez in Geyikoglu (2007) ter Thevenot in sod. (2008). Pri prvi so ugotovili, da so nanodelci TiO<sub>2</sub> genotoksično dejavni zaradi indukcije zamenjave sestrskih kromatid in tvorbe mikronukleusov v človeških belih krvničkah. Thevenot in sod. so ugotovili, da sama kemijska sestava površine TiO<sub>2</sub> igra pomembno vlogo pri povečanju oziroma zmanjšanju genotoksičnosti. To raziskavo potrjuje tudi delo Petković in sod., ki pravijo, da je opažena razlika v delovanju TiO<sub>2</sub>-An in TiO<sub>2</sub>-Ru na celice HepG2, saj naj bi na njuno delovanje vplivala tudi velikost nanodelca in njegova kristalinična struktura. Pri tem naj bi bili TiO<sub>2</sub>-Ru bolj genotoksični v primerjavi s TiO<sub>2</sub>-An, kar se ujema z našimi rezultati. Tudi Battacharya in sod. (2009) so TiO<sub>2</sub> nanodelce prikazali kot ne-citotoksične v primeru celic pljučnega epitelija (BEAS-2B), medtem ko se je pokazalo statistično značilno zmanjšanje preživetja pljučnih fibroblastov (IMR-90), še posebej po daljšem času izpostavitve. V nasprotju s prej omenjenimi raziskavami v njihovi raziskavi niso zasledili genotoksičnosti

TiO<sub>2</sub> pri nobeni od testiranih celičnih linij z uporabo testa Komet (ni prelomov DNA), so pa potrdili nastajanje ROS in s tem povezani oksidativni stres. Po merjenju preživetja celic s testom Alamar Blue, smo ugotovili, da se rezultati ne ujemajo z rezultati, ki smo jih dobili s testoma MTS in MTT. S tem smo predpostavili, da test Alamar Blue ni primeren za določanje preživetja celic v primeru, ko so snovi katerimi izpostavimo celice netopne.

Diplomsko nalogo smo zaključili z naslednjimi sklepi:

- S selekcijo in izolacijo klonov celične linije HepG2p21 DsRed smo izolirali klon, ki je zelo občutljiv za genotoksične lastnosti spojin.
- Do 40 presajanj celic (40 pasaž) ne vpliva na stopnjo občutljivosti celic HepG2p21 DsRedin na njihovo morfologijo oziroma fiziologijo.
- Zaznava genotoksičnosti spojin z uporabo biosenzorskega sistema HepG2p21 DsRed je odvisna od vrste sprektrofluorimetra ter od optično-zaznavnega sistema.
- Biosenzorski sistem HepG2p21 DsRed je primeren za določevanje genotoksičnosti različnih vrst nanodelcev.
- Test Alamar Blue, s katerim določamo viabilnost in preživetje celic, ni primeren za ugotavljanje preživetja celic, kadar je testirana snov netopna (netopen titanov dioksid).

## 7 POVZETEK

Vsakodnevno smo izpostavljeni mnogim dejavnikom, ki povzročajo poškodbe DNA in imajo potencialno mutagen učinek, kar lahko vodi tudi v nastanek rakastih obolenj. Takšne dejavnike je treba prepoznati in oceniti, kakšno tveganje za človekovo zdravje predstavljajo. Za ocenitev tveganja je treba razviti metode, ki bodo zagotovile hitro in natančno določitev lastnosti kemikalij ter njihovega vpliva na zdravje ljudi.

Metabolno aktivne celice človeškega hepatoma HepG2, transfecirane s plazmidom, z zapisom za protein DsRed, ki je uravnavan s promotorjem *p21* (HepG2p21 DsRed), smo poskušali optimizirati in ovrednotiti z izolacijo klonov, številom pasaž ter z uporabo različnih vrstami spektrofotometrov z uporabo MMS in BaP. Celice smo za preverjanje primernosti biosenzorskega sistema izpostavili tudi različnim vrstam nanodelcev –SPIONs ter TiO<sub>2</sub> (TiO<sub>2</sub>-An, TiO<sub>2</sub>-Ru, TiO<sub>2</sub>-Bulk). Preživetje celic smo določali z metodo Alamar Blue, pri delu s titanovimi nanodelci smo preživetje preverjali tudi z metodama MTS in MTT.

Rezultati naše raziskave so pokazali, da so izolirani kloni celične linije občutljivejši in bolj odzivni na genotoksičnost snovi kot heterogena, neselekcioniрана celična linija. Pri primerjavi intenzitete fluorescence med posameznimi pasažami smo ugotovili, da ta ni odvisna od števila presajanj celic. Rezultati, dobljeni med validacijo spektrofotometrov, so pokazali, da je zaznava poročevalski proteina DsRed oziroma intenzitete njegove fluorescence odvisna od vrste in občutljivosti spektrofotometra. S testiranjem nanodelcev (SPIONs, TiO<sub>2</sub>) smo ugotovili, da je poročevalski sistem HepG2p21 DsRed primeren za odkrivanje genotoksičnosti nanodelcev in datest Alamar Blue ni primeren za merjenje viabilnosti celic, kadar je testirana snov netopna.

Z diplomsko nalogo smo optimizirali in ovrednotili biosenzorski sistem humanega hepatoma HepG2p21 DsRed ter prikazali, da je sistem občutljiv in zanesljiv za merjenje genotoksičnosti različnih snovi, tudi nanodelcev.

## 8 VIRI

- Aden D.P., Fogel A., Plotkin S., Damjanov I., Knowles B.B. 1979. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*, 282: 615–616.
- Ames B., Lee F.D., Durston W.E. 1973. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70: 782–786
- Arbab A.S., Bashaw L.A., Miller B.R., Jordan E.K., Lewis B.K., Kalish H., Frank J.A. 2003. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology*, 229: 838–846
- Arun K.H.S., Kaul C.L., Ramarao P. 2005. Green fluorescent proteins in receptor research: A emerging tool for drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51: 1–23
- Auffan M., Decome L., Rose J., Orsiere T., De Meo M., Briois V., Chaneac C., Olivi L., Bergelefranc J.L., Botta A., Wiesner M.R., Bottero J. 2006. In vitro interactions between DMSA-coted maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physicochemical and cytotoxicological study. *Environ Sci Technol*, 40: 4367–4373
- Baan R.A., Zaalberg O.B., Fichtinger-Schepman A.M., Muysken-Schoen M.A., Lansbergen M.J., Lohman P.H. 1985. Use of monoclonal and polyclonal antibodies against DNA adducts for the detection of DNA lesions in isolated DNA and in single cells. *Environ Health Persp*, 62: 81–88
- Bagg R.B., Ferin J., Obersdörster G. 1997. Regression of pulmonary lesions produced by inhaled titanium dioxide in rats. *Vet Pathol*, 34: 592–597
- Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci*, 97: 11984–11989
- Battershill J.M., Fielder R.J. 1998. Mouse-specific carcinogens: an assessment of hazard and significance for validation of short-term carcinogenicity bioassays in transgenic mice. *Hum Exp Toxicol*, 17: 193–205
- Belkin S., Smulski D.R., Dadon S., Vollmer A.C., Van Dyk T.K., Larossa R.A. 1997. A panel of stress-responsive luminous bacteria for the detection of selected classes of toxicants. *Water Res*, 31: 3009–3016
- Belkin S. 2003. Microbial whole-cell sensing systems of environmental pollutants. *Curr Opin Microbiol*, 6: 206–212
- Beranek D.T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating-agents. *Mutat Res*, 231: 11–30

- Bernard B.K., Osheroff M.R., Hofmann A., Mennear J.H. 1990. Toxicology and carcinogenesis studies of dietary titanium dioxide-coated mica in male and female Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health*, 29: 417–429
- Bevis B.J., Glick B.S. 2002. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat Biotechnol*, 20: 83–87
- Bhattacharya K., Davoren M., Boertz J., Schins R.P.F., Hoffman E., Dopp E. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-brakeage in human lung cells. *Particle and fibre Toxicol*, 6:17
- Birrell L., Cahill P., Hughes C., Tate M., Walmsley R.M. 2010. GADD45a-GFP GreenScreen HC assay results for the ECVAM recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of new genotoxicity tests. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 695:87–95
- Celični sistem za hitro zaznavanje in določanje genotoksičnosti. Patentna prijava P2010000072, Urad RS za industrijsko lastnino
- Chen J.L., Fayerweather W.E. 1988. Epidemiologic study of workers exposed to titanium dioxide. *J Occup Med* 30:937–942
- Clark L.C., Lyons C. 1962. Electrode systems for monitoring in cardiovascular surgery. *Ann NY Acad Sci*, 102: 29–45
- Corvi R., Albertini S., Hartung T., Hoffmann S., Maurici D., Pfuhler S., van Benthem J., Vanparys P. 2008. ECVAM retrospective validation of *in vitro* micronucleus test (MNT). *Mutagenesis*, 23: 271–283.
- Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assay in culture. *Cancer Commun*, 3: 207–12
- Cubitt A. B., Heim R., Adams S. R., Boyd A. E., Gross L. A., Tsien R. Y. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, 20: 448–455
- Dearfield K.L. 1995. Information requirements and regulatory approaches for heritable genetic risk assessment and risk communication. *Mutat Res*, 330: 35–40
- Drummond T.G., Hill M.G., Barton J.K. 2003. Electrochemical DNA sensors. *Natur Biotech*, 21: 1192-1199
- The German Institute for Standardization (DIN). 1999. 38415–3
- Ehrmann, M.A., Scheyhing, C.H., Vogel, R.F. 2001. In vitro stability and expression of green fluorescent protein under high pressure conditions. *Lett Appl Microbiol*, 32: 230–234
- Elespuru R.K., Agarwal R., Atrachi A.H., Bigger C.A.H., Heflich R.H., Jagannath D.R., Levy D.D., Moore M.M., Ouyang Y., Robison T.W., Sotomayor R.E., Cimino M.C., Dearfield

- K.L. 2009. Current and future application of genetic toxicity assays: The role and value of in vitro mammalian assays. *Toxicological Sciences*, 109: 172–179
- Ellinger-Ziegelbauer H., Stuart B., Wahle B., Bomann W., Ahr H.J. 2004. Characteristic expression profiles induced by genotoxic carcinogens in rat liver. *Toxicological Sciences*, 77: 19–34
- Emrit J., Beaumont C., Trivin F. 2001. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomed Pharmacother*, 55: 333–339
- Farre M., Kantiani L., Perez S., Barcelo D. 2009. Sensors and Biosensors in Support of EU Directives. *Anal Chem*, 28, 2: 170–185
- Fukuchi K., Tomoysau S., Tsuruoka N., Gomi K. 1994. Iron deprivation-induced apoptosis in HL-60 cells. *FEBS Lett*, 350: 139–142
- Galloway S. 2000. Cytotoxicity and chromosome aberration in vitro: Experience in industry and the case for upper limit on toxicity in the aberration assay. *Environ and Molecul Mutagen*, 35: 191–201
- Gelis C., Girard S., Mavon A., Delverdier M., Paillous N., Vicendo P. 2003. Assesment of the skin photoprotective capacities of an organo-mineral broad-spectrum sunblock on two ex vivo skin models. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 19: 242–253
- Giuliano K.A., Taylor D.L. 1998. Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery. *Trends Biotechnol*, 16: 135–140
- Grassian V.H., Oshaughnessy P.T., Adamcakova-Dodd A., Pettibone J.M., Thome P.S. 2007. Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect*, 115: 397–402
- Greenwood, N. N. in Earnshaw, A. (1997). *Chemistry of the Elements*. Oxford, Butterworth-Heinemann
- Gubbin S. Introduction. In: Gubbin S, editor. *Magnetic nanoparticles*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009, 1–24
- Gu M.B., Mitchell R.J., Kim B.C. 2004. Whole-Cell-Based Biosensors for Environmental Biomonitoring and Application. *Adv Biochem Eng Biot*, 87: 269–305
- Gurr J.R., Wang A.S., Chen C.H., Jan K.Y. 2005. Ultra fine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213:66–73
- Gutteridge J.M., Rowley D.A., Halliwell B. 1982. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radical and lipid peroxidation in the presence of iron salt: detection of catalytic iron and antioxidant activity in extracellular fluids. *Biochem J*, 206: 605–609

- Hakkila K., Maksimow M., Krarp M., Virta M. 2002. Reporter genes *lucFF*, *luxCDABE*, *gfp* and *dsred* have different characteristics in whole-cell based bacterial sensors. *Analytical Biochem*, 301:235–242
- Hastwell P.W., Chai L.L., Roberts K.J., Webster T.W., Harvey J.S., Rees R.W., Walmsley R.M. 2006. High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: Validation of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity assay. *Mutat Res*, 607:160–175
- Henriques C., Moreira T.L.B., Maia-Brigagão C., Henriques-Pons A., Carvalho T.M., De Souza W. 2011. Tetrazolium salt based methods for high-throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy. *Anal Methods, Advance Article*
- Hubbard S. A., Green M. H. L., Gatehouse D., and Bridges J. W. 1984. The fluctuation test in bacteria. In Kilbey B. J., Legator M., Nichols W., Ramel C., editors, 142–160. *Handbook of mutagenicity test procedures*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford
- Hussain S.M., Hess K.L., Gearhart J.M., Geiss K.T., Schlager J.J. 2005. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro*, 19: 975–983
- Jagger C., Tate M., Cahill P.A., Hughes C., Knight A.W., Billinton N., Walmsley R.M. 2009. Assessment of the genotoxicity of S9-generated metabolites using the GreenScreen HC *GADD45a-GFP* assay. *Mutagenesis*, 24: 35–50
- Jaiswal A.S., Narayan S. 2002. S(N)2 DNA-alkylating agent-induced phosphorylation of p53 and activation of p21 gene expression. *Mutat Res-Fund Mol M*, 500: 17–30
- Jakobs S., Subramaniam V., Schölne Jovin T.M., Hell S.W. 2000. EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Letters*, 479: 131–135
- Jayarajah C.N., Thompson M. 2002. Signaling of transcriptional chemistry in the on-line detection format. *Biosens Bioelectron*, 17: 159–171
- Jeng H.A., Swanson J. 2006. Toxicity of metal nanoparticles in mammalian cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 41: 2699–2711
- Keane A., Phoenix P., Ghoshal S., Lau P.C.K. 2001. Exposing culprit organic pollutants: A review. *J Microbiol Meth*, 49: 103–119
- Knasmüller S., Mersch-Sundermann V., Kevekordes S., Darroudi F., Huber W.W., Hoelzl C., *et al.* 2004. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, 198: 315–328
- Knight A.W., Birrell L., Walmsley R.M. 2009. Development and validation of a higher throughput screening approach to genotoxicity testing using the GADD45a-GFP GreenScreen HC Assay. *Journal of Biomolecular Screening*, 14: 16–30.



- Lawley P.D. 1989. Mutagens as carcinogens – development of current concepts. *Mutat Res*, 213: 3–25
- Li X., Zhao X., Fang Y., Jiang X., Duong T., Fan C., Huang C.C., Kain S.R. 1998. Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter. *J Biol Chem*, 273: 34970-34975
- Macleod, K., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., and Jacks, T. (1995). p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.* 9, 935–944.
- Martin J., Dufour J.F. 2008. Tumor suppressor and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*; 14(11): 1720–1733
- Miller B., Potter-Locher F., Seelbach A., Stopper H., Utesch D. and Madle S. 1998. Evaluation of the *in vitro* micronucleus test as an alternative to the *in vitro* chromosome aberration assay: position of the GUM working group on the *in vitro* micronucleus test. *Mutat Res*, 410: 81–116
- Mizota T., Ohno K., Yamada T. 2011. Validation of genotoxicity test based on p53R2 gene expression in human lymphoblastoid cells. *Mutat Res*, 724: 76–85
- Monro A. 1996. Are lifespan rodent carcinogenicity studies defensible for pharmaceutical agents? *Exp Toxicol Pathol*, 48: 155–166
- Naqvi S., Samim M., Abdin M.Z. in sod. 2010. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. *International journal of Nanomedicine*, 5: 983–989
- Naylor L.H. 1999. Reporter gene technology: The future looks bright. *Biochemical Pharmacology*, 58: 749–757
- Nordman H., Berlin M. 1986. Titanium. In: Friberg L, Nordberg G.F., Vouk V.B., editors. *Handbooks on the toxicology of metals*. Vol. II. Amsterdam: Elsevier. 595–609
- 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. *Eur J Biochem*, 267: 5421–5426
- Ohno K., Tanaka-Azuma Y., Yoneda Y., Yamada T. 2005. Genotoxicity test system based on p53R2 gene expression in human cells: Examination with 80 chemicals. *Mutation Research, Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 588: 47–57
- Ormo M., Cubitt A. B., Kallio K., Gross L. A., Tsien R. Y., Remington S. J. 1996. Crystal structure of the *Aquorea victoria* green fluorescent protein. *Science*, 273: 1392–1395.

- Östling O. in Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 123: 291–298.
- Pancrazio J.J., Whelan J.P., Borkholder D.A., Ma W., Stenger D.A. 1999. Development and Application of Cell-Based Biosensors. *Annals Biomed Engin*, 27: 697–711
- Park E.-J., Yoon J., Choi K., Yi J., Park K. 2009. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. *Toxicology*, 260: 37–46
- Perlow R.A., Kolbanovskii A., Hingerty B.E., Geacintov N.E., Broyde S., Scicchitano D.A. 2002. DNA adducts from a tumorigenic metabolite of benzo[a]pyrene block human RNA polymerase II elongation in a sequence- and stereochemistry-dependent manner. *Journal of Molecular Biology*, 321: 29–47.
- Petković J., Žegura B., Stevanović M., Drnovšek N., Uskoković D., Novak S., Filipič M. 2010. DNA damage and alternations in expression of DNA damage responsive gene induced by TiO<sub>2</sub> nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicol*, 1–13
- Pohanka M., Skladal P. 2008. Electrochemical biosensors principles and applications. *J Appl Biomed*, 6: 57–64
- Porreca E., Uchino S., Di Febbo C., Di Bartolomeo N., Angelucci D., Napolitano A.M., Mezzeti A., Cuccurullo F. 1994. Antiproliferative effect of desferrinoxamine on vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb*, 14: 299–304
- Prijic S., Serša G. 2011. Magnetic nanoparticles as target delivery systems in oncology. *Review. Radiol Oncol*, 45: 1-16
- REACH- Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals; Official Journal No L 396, 30/12/2006, str. 0001-0849
- Rechsteiner M., Rogers S.W. 1996. PEST sequence and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci*, 21: 267-271
- Ron E.Z. 2007. Biosensing environmental pollution. *Curr Opin Biotech*, 3, 18: 252–256
- Sadikovic B., Rodenhiser D.I. 2006. Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. *Toxicol Appl Pharm*, 216: 458–468
- Scheller F.W., Wollenberger U., Warsinke A., Lisdat F. 2001. Research and development in biosensors. *Curr Opin Biotech*, 12: 35–40
- Schmid W. 1973. Chemical mutagen testing on in vivo somatic mammalian cells. *Inflammation research*, 3:77-85
- Siafakas R.A. in Richardson D.R. 2009. Growth arrest and DNA-damage – 45 alpha (GADD45 $\alpha$ ). *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41: 986–989

- Sionov R.V., Haupt Y. 1999. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene*, 18: 6145–6157
- Soper S.A., Brown K., Ellington A., Frazier B., Garcia-Manero G., Gau V., Gutman S.I., Hayes D.F., Korte B., Landers J.L., Larson D., Ligler F., Majumdar A., Mascini M., Nolte D., Rosenzweig Z., Wang J., Wilson D. 2006. Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Biosens Bioelectron*, 21: 1932–1942
- Sørensen S.J., Burmølle M., Hansen L.H. 2006. Making bio-sense of toxicity: new developments in whole-cell biosensors. *Curr Opin in Biotech*, 17: 11–16
- Tanaka H., Arakawa H., Yamaguchi T., Shiraishi K., Fukuda S., Matsui K., Takei Y., Nakamura Y. 2000. A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*, 404:42–49
- Tereskikh A., Fradkov A., Ermakova G., Zaraisky A., Tan P., Kajava A. V., Zhao X., Lukyanov S., Matz M., Kim S., Weissman I., Siebert P. 2000. »Fluorescent timer«: Protein that change color in time. *Science*, 290: 1585–1588
- Thevenot P., Cho J., Wavhal D., Timmons R.B., Tang L. 2008. Surface chemistry influencees cancer killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Nanomedicine*, 4: 226–236
- Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of immunological methods*, 65: 55–63
- Tsien R.Y. 1998. The green fluorescent protein. *Ann Rev Biochem*, 67: 509–544
- Turkez H., Geyikoglu F. 2007. An in vitro blood culture for evaluating the genotoxicity of titanium dioxide: the response of antioxidant enzymes. *Toxicol Ind Health*, 23: 19–23
- Turner A.P.F., Karube I., Wilson G.S. (Eds.). 1987. *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press. Oxford; str.770
- Van der Lelie D., Regniers L., Borremans B., Provoost A., Verschaeve L. 1997. *Mutat Res*, 389: 279–290
- Velasco-Garcia M.N., Mottram T. 2003. Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystem engineering*, 84: 1–12
- Verkhushka V.V., Lukyanov K.A. 2004. The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat Biotechnol*, 22: 289–296
- Verkhushka V.V., Kuznetsova I.M., Stepanenko O.V., Zaraisky A.G., Shavlovsky M.M., Turoverov K.K., Uversky V.N. 2003. High Stability of Discosoma DsRed As Compared to Aequorea EGFP. *Biochemistry*, 26: 7879–7884
- Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408: 307–310

- Vollmer A.C., Belkin S., Smulski D.R., Dyk T.K.V., LaRossa R.A. 1997. Appl. Environ. Microbiol, 63: 2566–2571
- Wang A., Gu J., Judson-Kremer K., Powell K.L., Mistry H., Simhambhatla P., *et al.* 2003. Response of human mammary epithelial cells to DNA damage induced by BPDE: involvement of novel regulatory pathways. Carcinogenesis, 24: 225–234
- Walmsley R.M., Billinton N. and Heyer W.-D. 1997. Green fluorescence protein as a reporter for DNA damage-induced gene RAD45 in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 13: 1535–1545
- Wilkening S., Stahl F., Bader A. 2003. Comparison of primary hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. Drug Metabolism and Disposition, 31: 1035–1042.
- Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Savitsky A.P., Fradkov A.F., Gurskaya N.G., Bulina M.E., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. 2002. A strategy for the generation of non-aggregating mutants of *Anthozoa* fluorescent proteins. FEBS Lett, 511: 11–14
- Zhang G., Gurtu V., Kain S.R. 1996. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun, 227: 707–711
- Zhang R., Niu Y.J., Do H.R., Cao X.W., Shi D., Hao Q.L., *et al.* 2009. A stable and sensitive testing system for potential carcinogens based on DNA damage-induced gene expression in human HepG2 cell. Toxicol in Vitro, 23: 158–165
- Zhang A.P., Sun Y.P. 2004. Photocatalytic killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles Ls-174-t Human colon carcinoma cells. World J Gastroenterol 10: 3191–3193
- Zhou B.-B.S., Elledge S.J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. Nature, 408: 433–439
- Zhou X.C., Huang L.Q., Yau Li S.F. 2001. Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis. Biosens Bioelectron, 16: 85–95
- Žager V., Čemazar M., Hreljac I., Lah T.T., Serša G., Filipič M. 2010. Development of human cell biosensor system for genotoxicity detection based on DNA damage-induced gene expression. Radiology and Oncology, 44: 42–51

**Dodatna literatura:**

- Puck T.T. 1972. The mammalian cell as a microorganism. Genetic and Biochemical studies *in vitro*. San Francisco, Holden-Day, Inc.: str. 219

Žager V. 2011. Development of whole cell biosensor system for detection of genetic damage. Dissertation. Univerza v Novi Gorici.

<http://www.jaist.ac.jp/~yokoyama/biosensor.html>(15.6.2011)

[http://www.dojindo.com/home/index.php?page=shop.product\\_details&flypage=flypage.tpl&product\\_id=457&category\\_id=62&option=com\\_virtuemart&Itemid=58](http://www.dojindo.com/home/index.php?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=457&category_id=62&option=com_virtuemart&Itemid=58) (17.7.2011)

<http://de.wikipedia.org/wiki/Resazurin> (17.7.2011)

## ZAHVALA

Najprej se želim zahvaliti mentorici prof.dr. Maji Čemažar za dano možnost opravljanja diplomske naloge na Onkološkem inštitutu, na Oddelku za eksperimentalno onkologijo, ter za vso strokovno pomoč in spodbudo, ki mi jo je nudila. Zahvaljujem se tudi prof.dr. Gregorju Serši za spodbudo, pomoč in zanimanje za moje delo.

Posebej lepo se želim zahvaliti Miri Lavrič, ki me je od samega začetka usmerjala in mi dajala spodbudne besede za naprej.

Velika zahvala gre ekipi mladih raziskovalcev in zaposlenih Oddelka eksperimentalne onkologije, ki so mi olajšali in polepšali marsikateri dan z nudenjem pomoči, znanja in dobre volje. Lepo se zahvaljujem prof. dr. Metki Filipič, dr. Bojani Žeguri in dr. Jani Petković z Nacionalnega inštituta za biologijo, Oddelka za genetsko toksikologijo in biologijo raka, za pomoč pri delu in podajanje novega znanja.

Velika hvala članici komisije in recenzentki doc.dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za strokovni pregled diplomske naloge. Hvala predsednici komisije prof. dr. Darji Žgur Bertok za pregled diplomske naloge.

Najbolj se zahvaljujem moji družini, mojemu Lukcu in prijateljem, ki so mi stali ob strani skozi celoten študij biologije, me spodbujali, podpirali, nasmejali in mi neprestano ponavljali, da za vsakim dežjem posije sonček☺...