

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sabina BOLJTE

**UPORABA SVETLOBNE MIKROSKOPIJE IN
RAČUNALNIŠKE ANALIZE SLIK PRI ŠTUDIJU
MORFOLOŠKIH TRANSFORMACIJ LIPIDNIH
VEZIKLOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Sabina BOLJTE

**UPORABA SVETLOBNE MIKROSKOPIJE IN RAČUNALNIŠKE
ANALIZE SLIK PRI ŠTUDIJU MORFOLOŠKIH TRANSFORMACIJ
LIPIDNIH VEZIKLOV**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**APPLICATION OF LIGHT MICROSCOPY AND COMPUTER AIDED
IMAGE ANALYSIS IN A STUDY OF MORPHOLOGICAL
TRANSFORMATION OF LIPID VESICLES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

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

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Damjano Drobne.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH, recenzent
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Član: prof. dr. Aleš IGLIČ, somentor
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko

Datum zagovora:

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

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sabina Boljte

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 577.11:576.3(043.2)=163.6
KG	Fulereni C ₆₀ /POPC lipidni vezikli/morfološka transformacija GUV/fazno kontrastna mikroskopija/računalniška analiza slik/avtomatska segmentacija slik
AV	BOLJTE, Sabina
SA	DROBNE, Damjana (mentor)/IGLIČ, Aleš (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2011
IN	UPORABA SVETLOBNE MIKROSKOPIJE IN RAČUNALNIŠKE ANALIZE SLIK PRI ŠTUDIJU MORFOLOŠKIH TRANSFORMACIJ LIPIDNIH VEZIKLOV
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 64 str., 2 pregl., 19 sl., 0 pril., 102 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V okviru diplomskega dela smo proučevali vpliv fullerenov C ₆₀ na umetne lipidne membrane POPC, natančneje na orjaške unilamelarne vezikle (GUV). Razviti smo želeli metodo za preučevanje morfoloških transformacij večje populacije lipidnih veziklov. Za opazovanje interakcij med membranami in nanodelci smo uporabili fazno-kontrastno mikroskopijo in računalniško analizo slik. Zaradi zamudne obdelave podatkov smo računalniško analizo slik želeli avtomatizirati. Ugotovili smo, da fulereni C ₆₀ vplivajo na številčnost in morfološko transformacijo veziklov GUV. Že v prvih 10 minutah inkubacije je suspenzija C ₆₀ povzročila pokanje približno dveh tretjin veziklov GUV, po 120 minutni inkubaciji pa se je spremenilo relativno razmerje med posameznimi oblikami veziklov. Rezultati so doprinos k razumevanju dinamike procesa transformacije oblik veziklov GUV in njihove interakcije z nanodelci, avtomatska analiza slik pa na tej stopnji raziskav še ni bila zadostna in ročne analize ni mogla nadomestiti.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 577.11:576.3(043.2)=163.6

CX Fullerenes C₆₀/POPC lipid vesicles/GUV morphological transformation/phase contrast microscopy/computer assisted image analysis /automatic image segmentation

AU BOLJTE, Sabina

AA DROBNE, Damjana (supervisor)/IGLIČ, Aleš (co-supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Biological Department

PY 2011

TI APPLICATION OF LIGHT MICROSCOPY AND COMPUTER AIDED IMAGE ANALYSIS IN MORFOLOGICAL LIPID VESICLES TRANSFORMATION STUDY

DT Graduation Thesis (University studies)

NO X, 64 p., 2 tab., 19 fig., 0 ann., 102 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Effects of fullerenes C₆₀ on artificial POPC lipid membranes, more specific on gigant unilamellar vesicles (GUVs), were investigated in the thesis. The aim of our work was to develop methodology for larger lipid vesicles population morphological transformations study. Phase contrast microscopy and computer assisted image analysis were used to observe nanoparticle-membrane interaction. Due to time consuming data processing we intended to automate computer assisted image analysis process. We noticed reduction of GUV population and morphological transformation, caused by fullerenes C₆₀. Incubation in a suspension of C₆₀ resulted in bursting of approximately two thirds of vesicles within 10 minutes, and after 120 minutes of incubation changes in the relative proportion of shapes were recorded. These results are contribution to understanding the dynamic of GUV morphological transformation process and their interaction with nanoparticles, while automatic image analysis was yet not adequate in this stage of research and could not substitute manual analysis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO TABEL	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
SLOVARČEK	X
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NANODELCI	3
2.1.1 Nanotehnologija	3
2.1.2 Interakcije nanodelcev z biološkimi sistemi	4
2.1.3 Lastnosti nanodelcev	5
2.1.4 Nanodelci uporabljeni v naši študiji	6
2.1.4.1 Fuleren C ₆₀	6
2.1.4.2 Titanov dioksid (TiO ₂)	9
2.1.4.3 Cinkov oksid (ZnO).....	10
2.1.4.4 Srebro (Ag)	10
2.1.4.5 Baker (Cu)	10
2.2 METODE ZA PREUČEVANJE INTERAKCIJ MED NANODELCI IN BIOLOŠKIMI MEMBRANAMI	10
2.2.1 Lipidni vezikli.....	12
2.2.1.1 Orjaški unilamelarni vezikli (GUV).....	13
2.2.1.2 Morfologija lipidnih veziklov.....	15
3 MATERIAL IN METODE.....	18
3.1 PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV	18

3.2 PRIPRAVA TESTNIH RAZTOPIN	19
3.3 IZVEDBA POSKUSA IN ZAJEM MIKROGRAFIJ	20
3.3.1 Faze v optimizaciji metode	22
3.3.2 Poskus z destilirano vodo	24
3.4 OBDELAVA SLIK	24
3.4.1 Obdelava podatkov.....	25
3.4.1.1 Izsrednost ali ekscentričnost	26
3.4.1.2 Posebne oblike veziklov	27
4 REZULTATI.....	29
4.1 ŠTEVILČNOST LIPIDNIH VEZIKLOV	29
4.2 VELIKOSTNA RAZPOREDITEV POPULACIJE LIPIDNIH VEZIKLOV	32
4.3 ŠTEVILČNOST VEČJIH IN MANJŠIH LIPIDNIH VEZIKLOV	34
4.4 SPREMINJANJE OBLIKE LIPIDNIH VEZIKLOV	35
4.4.1 Izsrednost ali ekscentričnost lipidnih veziklov	36
4.4.2 Posebne oblike veziklov.....	37
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	41
5.1 RAZPRAVA	41
5.1.1 Optimizacija metode	41
5.1.1.1 Ročna segmentacija slik	43
5.1.1.2 Avtomatizirana segmentacija slik.....	44
5.1.2 Vpliv fulerenov C ₆₀ na umetne fosfolipidne membrane	44
5.1.2.1 Spremembe v številčnosti in velikostni razporeditvi lipidnih veziklov	44
5.1.2.2 Spremembe oblike lipidnih veziklov	49
5.2 SKLEPI	51
6 POVZETEK	53
7 VIRI.....	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Fuleren C ₆₀	7
Slika 2: Struktura molekule POPC (1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicerol-3-fosfatidilholina). ...	14
Slika 3: Transformacije oblik GUV.	16
Slika 4: Elektroformacija.	19
Slika 5: Priprava preparatov in zajem videoposnetkov.	21
Slika 6: Segmentacija lipidnih veziklov.	24
Slika 7: Segmentacija posebnih struktur z vtičnikom za segmentacijo oblik za odprtokodni program za obdelavo slik ImageJ.	25
Slika 8: Elipsa.	27
Slika 9: Ekscentričnost veziklov.	27
Slika 10: Oblike veziklov.	28
Slika 11: Številčnost lipidnih veziklov.	30
Slika 12: Številčnost lipidnih veziklov (maksimumi, minimumi in povprečja treh ponovitev poskusa za vsak tretma).	31
Slika 13: Vpliv destilirane vode na številčnost veziklov.	32
Slika 14: Številčnost veziklov po velikostnih razredih.	34
Slika 15: Številčnost manjših (polmer < 8.5µm) in večjih (polmer > 8.5µm) veziklov na mestu najvišje koncentracije testne raztopine (pas P1).	35
Slika 16: Ekscentričnost veziklov.	36
Slika 17: Količina hruškasto oblikovanih veziklov / 1000 veziklov.	38
Slika 18: Količina hruškasto oblikovanih veziklov s širokim vratom / 1000 veziklov.	39
Slika 19: Količina hruškasto oblikovanih veziklov z ozkim vratom / 1000 veziklov.	40

KAZALO TABEL

Tabela 1: Čas zajemanja mikrografij.....	22
Tabela 2: Vsi detektirani vezikli, grupirani po velikostnih razredih.	33

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ΔA	razlika med površino zunanje in površino notranje plasti lipidne membrane
e	izsrednost ali ekscentričnost (ang. eccentricity)
π	pi (vez)
C	kontrolni tretma (ang. Control)
C ₆₀	fulereni
Cu ²⁺	baker
DNA	deoksiribonukleinska kislina
GUV	orjaški unilamelarni vezikel (ang. Giant Unilamellar Vesicle)
HOCl	hipoklorna kislina
H ₂ O ₂	vodikov peroksid
Hol	holesterol
lo	tekoča urejena faza membrane (ang. liquid ordered)
LUV	veliki unilamelarni vezikel (ang. Large Unilamellar Vesicle)
makro	predpona, ki označuje delce, večje od nanodelcev
MLV	multilamelarni vezikel (ang. Multilamellar Vesicle)
N	tretma z nanodelci
NP	nanodelec (ang. Nanoparticle)
O ₂ ^{•-}	superoksidni anionski radikal
OH [•]	hidroksilni radikal
POPC	1-palmitoil-2-oleoil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfatidilholin
P/V	površinsko-prostorninsko razmerje
R	tretma z referenčno kemikalijo
ROS	reaktivne kisikove zvrsti (ang. Reactive Oxygen Species)
TiO ₂	titanov dioksid
UV	ultravijolična svetloba
ZnCl ₂	cinkov klorid
ZnO	cinkov oksid

SLOVARČEK

tangencialne sile	sile, ki delujejo v smeri tangente, dotikalne sile
lizolipidi	lipidi, ki so izgubili eno verigo zaradi hidrolize
stožnica	geometrijska krivulja, ki nastane pri preseku dvojnega krožnega stožca

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Nanodelci so na Zemlji prisotni že milijone let, človeštvo pa jih uporablja že tisočletja. Njihovega obstoja se dolgo nismo zavedali, ko pa smo jih opazili in spoznali smo, da imajo nekatere edinstvene značilnosti, so postali nova tržna niša. Dandanes so materiali nanometrskih velikosti uporabni na veliko različnih področjih, trenutno najbolj aktualna pa je njihova aplikacija v nanomedicini in nanotehnologiji. V veliki meri se uporabljajo tudi v izdelkih za vsakdanjo uporabo, na primer v prehrabeni industriji in kozmetiki. Poleg namensko proizvedenih nanodelcev se moramo zavedati tudi obstoja nenamensko proizvedenih delcev. Taki so na primer delci, ki nastanejo kot stranski produkt pri industrijski proizvodnji, pri gorenju in v motorjih z notranjim izgorevanjem.

Nanodelci so skupki materiala, ki so vsaj v eni dimenziji manjši od 100 nm. Ti delci se od makroskopskih delcev z enako kemijsko sestavo bistveno razlikujejo, saj je zaradi majhnosti močno povečana njihova relativna površina. Tako se poveča delež atomov na površini in delci pridobijo nove kemijske in fizikalne lastnosti.

Ena izmed spojin z veliko potencialno koristnimi lastnosti so fulereni. Imajo protivirusno ter antioksidantsko aktivnost, sposobnost cepitve DNA, prenosa elektronov in so potencialni prenašalci zdravil ter molekularna orodja za ugotavljanje malignosti tumorjev (Jensen in sod., 1996). Zaradi njihove vsestranske uporabe se v zadnjem času proizvajajo v velikih količinah.

Zaradi emisij nenamensko proizvedenih nanodelcev in pa predvsem zaradi naraščajoče uporabe nanodelcev v aplikativni znanosti je potrebno poleg njihovih pozitivnih lastnosti poznati tudi morebitne škodljive interakcije teh delcev z biološkimi sistemi. Predvsem je pomemben vpliv nanodelcev na biološke membrane, saj so le-te prvi stik delca z organizmom. Znano je že, da nanodelci lahko vplivajo na strukturno ureditev membrane. Nanjo se lahko adsorbirajo, jo stanjšajo, povzročijo lipidno peroksidacijo ali celo tako zmanjšajo integriteto membrane, da se tvorijo luknje (Jensen in sod., 1996).

Interakcije nanodelcev z membranami lahko preučujemo z različnimi metodami, zelo pogoste pa so študije vpliva nanodelcev na umetno pripravljene lipidne vezikle. Za razliko od celičnih membran, lipidni vezikli nimajo tako kompleksne sestave, pripravimo pa jih lahko v taki velikosti, da lahko posamezne vezikle direktno opazujemo s svetlobnim mikroskopom. Študij, ki preučujejo tovrstne interakcije, je veliko, vendar pa so v večini dosedanjih študij preučevali le vpliv delcev na posamezne vezikle, medtem ko je vpliv nanodelcev na večjo populacijo veziklov, zaradi zahtevne obdelave podatkov, še zelo neraziskan.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Nameni naloge so bili:

- razviti metodo za analizo morfoloških transformacij lipidnih veziklov;
- v sodelovanju s strokovnjaki računalništva in informatike razviti avtomatsko računalniško segmentacijo slik;
- preučiti interakcije med lipidnimi membranami ter nanodelci različnih kemijskih struktur in velikosti.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Naše hipoteze so:

- v primeru izpostavljenosti lipidnih veziklov nanodelcem bo prišlo do interakcij med delci in umetnimi fosfolipidnimi membranami, kar naj bi opazili kot morfološke transformacije veziklov;
- različni nanodelci bodo različno vplivali na lipidne vezikle, kar se bo odrazilo v različnih morfoloških transformacijah veziklov;
- z opazovanjem večjih populacij veziklov bomo dobili bolj reprezentativne podatke o interakcijah med nanodelci in membranami.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANODELCI

Predpona “nano” pomeni ekstremno majhen in je grška beseda za škrata. Uporablja se za oznako milijardine metra (10^{-9}). Nanodelci so torej skupki materiala, ki zavzemajo velikosti med 1 nm in 100 nm. Lahko so sferični, tubularni ali nepravilnih oblik (Nowack in Bucheli, 2007; Rai in sod. 2009).

Nanodelci niso nekaj povsem novega. Na Zemlji so prisotni že od samega začetka in nastajajo v naravnih procesih, kot so na primer vulkanski izbruhi. Nanodelci nastajajo tudi v procesu gorenja, pri brušenju, mletju, varjenju in podobnih procesih, prisotnih v industrijskih obratih ali celo v vsakdanjem življenju. Obstoja teh delcev se do pojava orodij za njihovo zaznavanje nismo zavedali. Ko so tako majhne delce lahko zaznali, so ugotovili, da imajo kar nekaj edinstvenih lastnosti, ki jih makroskopski delci z enako kemijsko sestavo nimajo. Te lastnosti pridejo do izraza pri velikostih delcev pod 100 nm. Nanodelci so zato postali tehnološko zelo zanimivi in so v zadnjem času deležni precejšnje pozornosti (Adlakha-Hutcheon in sod., 2009; Drobne in Kralj-Iglič, 2009; Savolainen in sod., 2010).

2.1.1 Nanotehnologija

Nanotehnologija je hitro rastoča panoga, z možnostjo aplikacij materialov nanometrskih velikosti na področju znanosti in tehnologije (Albrecht in sod., 2006). Iz nanodelcev izdelani materiali imajo lahko povsem nove lastnosti, lahko pa z dodajanjem nanodelcev le izboljšajo lastnosti že poznanih materialov.

Glede na vrsto kemikalije, iz katerih so proizvedeni, nanomateriale lahko delimo na nanomateriale, ki vsebujejo kovinske okside, polprevodne materiale, prehodne kovine, nanopolimere ali ogljik. Med slednje spadajo fulereni, nanocevke, nanožice, itd. (Bhatt in Tripathi, 2011).

Danes je nanomateriale mogoče najti v potrošnih produktih, kot so elektronske komponente, kozmetika, cigaretni filtri, antimikrobne in proti madežem odporne tkanine in pršilci, kreme za sončenje, čistila, voski za smuči, samočistilna okna ter različne površine, ki zahtevajo antimikrobne lastnosti, kar je aktualno predvsem za kopalnice (Savolainen in

sod., 2010). Ocenjujejo, da je trenutno v vsakdanji rabi več kot 800 na nanotehnologiji baziranih produktov, mnogi novi produkti pa naj bi se pojavili na tržišču v naslednjih nekaj letih (Maynard in sod., 2006; Rejeski in Lekas, 2008).

V prihodnosti bo nanotehnologija verjetno postala temelj številnih industrijskih sektorjev kot so mikroelektronika, kozmetika, industrija papirjev, tekstila ter proizvodnja energije (Adlakha-Hutcheon in sod., 2009). Ocenjeno je, da bo do leta 2014 več kot 15% vseh produktov na globalnem tržišču imelo v svojo proizvodnjo vključeno neke vrste nanotehnologijo (Dawson, 2008).

Nanotehnološke aplikacije bodo pozitivno prispevale k kvaliteti življenja, na primer s produkcijo lahkih in trpežnih materialov ali pa s poceni proizvodnjo čiste vode, najbolj obetajoča pa so aplikacije nanodelcev na področju biomedicine. Največji potencial imajo kot dostavljalci antikancerogenih zdravil, zaradi majhe velikosti pa so potencialno primerni tudi za dostavljanje zdravil, ki normalno ne morejo preko možganske krvne bariere. Materiali nanometrskih velikosti bodo verjetno vključeni tudi v nekatere terapije in diagnostiko (Adlakha-Hutcheon in sod., 2009; Kreuter, 2007; Maynard in sod., 2006; Savolainen in sod., 2010).

2.1.2 Interakcije nanodelcev z biološkimi sistemi

Z naraščajočo uporabo inženerskih nanomaterialov je potencialna izpostavljenost le-tem zelo narasla, možni toksični učinki nanodelcev na zdravje pa so v veliki meri še neraziskani. Posebno zaskrbljujoče so ravno karakteristike, ki so tehnološko privlačne. Te vključujejo veliko P/V razmerje in s tem povezano površinsko reaktivnost ter spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti, kot so na primer spremembe v tališču, topnosti, električni prevodnosti in kristalni strukturi materialov (Borm in sod., 2006; Elder in sod., 2009; Maynard in sod., 2004; Maynard in Aitken, 2007; Nel in sod., 2006).

Nekatere študije poročajo o toksičnem efektu nanodelcev na različne organizme (Derfus in sod., 2004; Handy in sod., 2008). Nanodelci, na mestu kontakta oziroma privzeti v organizem skozi dihala, prebavni trakt ali telesno površino, lahko povzročijo citotoksične, genotoksične efekte, vnetja ali celo raka (Borm in sod., 2006; Donaldson in

sod., 2004). Ne glede na način vstopa v organizem pa nanodelci na nivoju nanometrskih velikosti primarno reagirajo s celičnimi membranami (Zupanc in sod., 2010).

Različni nanodelci lahko na različne načine destabilizirajo oziroma permeabilizirajo celično membrano. Strukturno ureditev lahko zmotijo tako, da se na membrano adsorbirajo, jo stanjšajo, povzročijo lipidno peroksidacijo ali celo tako zmanjšajo integriteto membrane, da se tvorijo luknje (Jensen in sod., 1996). Adsorbcija nanodelcev na membrano lahko povzroči njeno spontano ukrivljanje (Lipowsky in Döbereiner, 1998), medtem ko stanjšanje membrane, pri čemer se zmanjša gostota membranskih molekul, in tvorba por povečata permeabilizacijo membrane. Permeabilizacija se lahko poveča tudi z lipidno peroksidacijo (Sayes in sod., 2005). Pri tem procesu imajo ključno vlogo reaktivne kisikove zvrsti (ang. Reactive Oxygen Species – ROS).

Med reaktivne kisikove spojine uvrščamo vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorno kislino (HOCl) in proste radikale, kot sta hidroksilni radikal ($OH^\bullet$) in superoksidni anion ($O_2^{\bullet-}$). ROS v celicah lahko nastajajo tudi pri normalnih celičnih procesih, številne antioksidantske molekule pa varujejo celice pred škodljivimi učinki le-teh (Halliwell in Gutteridge, 1999). Če so ROS v presežku, pride do oksidativnega stresa, katerega posledice so lahko vnetja, oksidacije proteinov, poškodbe DNA in lipidna peroksidacija. V procesu lipidne peroksidacije ROS oksidirajo dvojne vezi maščobnih kislin v membranah. Posledično se poveča permeabilnost membran, to pa naredi celice bolj občutljive za osmotski stres (Bhatt in Tripathi, 2011, Cabiscol in sod., 2000; Wong-Ekkabut in sod., 2007).

2.1.3 Lastnosti nanodelcev

Ključni dejavnik potencialne toksičnosti nanodelcev je njihova velikost oziroma majhnost. Pri zmanjševanju velikosti delcev se njihova relativna površina povečuje, pri čemer narašča delež atomov na površini delcev. Rezultat je večja reaktivnost delcev nanometrskih velikosti v primerjavi z večjimi delci enake kemijske sestave. Omeniti je treba še, da je dejanska velikost nanodelcev odvisna predvsem od medija, v katerem se nahajajo. Suspendirani v plinu ali tekočini imajo tendenco tvorjenja agregatov in aglomeratov, kar zmanjša njihovo specifično površino (Murphy in sod., 1999; Skebo in sod., 2007).

Na celični odziv poleg specifične površine nanodelcev vplivajo tudi kemijska sestava nanodelcev, njihova oblika (fibrozna, sferična, itd.) in stopnja odtapljanja. Odtapljanje je proces, pri katerem se kemijske vezi v trdnem materialu podrejo, pri tem pa se ioni, atomi ali molekule sprostijo v medij. Ta proces se pri nanodelcih odvija hitreje kot pri makroskopskih delcih iste kemijske sestave (Borm in sod., 2006; Dick in sod., 2003).

2.1.4 Nanodelci uporabljeni v naši študiji

Trenutno najbolj aktualna je potencialna aplikacija fulerenov v kontroliranem prenosu zdravil. Zanimivi so tudi nanodelci titanovega dioksida (TiO_2) ter nanodelci cinkovega oksida (ZnO), saj imajo antimikrobno aktivnost ter fotokatalitične sposobnosti. Protimikrobno delovanje je značilno tudi za nanodelce srebra (Ag). Nanodelci bakra (Cu) pa so v zadnjem času postali zanimivi zaradi svojih katalitičnih lastnosti (Lee in sod., 2006; Nohynek in sod., 2007; Sondi in Salopek-Sondi, 2004).

Delci, ki smo jih izbrali za testiranje v naši študiji imajo nekatere edinstvene značilnosti, ki se razlikujejo od lastnosti, ki jih imajo delci z enako kemijsko sestavo makrometrskih velikosti, zato so s stališča nanoaplikacij zelo zanimivi. Ker je to področje raziskav relativno novo, je v literaturi o toksičnosti teh spojin na žive sisteme zaslediti mnogo nasprotujočih si mnenj.

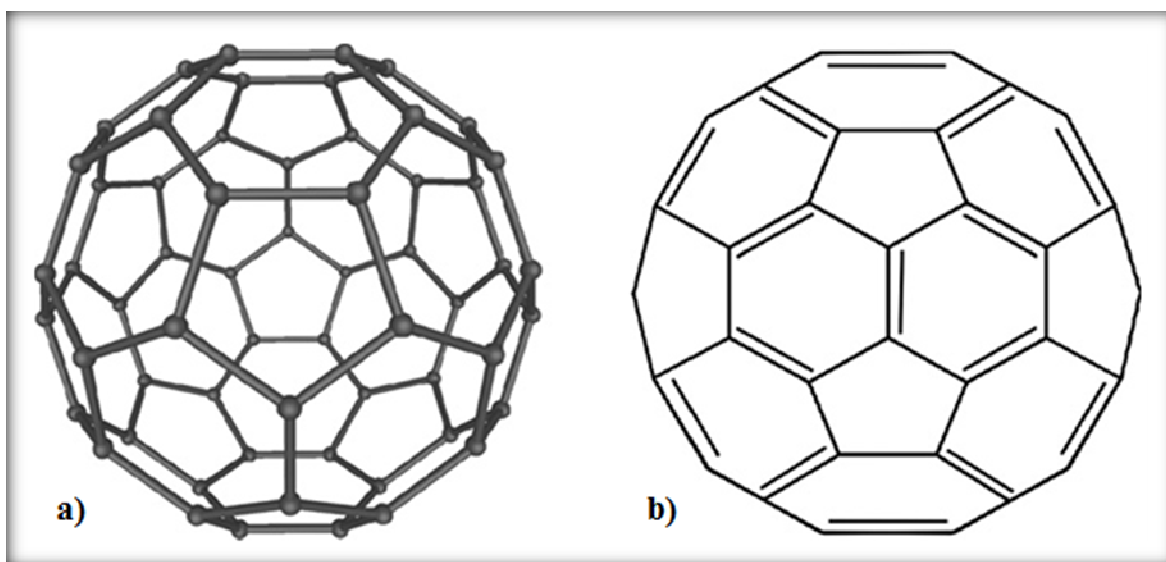
2.1.4.1 Fuleren C_{60}

Fulere ne so odkrili leta 1985, ko je Kroto s sod. (1985) prvič poročal o obstoju molekule C_{60} . S tem so po 36 letih razglabljanja o ogljikovih skupkih, kočno potrdili njihov obstoj. Od takrat naprej je ta molekula privlačila veliko pozornosti, večinoma zaradi širokega razpona potencialnih aplikacij, predvsem v biomedicini in v znanosti o materialih. S padcem cene in posledično dostopnostjo C_{60} v velikih količinah, se je prva masovna aplikacija fulerenov zgodila v letu 2003 in sicer v zelo nepričakovani obliki, kot premaz za bowling krogle (Sene in sod., 2009; Wang in sod., 2004).

Fulereni, velike ogljikove molekule v obliki kletke, so tridimenzionalni analogi benzena. So zaprti poliedri s ploskvami v obliki pet- in šestkotnikov. V osnovi so sestavljeni iz

velikega števila ogljikovih atomov, od 42 pa do okoli 1000. Med bolj znanimi so fulereni C_{60} , C_{70} , C_{76} , C_{78} in C_{84} .

Najbolj razširjen in najstabilnejši je C_{60} , znan kot Buckminsterfullerene (po arhitektu Buckminsterju Fuller), s 60 ogljikovimi atomi, urejenimi v sferično strukturo (Slika 1, a). Oblika molekule je podobna obliki nogometne žoge; vsebuje 12 petkotnikov in 20 šestkotnikov. Vsak ogljikov atom v molekuli preko sp^2 hibridizacije tvori vez s tremi sosednjimi atomi. Prisotna sta dva tipa vezi, C_5-C_5 enojna vez v peterokotnikih in C_5-C_6 dvojna vez v šestkotnikih (Slika 1, b) (Bystrzejewska-Piotrowska in sod., 2009; Markovic in Trajkovic, 2008; Sene in sod., 2009).



Slika 1: Fuleren C_{60} . Molekulo sestavlja 60 ogljikovih atomov, urejenih v sferično strukturo (a). Prisotna sta dva tipa vezi, enojna vez v petkotnikih in dvojna vez v šestkotnikih (b) (Markovic in Trajkovic, 2008: 3561).

Molekule C_{60} so po naravi hidrofbne. Kopičijo se v lipofilnih strukturah, v polarnih topilih pa težijo k tvorbi stabilnih skupkov in agregatov. To predstavlja težave pri biomedicinski aplikaciji te molekule. Rešitev predstavljajo C_{60} derivati, saj jih v vodi topnih kar nekaj. Več kot ima fuleren topnih funkcionalnih skupin, bolj je topen. Študije kažejo, da so agregati nederivatiziranih fulerenov C_{60} bolj citotoksični kot njihovi v vodi topni derivati (Heymann in sod., 1996; Ruoff in sod., 1993).

Razvoj uporabe fulerenov je bil zaradi slabe topnosti v vodi nedavno nekoliko oviran, vendar so se fulereni kljub temu izkazali za uporabne v širokem razponu bioloških aplikacij. Zaradi edinstvenih lastnosti imajo kar nekaj možnih aplikacij na področju znanosti o materialih, v elektroniki in v biomedicini. Zaradi možnosti sinteze v makroskopskih količinah so intenzivno preučevani v različnih oblikah; v raztopinah in koloidnih suspenzijah, kot nanokristali (znani kot fulleriti), tanki filmi, vezani na polimere in modificirani z obsežnim razponom funkcionalnih skupin, odvisno pač od specifičnega namena njihove aplikacije (Jensen in sod., 1996; Sene in sod., 2009).

Unikatna fizikalna in kemijska oblika C_{60} , ki je najbolj reprezentativen član družine fulerenov, je nedavno spodbudila precejšnje upanje njegove potencialne uporabe na različnih področjih biomedicine. Zaradi prazne notranjosti, majhnosti (okoli 7 Å; Kroto in sod., 1985) in 60-ih ogljikovih atomov, ki predstavljajo vezavna mesta za različne kemijske spojine, so molekule primerne kot različni terapevtiki. Trenutno najbolj aktualna je možnost uporabe pri kontroliranem prenosu zdravil (npr. za osteoporozo), so pa potencialno primerni tudi kot prenašalci elektronov, radioizotopov, za cepitev DNA, pri inhibiciji encimov, citoprotekciji, pri diagnostiki in zdravljenju raka ter v protimikrobni terapiji (Jensen in sod., 1996; Markovic in Trajkovic, 2008; Sene in sod., 2009).

Ena biološko najbolj koristnih značilnosti C_{60} je sposobnost, da funkcionira kot lovilec prostih radikalov. Ta lastnost je pripisana delokalizaciji sistema π dvojne vezi fulerenove kletke. Po drugi strani pa osvetljevanje C_{60} z vidno ali UV svetlobo povzroči prehod molekule v triplet vzbujeno stanje. Ta pretvori triplet O_2 v visoko reaktiven singlet kisik (1O_2) ali superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$). Superoksidni anion in ostale reaktivne kisikove zvrsti (ROS) reagirajo s širokim razponom bioloških tarč. Znano je, da so udeležene tako v celičnem signaliziranju kot tudi v poškodbi celic, saj imajo po predhodni izpostavitvi svetlobi sposobnost inhibicije encimov in cepitve DNA (Markovic in Trajkovic, 2008).

Ker C_{60} in njegovi derivati generirajo reaktivne kisikove zvrsti pri osvetljevanju, je možno, da je citotoksičnost in genotoksičnost C_{60} inducirana prav z ROS. Kamat in sod. so ugotovili, da C_{60} , če je fotosenzibiliziran, lahko inducira značilno lipidno peroksidacijo in druge oblike oksidativnih poškodb v bioloških membranah. Ta pojav lahko vodi do formacije številnih stabilnih in toksičnih produktov. Polinenasičene maščobne kisline,

prisotne v celičnih membranah, so posebno nagnjene k poškodbam z reaktivnimi zvrstmi, ki nastanejo med fotosenzibilizacijo, in lipidna peroksidacija kot rezultat ima lahko resne posledice za tkiva in organizem. V membranah omenjene reakcije povzročijo izgubo fluidnosti, padec membranskega potenciala, porast permeabilnosti za ione in lahko celo poškodbo membrane, ki vodi do izpraznitve vsebine celic in organelov (Kamat in sod., 1998; Shinohara in sod., 2009).

Danes se fulereni producirajo v makroskopskih količinah, naraščajoča uporaba nanodelcev v industriji in gospodinjstvih pa bo verjetno vodila k sproščanju teh materialov v okolje. Zato je treba podrobno preučiti njihove vplive na biološke sisteme (Kamat in sod., 1998; Nowack in Bucheli, 2007).

O citoksičnosti C_{60} delcev poročajo številne študije vendar pa pri nekaterih poskusih s to molekulo do citotoksičnosti ni prišlo. Kamat in sod. (1998) so v poskusu s C_{60} , vključenim v mikrosome podganjih jeter, lipidno peroksidacijo inducirali z UV in vidno svetlobo. Gharbi in sod. (2005) pa poročajo celo o pozitivnih učinkih na biološke sisteme. Interakcije fulerenov z živimi sistemi tako ostajajo nejasne, verjetno pa je citotoksičnost odvisna od tipa uporabljenih celic in načina priprave C_{60} testne suspenzije (Foley in sod., 2002; Shinohara in sod., 2009).

2.1.4.2 Titanov dioksid (TiO_2)

Titanov dioksid (TiO_2) makrometrskih velikosti je zelo vsestransko uporaben nanomaterial in se že desetletja uporablja v veliko različnih industrijskih panogah, saj je vsesplošno sprejet kot nestrupen (Masciangioli in Zhang, 2003). Uporablja se za zaščito pred ultravijoličnim sevanjem, kot dodatek hrani, kot belilno sredstvo, uporaben je tudi v sončnih celicah; nanodelci TiO_2 so močan oksidant organskih molekul in povzročajo proste radikale (Dunford, 1997). V zadnjem desetletju se je močno povečala proizvodnja nanodelcev TiO_2 . Te delci imajo prav tako antimikrobno aktivnost ter fotokatalitične sposobnosti in se uporabljajo kot dezinfekcijska sredstva, kot prehranski dodatki, v barvilih in v kozmetičnih ter farmacevtskih produktih (Nohynek in sod., 2007). Nanodelci TiO_2 so oksidanti in tako biološko reaktivni (Hirakawa in sod., 2004).

2.1.4.3 Cinkov oksid (ZnO)

Nanodelci cinkovega oksida (ZnO) imajo velik aplikativni potencial predvsem v industriji elektronskih in optičnih naprav ter v biomedicini, ena izmed pomembnejših lastnosti nanodelcev ZnO pa je njihovo protibakterijsko delovanje (Klingshirn, 2007; Nair in sod., 2009; Zhang in sod., 2007). Za slednje velja, da so za razliko od delcev ZnO mikrometerskih velikosti nanodelci ZnO mnogo učinkovitejši (Yamamoto, 2001). Ker so ti delci učinkovito protibakterijsko sredstvo, je treba preučiti tudi morebitno strupenost za ostala živa bitja.

2.1.4.4 Srebro (Ag)

Antimikrobni učinki srebra so znani že stoletja. Srebro je strupeno za zelo širok spekter mikroorganizmov. Nanodelci s povečano kemijsko aktivnostjo v primerjavo s srebrom makrometrskih velikosti so trenutno najpomembnejše nanotehnološke antimikrobne snovi (Sondi in Salopek-Sondi, 2004). V medicini se nanosrebro uporablja za zdravljenje opeklin in kroničnih poškodb kože, zelo učinkovito pa je tudi pri zdravljenju aidsa (Elechiguerra in sod., 2005; Rai in sod., 2009). Uporablja se tudi pri proizvodnji nanotekstila, vlakna impregnirana z delci nanosrebra, ki se uporablja predvsem v medicini, pa tudi za športna in vojaška oblačila.

2.1.4.5 Baker (Cu)

Znano je, da prekomerne koncentracije Cu^{2+} povzročijo nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti. Te lahko poškodujejo membrane, saj povzročijo lipidno peroksidacijo, ki vodi v povečanje permeabilnosti celične membrane (Halliwell in sod., 2007). V zadnjem času so nanodelci bakra postali zanimivi zaradi svojih katalitičnih lastnosti (Lee in sod., 2006).

2.2 METODE ZA PREUČEVANJE INTERAKCIJ MED NANODELCI IN BIOLOŠKIMI MEMBRANAMI

Kljub temu, da imajo nove lastnostnosti nanodelcev številne potencialne tehnološke aplikacije, ne smemo pozabiti na njihov morebitni vpliv na biološke sisteme. Poleg nanodelcev s katerimi lahko pridemo v stik preko novih nano produktov, pa je zaradi

široke uporabe nanotehnologije, vedno več proizvedenih nanodelcev prisotnih v atmosferi, zemlji in vodnih okoljih.

V zadnjem času se veliko raziskav povezanih z nanodelci osredotoča prav na njihov morebitni toksični vpliv na žive sisteme. Predvsem je pomemben vpliv nanodelcev na biološke membrane, saj so le-te prvi stik delca z organizmom. Veliko študij navaja, da nanodelci vplivajo na stabilnost celične membrane in posledično povzročijo toksične efekte. Znano je, da vplivajo na strukturno ureditev membrane. Nanjo se lahko adsorbirajo, jo stanjšajo, povzročijo lipidno peroksidacijo ali celo tako zmanjšajo integriteto membrane, da se tvorijo luknje nanovelikosti. Kot poročajo številne študije je toksičnost nekaterih nanodelcev v veliki meri povezana z njihovo površinsko reaktivnostjo (Drobne in Kralj-Iglič, 2009; Jensen in sod., 1996; Zupanc in sod., 2009).

Interakcije nanodelcev z membranami lahko preučujemo z različnimi metodami, zelo pogoste pa so študije vpliva nanodelcev na umetno pripravljene lipidne membrane. Umetne fosfolipidne membrane so zelo primeren sistem za študije učinkov različnih substanc na membrane. So manj heterogene kot celične membrane, zato se lažje osredotočimo le na določen mehanizem, ki ga želimo preučiti. Pripravimo lahko membrane z želeno lipidno sestavo (Drobne in Kralj-Iglič, 2009; Peetla in sod., 2009).

Dober model za proučevanje fizikalnih, kemijskih in električnih lastnosti bioloških membran so lipidni vezikli. Pripravimo jih lahko v velikosti celic in jih opazujemo s svetlobnim mikroskopom (Pavlič in sod., 2010). Lipidni vezikli so prilagodljive strukture z bogato diverziteto oblik (Zupanc in sod., 2010). Fluktuacije in spremembe oblike veziklov so obsežno preučevali z različnimi tehnikami; najbolj pogosto z optično mikroskopijo (Gruhn in sod., 2007; Leirer in sod., 2009; Pecreaux in sod., 2004; Peterlin in sod., 2009). Za take vrste raziskave imajo lipidni vezikli veliko vrednost zaradi možnosti kontroliranja eksperimentalnih pogojev in posledično visoke ponovljivosti eksperimentov (Zupanc in sod., 2009).

Interakcije nanodelcev z lipidnimi vezikli, ki so jih preučevali v dosedanjih študijah razkrivajo, da nanodelci inducirajo lipidno površinsko prerazporeditev (Wang in sod., 2008), fizično prelomijo lipidne membrane (Leroueil in sod., 2007; Lipowsky in

Döbereiner, 1998) in spremenijo obliko lipidnih veziklov (Yu in Granick, 2009; Zupanc in sod., 2010). Študij, ki preučujejo tovrstne interakcije, je veliko, vendar pa v večini dosedanjih študij preučujejo le vpliv delcev na posamezne vezikle, medtem ko je vpliv nanodelcev na večjo populacijo veziklov, zaradi zahtevne obdelave podatkov, še zelo neraziskan.

Za študije možnih interakcij je bilo uporabljenih veliko različnih metod. V okviru mikroskopskih metod se najbolj pogosto uporabljata faznokontrastna in fluorescentna svetlobna mikroskopija, uporabljajo pa se tudi mikroskopija na atomsko silo, elektronska paramagnetna resonanca ter konfokalna in transmisijsko elektronska mikroskopija (Drobne in Kralj-Iglič, 2009).

S svetlobno mikroskopijo so dobro vidni orjaški unilamelarni vezikli (ang. Gigant Unilamellar Vesicle – GUV). Med svetlobno mikroskopskimi metodami je še posebej uporabna faznokontrastna svetlobna mikroskopija, ki deluje na osnovi razlike med lomnima količnikoma delcev in okoliškega medija. Kontrast vzpostavimo z razliko med optično gostoto raztopine, v kateri se vezikli formirajo, in optično gostoto raztopine, v katero vključimo nastale vezikle.

2.2.1 Lipidni vezikli

Lipidni vezikli ali liposomi so mikroskopske, s tekočino napolnjene vrečke, katerih stene so iz plasti fosfolipidov. Opredeljeni so s površinskim nabojem, s številom plasti in z velikostjo. Glede na površinski naboj so klasificirani na anionske, kationske in nevtralne liposome, glede na število plasti pa ločimo unilamelarne in multilamelarne lipidne vezikle (Šegota in Težak, 2006).

Multilamelarni vezikli so najpreprostejši lipidni vezikli. Sestavljeni so iz množice (ponavadi 4 – 10) koncentričnih lipidnih dvoslojev, vsak posamezni dvosloj pa je ločen z ozkim slojem vodne raztopine (Hope in sod., 1986). Unilamelarni vezikli so za razliko od multilamelarnih sestavljeni iz enega dvosloja. Glede na velikost jih nadalje ločimo na majne unilamelarne vezikle (ang. Small Unilamellar Vesicle – SUV), velike unilamelarne vezikle (ang. Large Unilamellar Vesicle – LUV) in orjaške unilamelarne vezikle (ang.

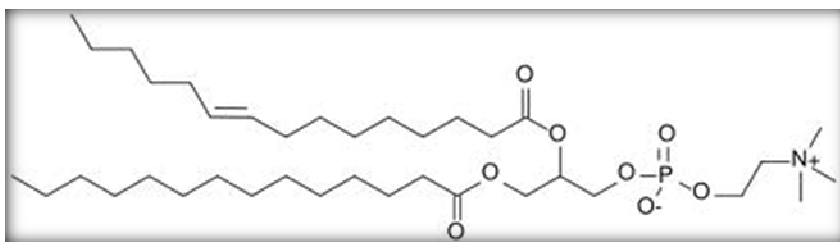
Gigant Unilamellar Vesicle – GUV). Orjaški unilamelarni vezikli s premer 1 – 300 μm so največji. V nasprotju z majhnimi unilamelarni vezikli, ki imajo premer 30 – 50 nm, in 100 – 200 nm velikimi unilamelarni vezikli, so GUV dobro vidni s svetlobnim mikroskopom, kar je njihova velika prednost (Menger in Keiper, 1998).

2.2.1.1 Orjaški unilamelarni vezikli (GUV)

Orjaški unilamelarni vezikli so objekti intenzivnih raziskovanj na različnih področjih, ki se osredotočajo na vedenje membran, saj so najpreprostejši model umetne celice ali skupkov fosfolipidnih slojev. Pred opazovanjem celic imajo prednost. So zelo praktični za preučevanje, saj so vidni že s svetlobnim mikroskopom, njihova sestava pa ni tako kompleksna kot sestava celic. Poleg tega so v enekem velikostnem razredu kot celice in kažejo nekatere pojave, podobne tistim opaženih pri živih celicah. Preučujemo lahko morfološke spremembe, kot so fuzija, brstenje, invaginacija in druge procese, ki so značilni tudi za celice (Bagatolli in sod., 2000; Menger in Keiper, 1998; Pavlič in sod., 2009).

Orjaški unilamelarni vezikli so sferične lupinice, sestavljene iz enega sintetičnega ali naravnega lipidnega dvosloja (Menger in Keiper, 1998). Med najpogosteje uporabljene sintetične lipide sodijo nevtralni POPC (palmitoil oleoil fosfatidilholin), anionski POPG (palmitoil oleoil fosfatidilglicerol), DOPC (dioleil fosfatidil holin), DPPC (dipalmitoil fosfatidil holin), DLPC (dilautil glicero fosfatidilholin) in drugi (Wang in sod., 2008).

POPC (Slika 2) je fosfolipid, ki je prisoten v membranah evkariontskih celic, dostopen pa je tudi kot sintetični lipid. Na prvi ogljikov atom v glicerolu ima zaestren radikal palmitinske kisline, na drugi radikal oleinske kisline, na fosforjevo kislino pa je vezan holin. Pri nevtralnem pH ima fosforjeva kislina negativni naboj, alkohol (npr. holin ali etanolamin) pa pozitivnega. Če je plast dovolj velika, se v vodni raztopini spontano upogne in zlije sama vase. Nastane vezikel oziroma fosfolipidni mehurček.



Slika 2: Struktura molekule POPC (1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholina).

Ponavadi se poleg izbranega lipida doda tudi holesterol (Hol). Holesterol se tesno vriva med fosfolipide in jih kondenzira. Je razlog za pojav tekoče urejene faze lo (ang. liquid ordered). V tej fazi so lipidi zgoščeni, vendar imajo še vedno sposobnost hitrega lateralnega premikanja (London, 2002).

V literaturi so opisane različne metode za pripravo orjaških unilamelarnih veziklov. Osnovna in ena izmed prvih uporabljenih metod je spontano zorenje veziklov, trenutno najbolj aktualna je metoda elektroformacije. Pri tej metodi na platinaste elektrode ali s kovino prekrito stekleno ploščo nanese lipidni film, iz katerega v zunanjem AC polju poteka proces brstenja lipidnih veziklov. Aplikacija električnega polja ta proces pospeši (Bagatolli in sod., 2000; Menger in Keiper, 1998; Pavlič in sod., 2009).

Formacija lipidnih veziklov zahteva separacijo slojev in upogibanje. V zgodnji fazi formacije veziklov igrajo odločilno vlogo navpične sile, ki povzročijo odboj med lipidnimi plastmi, in tangencialne sile, ki ukrivijo lipidne plasti. Angelova in Dimitrov (1988) sta ugotovila, da je efekt zunanjega električnega polja posebno močen na navpične sile in da tako lahko z aplikacijo električnega polja induciramo formacijo lipidnih veziklov (Bagatolli in sod., 2000).

Kot rezultat pri tej metodi dobimo dokaj homogeno populacijo veziklov z velikostmi med 30 in 60 μm . Nastali vezikli so sferični, relativno enakomerno razporejeni po preparatu in večinoma unilamelarni. Pri veziklih, pripravljenih s to metodo, lahko opazimo strukture kot so verige in cevke, vendar je prisotnost teh struktur, v primerjavi z ostalimi metodami, redka (Bagatolli in sod., 2000; Menger in Keiper, 1998).

2.2.1.2 Morfologija lipidnih veziklov

Lipidni vezikli so občutljive in dinamične strukture. Že minimalna asimetrija v lipidni dvoplasti lahko povzroči spontano ukrivljanje membrane, to pa vodi k spremembi oblike vezikla. Oblike veziklov so lahko sferične, hruškaste, čašaste, do veziklov z različnimi izrastki (Lipowsky, 1991; Markvoort in sod., 2006). Sprememba oblike je pogosto preučevan parameter (Imparato in sod., 2005; Linke in sod., 2005; Lipowsky, 1995; Lipowsky in sod., 2005).

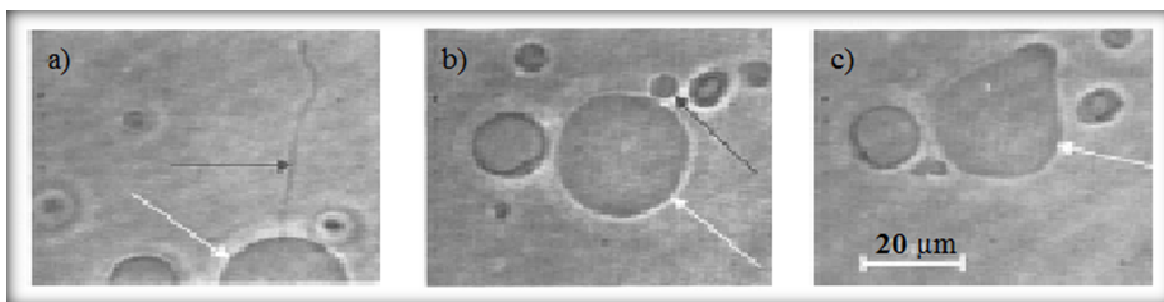
Da so membrane sistemi, ki imajo svoje zakonitosti, potrjuje tudi študija Döbereinerja in sod. (1993). Pokazali so, da je brstenje ali delitev veziklov normalen pojav v membranskem sistemu in da za to niso potrebni proteini. Brstenje so inducirali z višanjem temperature. Pri nizki temperaturi (26,4°C) je bila membrana v gel stanju in vezikel, ki so ga opazovali, je bil sferičen in rigid. Z višanjem temperature je membrana postajala vedno bolj fluidna in vezikel je začel fluktuirati; pri tem je postal bolj eliptične oblike. Z nadaljnim povečevanjem temperature, je nastal brst, ki se je nato odcepil od materinskega vezikla. Pokazali so, da sta brstenje in cepljenje pojav, ki ga najdemo v živih sistemih in je lastnost lipidne dvoplasti (Döbereiner in sod., 1993).

Fluidna membrana veziklov dopušča veliko raznolikosti v oblikah v odvisnosti od lastnosti lipidnih molekul in okolice. Preferenčno obliko določajo upogibna energija, P/V razmerje, osmotski pritisk in lastnosti dvoplasti. Oblika fluidne dvoplasti je regulirana z dvema parametroma, z upogibno energijo in pa z razliko med površino zunanje in površino notranje plasti lipidne membrane (ΔA). Razlika med površinama pa je določena kot razlika v številu lipidnih molekul med zunanjim in notranjim slojem dvoplasti. Oblike, ki imajo evaginacije, imajo veliko razliko med površinama, ΔA , medtem ko imajo oblike, ki imajo invaginacije, majhno razliko med površinama, ΔA . Po formaciji imajo vezikli zaradi dolgih tankih evaginacij veliko razliko med površino notranjega in zunanjega sloja membrane (Iglič in sod., 1999; Kralj-Iglič in sod., 2001; Menger in Keiper, 1998).

Sveže pripravljene fosfolipidni vezikli so pod visoko površinsko napetostjo in zato ne fluktuirajo. Fluktuiranje pa je mogoče sprožiti s segrevanjem (npr. med

mikroskopiranjem), kar naj bi povzročilo tvorbo lizolipidov (to so lipidi, ki so izgubili eno verigo zaradi hidrolize), in z dodatkom saharoze, tako da je razlika med zunanostjo in notranostjo veziklov vsaj 20 mM. Transformacijo oblike torej lahko sproži razlika med osmotskim pritiskom med zunanostjo in notranostjo vezikla ali pa na primer kemijska modifikacija lipidov. Transformacija se lahko pospeši tudi s fosfolipidnim flip-flopom (Hotani in sod., 1999; Kralj-Iglič in sod., 2001; Menger in Keiper, 1998).

Iglič in sod. so opazili povezavo med transformacijo oblik in omrežjem nanotub, ki nastane kot posledica elektroformacije lipidnih veziklov v sladkorni raztopini. Takoj po procesu elektroformacije so vezikli sferični (ne fluktuirajo) in so med seboj povezani s tankimi krhkimi tubularnimi strukturami. Ko vezikle speremo v opazovalno kamrico, se to omrežje zaradi mehanskih sil delno potrga. Pod faznokontrastnim mikroskopom tub ni mogoče videti, saj so pretanke (premer pod 50 nm). S časoma pa se te izrastki začnejo krajšati in debeliti in tako postanejo vidni s faznokontrastnim mikroskopom. Transformacija poteka v zaporednih fazah; dolge tube se krajšajo in debelijo, dokler niso videti kot majhni brsti, ki so z materinskim veziklom povezani z ozkim vratom; v končni fazi se popolnoma vključijo v membrano materinskega vezikla (Slika 3). V začetni fazi ti izrastki predstavljajo rezervoar presežka površine vezikla. V procesu integracije v membrano materinskega vezikla se razlika med površino zunanjega in notranjega sloja membrane vezikla zmanjšuje. Pri tem se materinski veziklom volumen glede na površino zmanjša in fluktuacija oblike veziklov naraste (Hotani in sod., 1999; Iglič in sod., 2003; Kralj-Iglič in sod., 2001; Mathivet in sod., 1996).



Slika 3: Transformacije oblik GUV. Transformacija poteka postopno; dolga tanka tuba se krajša in debeli (a), dokler ni videti kot majhen brst, ki je z materinskim veziklom povezan z ozkim vratom (b); v končni fazi se popolnoma vključi v membrano materinskega vezikla (c). Črne puščice označujejo transformacijo tube, bele

pa materinski vezikel. Velikost večjega GUV je približno 20 μm (prirejeno po: Kralj-Iglič in sod., 2001: 317).

Čeprav GUV preučujejo različne stroke z različnimi pristopi, še vedno ostaja nekaj nejasnosti v poznavanju njihovih lastnosti, predvsem v razumevanju odnosa med morfološkimi in molekularnimi procesi. Kljub temu se je v zadnjih nekaj desetletjih znanje o lastnostih orjaških unilamelarnih veziklov razširilo do te mere, da lahko GUV uporabljamo kot dobro definirane objekte za študije kompleksnega vedenja in za iskanje odgovorov na še bolj zapletena vprašanja o biomembranah oziroma o amfifilnih interakcijah. Z boljšim razumevanjem vedenja GUV bomo bolje razumeli tudi žive celice (Menger in Keiper, 1998; Döbereiner, 2000).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 PRIPRAVA LIPIDNIH VEZIKLOV

Za pripravo lipidnih veziklov smo uporabili lipide 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfatidilholin (POPC) in holesterol (kupljeni pri Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Alabama, ZDA). Lipidi so bili raztopljeni v mešanici kloroforma in metanola (v volumskem razmerju 2:1) s koncentracijo 1 mg/mL.

Orjaške unilamelarne vezikle (GUV) smo pripravili z modificirano metodo elektroformacije (predlagano po: Angelova in sod., 1992). POPC in holesterol smo zmešali v volumskem razmerju 4:1 in mešanico (50 μ L) nanesli na par platinastih elektrod in sicer na vsako le približno 20 μ L, ker je bila raztopina zaradi kloroforma zelo hlapna. Elektrodi smo sušili v posodi z nizkim vakuumom. Sušenje je trajalo dve uri in v tem času je večina topila izhlapela. Nato smo elektrodi v medsebojni oddaljenosti 4 mm vstavili v elektroformacijsko kamrico, ki jo je predstavljala centrifugirka, napolnjena z 2 ml 0,3 M raztopine saharoze, pripravljene iz saharoze (kupljena pri Sigma–Aldrich, Steinheim, Nemčija) in destilirane vode. Elektrodi smo priključili na generator napetosti na izmenični električni tok (Slika 4). Elektroformacija je prvi dve uri potekala pri napetosti 5 V/mm in frekvenci 10 Hz. Nato smo v 15-minutnih časovnih intervalih amplitudo in frekvenco električne napetosti postopno zmanjševali, najprej na 2,5 V/mm in 5 Hz, nato na 2,5 V/mm in 2,5 Hz in nazadnje na 1 V/mm in 1 Hz (Iglič in sod., 2003). Elektroformacija je potekala pri sobni temperaturi.



Slika 4: Elektroformacija. Elektrodi smo v medsebojni oddaljenosti 4 mm vstavili v elektroformacijsko kamrico, ki jo je predstavljala centrifugirka napolnjena z 2 ml 0,3 M raztopine saharoze. Elektrodi smo priključili na izmenični električni tok.

Po končani elektroformaciji smo raztopino saharoze z vezikli obdali z 0,3 M raztopino glukoze (že pripravljena 5% glukozna raztopina za intravenozno infuzijo, kupljena pri Krka, d.d., Novo Mesto, Slovenija) v volumskem razmerju 5 : 3 (glukoza : saharoza z vezikli). Različni raztopini smo uporabili z namenom vzpostavljanja kontrasta med vezikli in okolico. Saharozna raztopina znotraj veziklov je gostejša od saharozno-glukozne raztopine zunaj njih, zato so vezikli s faznokontrastnim svetlobnim mikroskopom bolje opazni v okoliškem mediju. Raztopini sta bili ekvimolarni, saj so vezikli občutljivi na osmotske razlike in bi v nasprotnem primeru počili.

Raztopino veziklov smo pred izvedbo poskusa čez noč shranili na sobni temperaturi v nizkem vakuumu.

3.2 PRIPRAVA TESTNIH RAZTOPIN

Med optimizacijo metode (opisano v nadaljevanju) smo preverjali učinke C_{60} , ZnO, Cu in Ag (10-15 nm) ter 15 nm in 40 nm TiO_2 . Pri preučevanju ZnO in TiO_2 smo poleg delcev nano velikosti naredili poskuse tudi z delci makrometrskih velikosti. V končnem poskusu smo kot testne raztopine uporabili C_{60} , ZnO in TiO_2 , nadalje pa smo statistično obdelali le C_{60} (kupljeni pri Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

Nanodelce smo suspenziji veziklov dodajali raztopljene v tekoči fazi (50 mM raztopina nanodelcev), kot medij za suspenzijo pa smo uporabili že pripravljeno 5% glukozno raztopino za intravenozno infuzijo (kupljena pri Krka, d.d., Novo mesto, Slovenija). Ustrezno koncentracijo topljenca smo določili s pomočjo enačbe za množino snovi (1), kjer je m masa snovi in M molska masa snovi, ter enačbe za molarost raztopine (2), kjer je n množina snovi in V volumen raztopine.

$$n = \frac{m}{M} \quad \dots(1)$$

$$C = \frac{n}{V} \quad \dots(2)$$

Kot referenčno kemikalijo smo izbrali ZnCl_2 , prav tako raztopljeno v 5% glukozni raztopini. Za ZnCl_2 je znano, da inducira lipidno peroksidacijo (Brocado in sod., 2004). V kontrolnem poskusu smo suspenziji veziklov dodali le 5% raztopino glukoze.

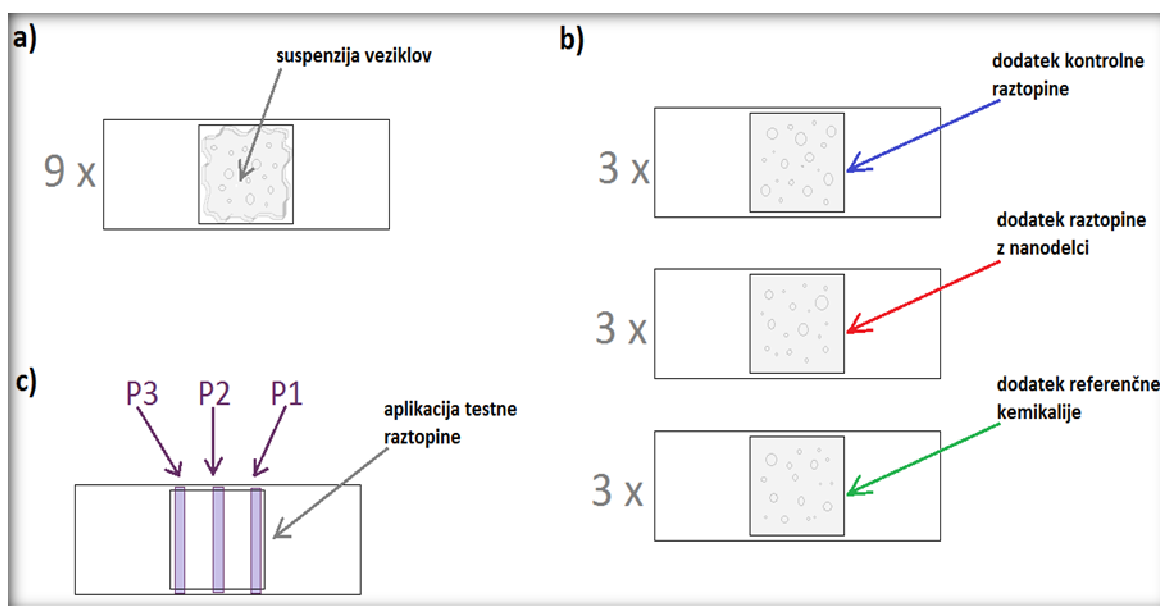
Založna suspenzija C_{60} nanodelcev (1000 $\mu\text{g/ml}$) je bila pripravljena v destilirani vodi. Suspenzija je bila nato sonicirana pri 20 kHz. S tem smo dosegli večjo razpršenost fulerenov v raztopini, saj so fulereni v vodi slabo topni. Glukozne raztopine nismo dodajali, saj je bila založna raztopina že dovolj razredčena.

3.3 IZVEDBA POSKUSA IN ZAJEM MIKROGRAFIJ

Ker so se vezikli čez noč zaradi gravitacije posedli, smo pred izvedbo poskusa raztopino veziklov premešali, tako da smo epruvetko Ependorf (epico) trikrat obrnili navzdol. Nato smo na vsako objektno steklo (26 x 60 mm) v razmaku, ki je ustrezal širini krovnega stekelca, na dve nasprotni stranici nanegli silikonsko mast in pokrili s krovnim stekelcem (15 mm x 15 mm). Tako smo naredili opazovalno celico s približnim volumnom 50 μl . V celico smo z ene strani nanegli 45 μl suspenzije veziklov (Slika 5). Z nasprotne strani smo dodali ustrezno testno raztopino (5 μl) in takoj za tem s silikonsko mastjo zaprli še ostali odprti stranici. S tem smo preprečili pretakanje raztopine po celici zaradi evaporacije vzorca.

Uporabili smo tri različne testne raztopine, raztopino z nanodelci, raztopino z referenčno kemikalijo ZnCl_2 ter raztopino brez nanodelcev (Slika 5). Da bi lahko ocenili ponovljivost poskusa, smo poskus z vsako testno raztopino naredili v treh ponovitvah.

Ker smo testno raztopino dodali le z ene strani, se je ustvaril koncentracijski gradient. Ob stranici, kjer smo testno raztopino dodali, je bila gostota delcev največja; ta pas smo označili s P1. Pas ob nasprotni stranici, kjer je bila koncentracija delcev najmanjša, smo označili s P3, pas med P1 in P3 pa smo označili s P2 (Slika 5). Ta področja smo izbrali, da bi lahko zajeli dinamiko transformacije oblik veziklov v odvisnosti od gradienta koncentracij testne spojine.



Slika 5: Priprava preparatov in zajem videoposnetkov. Na vsakega od devetih objektnih stekelc smo nanесли 45 μl raztopine z lipidnimi vezikli (a); nato smo dodali 5 μl raztopine nanodelcev, referenčne oziroma kontrolne raztopine, in sicer vsako testno raztopino na tri objektna stekelca (b). Na sliki so označeni trije pasovi zajemanja slik, P1, P2 in P3 (c).

Ker smo želeli preučiti morfološke transformacije lipidnih veziklov v odvisnosti od časa in ne le od koncentracije raztopine z nanodelci, smo fotografije zajemali v različnih časovnih zamikih od dodatka testnih raztopin (preglednica 1). Prvi čas, čas 1, označuje zajem fotografij takoj po pripravi preparata s suspenzijo lipidnih veziklov, še pred dodatkom testne raztopine. Sledil je dodatek testne raztopine, zapečatenje opazovalne celice in zajem

sklopa mikrofotografij, ki smo ga označili s časom 10 (od priprave preparata lipidnih veziklov je minilo 10 minut). Naslednji sklop mikrofotografij smo posneli po 90 minutah inkubacije veziklov z nanodelci oziroma 100 minut po pripravi preparata (čas 100). Čas 120 označuje mikrofotografije zajete 110 minut po dodatku testne spojine oziroma 120 minut po pripravi preparata.

Tabela 1: Čas zajemanja mikrofotografij.

Oznaka	Čas zajemanja mikrofotografij
1	Takoj po pripravi preparata, pred dodatkom testne raztopine
10	10 minut po pripravi preparata, takoj po dodatku testne raztopine
100	100 minut po pripravi preparata, 90 minut po dodatku testne raztopine
120	120 minut po pripravi preparata, 110 minut po dodatku testne raztopine

Za opazovanje morfoloških transformacij lipidnih veziklov smo uporabili invertni fazno-contrastni svetlobni mikroskop (Nikon Eclipse TE200-S). Fotografije smo zajemali pri 400-kratni povečavi, s CCD modulom video kamere (model: Sony XC-77CE), priključenim na mikroskop. Pri tej povečavi so dobro vidni vezikli, katerih polmer je večji od 4 μm . Dimenzija vidnega polja kamere je pri tej povečavi 190 μm x 143 μm . Mikrofotografije smo zajemali pri istem žarišču, saj se vezikli že po nekaj minutah inkubacije zberejo na dnu opazovalne celice in je tako večina veziklov prisotna v enaki globini preparata. Za vsak preparat smo za vsak pas (P1, P2 in P3) v določenem času (po 1, 10, 100 in 120 minutah inkubacije) posneli po 15 mikrofotografij. Da bi bili rezultati čim bolj reprezentativni, smo mikrofotografije zajemali s pomikanjem objektiva v približno enakih razmakih od zgornjega do spodnjega roba vsakega od pasov. Pasovi so merili 150 μm x 15000 μm .

3.3.1 Faze v optimizaciji metode

Ker na začetku preučevanja morfoloških transformacij lipidnih veziklov še nismo vedeli, kako velike spremembe med netretiranimi in z nanodelci tretiranimi vezikli lahko pričakujemo, smo se odločili, da za začetek naredimo le kratke reprezentativne videoposnetke pripravljenih preparatov z lipidnimi vezikli in nanodelci. Za poskus smo

izbrali nanodelce različne kemijske sestave in velikosti: Cu, Ag, ZnO, TiO₂ (15 in 40 nm) ter fulerene C₆₀. V primeru spojin ZnO in TiO₂ smo pripravili tudi preparate z dodatkom delcev makrometrskih velikosti. Vzporedno smo naredili poskus z referenčno kemikalijo (ZnCl₂) in kontrolni poskus (brez dodatka delcev). Za vsak tretma smo naredili serijo 5 minutnih videoposnetkov, in sicer pred dodatkom testne spojine, takoj po dodatku testne spojine, 10 min po dodatku testne spojine, 50 min po dodatku testne spojine, 110 min po dodatku testne spojine in na koncu še 180 min po dodatku testne spojine.

Na videoposnetkih ni bilo opaziti očitnih morfoloških sprememb lipidnih veziklov med tretmaji, zato smo se v sodelovanju s strokovnjakom s področja računalništva in informatike odločili za bolj kvantitativen pristop. Namesto videoposnetkov smo posneli mikrografije. Za vsak preparat smo vzdolž vsakega pasu, P1, P2 in P3 (opisano zgoraj) posneli 15 mikrografij ob različnih časih inkubacije, in sicer pred dodatkom testne spojine ter 30 min, 80 min, 150 min in 240 min po dodatku testne spojine. Poskus smo izvedli le z nanodelci ZnO. Vzporedno smo naredili še kontrolni poskus brez dodatka nanodelcev in poskus z referenčno kemikalijo.

V naslednji fazi razvijanja metode smo čase zajemanja mikrografij omejili na le dve seriji; prvo pred dodatkom testne spojine in drugo 90 minut po dodatku testne spojine. Poleg ZnO nano velikosti, smo opazovali tudi vpliv ZnO makro velikosti in vpliv fulerenov C₆₀. Vzporedno smo tako kot v prejšnjih dveh fazah naredili še kontrolni poskus in poskus z referenčno kemikalijo.

Glede na prejšnje poskuse smo ugotovili, da so najprimernejši časi za zajemanje mikrografij pred dodatkom testne spojine (čas 1), takoj po dodatku testne spojine (čas 10), 90 min po dodatku testne spojine (čas 100) ter 110 min po dodatku testne spojine (čas 120). Naredili smo tri serije poskusov; prvo s fulereni C₆₀, drugo z ZnO nano- in makrometrskih velikosti, tretjo pa s TiO₂ prav tako nano- in makrometrskih velikosti. V vseh treh primerih smo naredili poskus z referenčno kemikalijo ZnCl₂ in kontrolni poskus brez dodatka nanodelcev. Poskus z vsako testno raztopino smo naredili v treh ponovitvah (Slika 5). Zaradi obsežnosti analize smo računalniško in statistično obdelali le posnetke iz serije poskusov s fulereni.

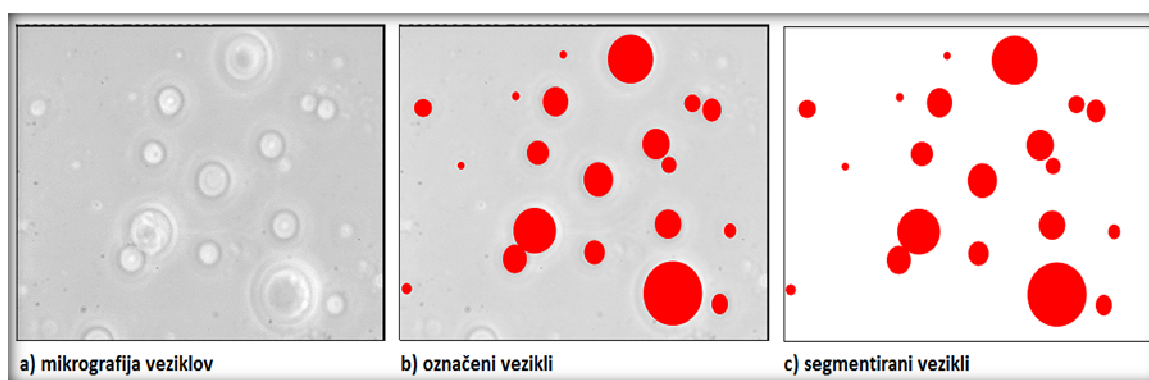
3.3.2 Poskus z destilirano vodo

Nanodelce in referenčno kemikalijo smo suspenziji veziklov dodajali raztopljene v glukozni raztopini. Ravno pri fullerenu C_{60} , ki smo jih nadalje obdelali, pa smo založno raztopino (C_{60} v destilirani vodi) imeli že dovolj razredčeno in zato nadaljna redčitev z glukozo ni bila potrebna. To dejstvo smo med izvedbo poskusov zanemarili, zato smo na koncu naredili dodatni poskus, s katerim smo preučili vpliv destilirane vode na populacijo veziklov. Pripravili smo preparat suspenzije lipidnih veziklov (45 μ l) in na mestu P1 posneli 15 mikrografij (čas 1). Po 10 minutni inkubaciji smo dodali 5 μ l destilirane vode in posneli še 15 mikrografij (čas 10).

3.4 OBDELAVA SLIK

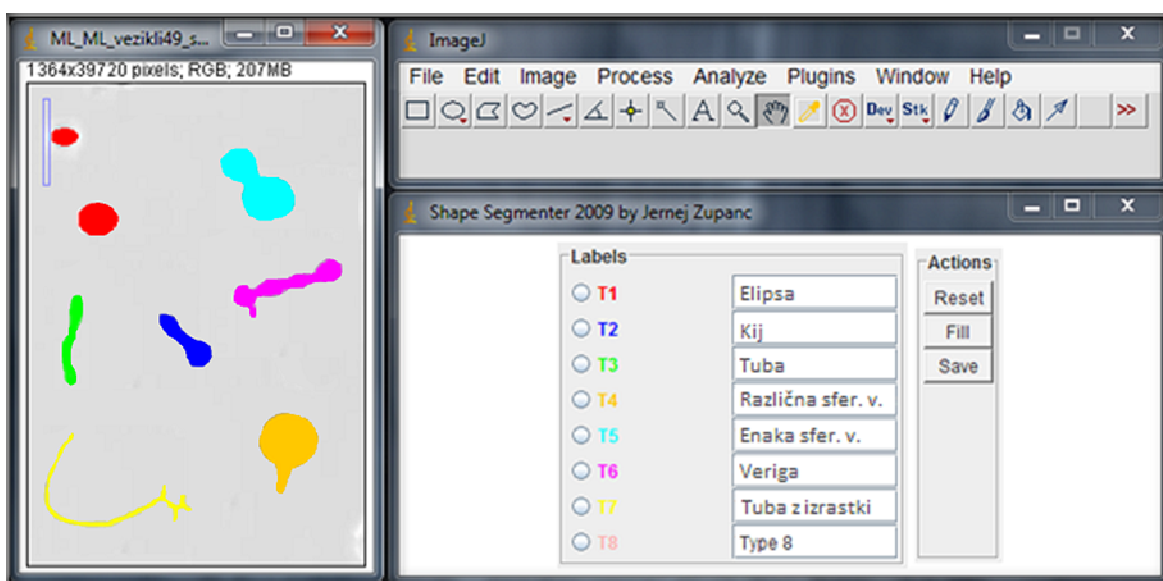
Analiza posnetih mikrografij in statistična obdelava podatkov sta potekali v sodelovanju s strokovnjakom s področja računalništva in informatike (Zupanc, J.).

Začetna obdelava mikrografij je zajemala povečanje kontrasta in odstranitev šuma, ki so ga v večini predstavljali kristalizirani lipidi. Temu je sledila segmentacija lipidnih veziklov. To je postopek, pri katerem smo na mikrografijah, v programu za urejanje slik (Adobe Photoshop CS2), vezikle označili z rdečimi krogi oziroma elipsami in tako obdelanim slikam odstranili ozadje (Slika 6).



Slika 6: Segmentacija lipidnih veziklov. Na sliki (a) je mikrografija z lipidnimi vezikli. Te vezikle smo v računalniškem programu ročno označili (b) in jih nato segmentirali s prvotne mikrografije (c).

Poleg sferičnih veziklov smo želeli preučiti še pojavljanje veziklov v različnih fazah transformacije oziroma organiziranih v posebne strukture, kot so na primer verižice, tube in podobno, zato smo razvili vtičnik za odprtokodni program za obdelavo slik ImageJ (Slika 7). Tudi segmentacija teh oblik je potekala ročno. Vsak tip veziklov smo označili z določeno barvo. Za ekstrakcijo lastnosti veziklov (površina, premer) s segmentiranih mikrografij smo uporabili Matlab algoritem. Algoritem razdeli vsako mikrografijo v plasti, ki vsebujejo le piksele ene barve. Tako smo lahko analizirali vsak tip veziklov posebej.



Slika 7: Segmentacija posebnih struktur z vtičnikom za segmentacijo oblik za odprtokodni program za obdelavo slik ImageJ. Poleg posameznih sferičnih veziklov smo označevali tudi vezikle v različnih fazah transformacije in vezikle organizirane v posebne strukture. Vsak tip veziklov smo označili z določeno barvo (prirejeno po: Zupanc, J.).

3.4.1 Obdelava podatkov

Vse skupaj smo posneli 1620 slik, na katerih smo detektirali 21.323 veziklov. Vsakemu detektiranemu veziklu smo določili polmer in stopnjo ekscentričnosti, ga uvrstili v določen velikostni razred ter mu pripisali morfološko obliko. Osnovna oblika lipidnih veziklov je sferična, v vsaki populaciji veziklov pa lahko opazimo tudi vezikle v različnih fazah morfoloških transformacij, na primer kombinacijo veziklov, kjer sta dva vezikla med seboj povezana, vezikle v obliki tub, verižic idr.

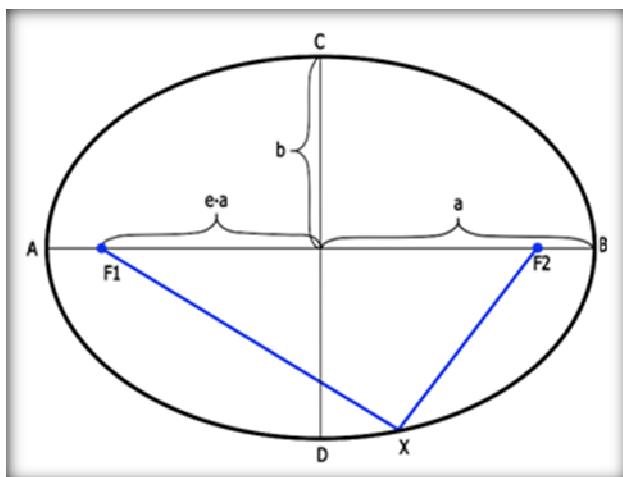
Podatke smo združili po skupinah glede na dodano testno raztopino (raztopina nanodelcev, raztopina z referenčno kemikalijo ali kontrolna raztopina), čas inkubacije (1, 10, 100 ali 120 min) ter mesto na preparatu, kjer so bile mikrofije posnete (P1, P2 ali P3). Za ovrednotenje interakcij nanodelcev z lipidnimi membranami smo v vsaki populaciji veziklov določili število, velikost, povprečno stopnjo ekscentričnosti veziklov ter delež veziklov z določeno morfološko transformacijo. V primeru poskusa z destilirano vodo smo preučili vpliv vode le na številčnost veziklov.

3.4.1.1 Izsrednost ali ekscentričnost

Izsrednost ali ekscentričnost je število povezano z obliko stožnice. Ločimo dve vrsti ekscentričnosti, linearno in numerično. Linearna ekscentričnost je razdalja med središčem stožnice in njenim goriščem. Numerična ekscentričnost je razmerje med linearno ekscentričnostjo in dolžino polosi a , na kateri leži gorišče, in je mera, ki pove, za koliko se stožnica razlikuje od krožnice. Podana je z enačbo (3), kjer je a dolžina velike polosi stožnice, b dolžina male polosi in k enak +1 za elipso, 0 za parabolo in -1 za hiperbolo (Bronštejn in sod., 1997; Kavkler in sod., 2008).

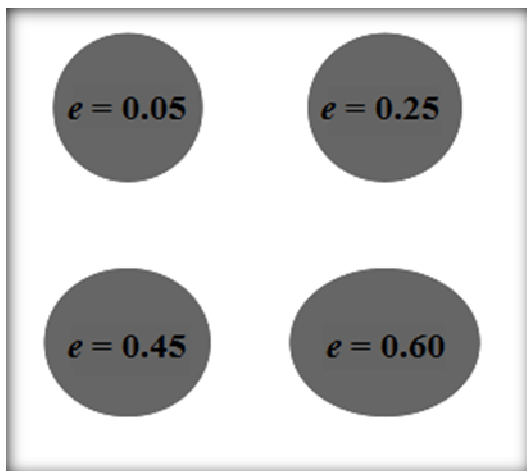
$$e = \frac{\sqrt{a^2 - kb^2}}{a} \quad \dots(3)$$

Za krožnico velja $e = 0$, za elipso $0 < e < 1$, za parabolo $e = 1$ in hiperbolo $e > 1$. V našem primeru se vrednosti za ekscentričnost nahajajo med 0 in 1, saj so vezikli na mikrofijah elipsoidne oblike (Slika 8).



Slika 8: Elipsa. Je ena od stožnic in je sklenjena ravninska krivulja ovalne oblike, pri kateri je vsota razdalj katerekoli točke od gorišč F_1 in F_2 stalna.

Na Sliki 9 so grafično prikazani štirje primeri ekscentričnosti veziklov in sicer za vrednosti $e = 0.05$, $e = 0.25$, $e = 0.45$ in $e = 0.60$.

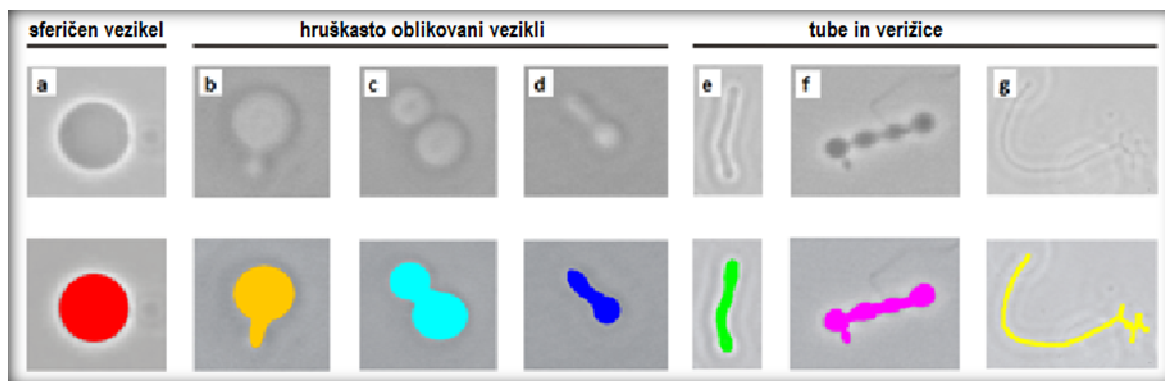


Slika 9: Ekscentričnost veziklov. Grafično so predstavljeni primeri različne ekscentričnosti (e) veziklov. Z večanjem e se ekscentričnost povečuje, kar pomeni, da vezikli postajajo vedno bolj elipsolidni (prirejeno po: Zupanc, J.).

3.4.1.2 Posebne oblike veziklov

Morfološko transformirane vezikle smo razvrstili v več kategorij (Slika 10). Slika 10-a prikazuje sferični vezikel, ki je videti kot bolj ali manj okrogel vezikel, brez vidnih izrastkov. Oblike veziklov na Sliki 10-b, 10-c in 10-d so različne stopnje morfološke

transformacije vezikla z brstom oziroma t.i. hruškasto oblikovani vezikli. V to skupino spadajo hruškasto oblikovani vezikli s širokim (Slika 10-d) in hruškasto oblikovani vezikli z ozkim vratom. Slednje nadalje delimo na povezana sferična vezikla različne velikosti (Slika 10-b) ter povezana sferična vezikla približno enake velikosti (Slika 10-c). Naslednji sklop veziklov predstavljajo tube in verižice. Slika 10-e predstavlja vezikel tubularne oblike, na Sliki 10-f je prikazan vezikel z obliko verižice, ki je niz povezanih majhnih sferičnih veziklov približno enake velikosti, Slika 10-g pa prikazuje tanko tubularno oblikovano strukturo z izrastki. Različne oblike veziklov smo za lažjo nadaljno obdelavo segmentirani z različnimi barvami (Slika 10-spodaj).



Slika 10: Oblike veziklov. Na sliki so primeri mikrofografij veziklov za vsako od preučevanih oblik (zgoraj) s pripadajočim obrisom določene barve (spodaj); a – sferičen vezikel; b in c predstavljata "hruške", z ozkim vratom (b – dva sferična vezikla različne velikosti, d – dva sferična vezikla približno enake velikosti); c prikazuje "hruško", s širokim vratom; e – vezikel tubaste oblike; f – verižica; g – tuba z izrastki (prirejeno po: Zupanc, J.).

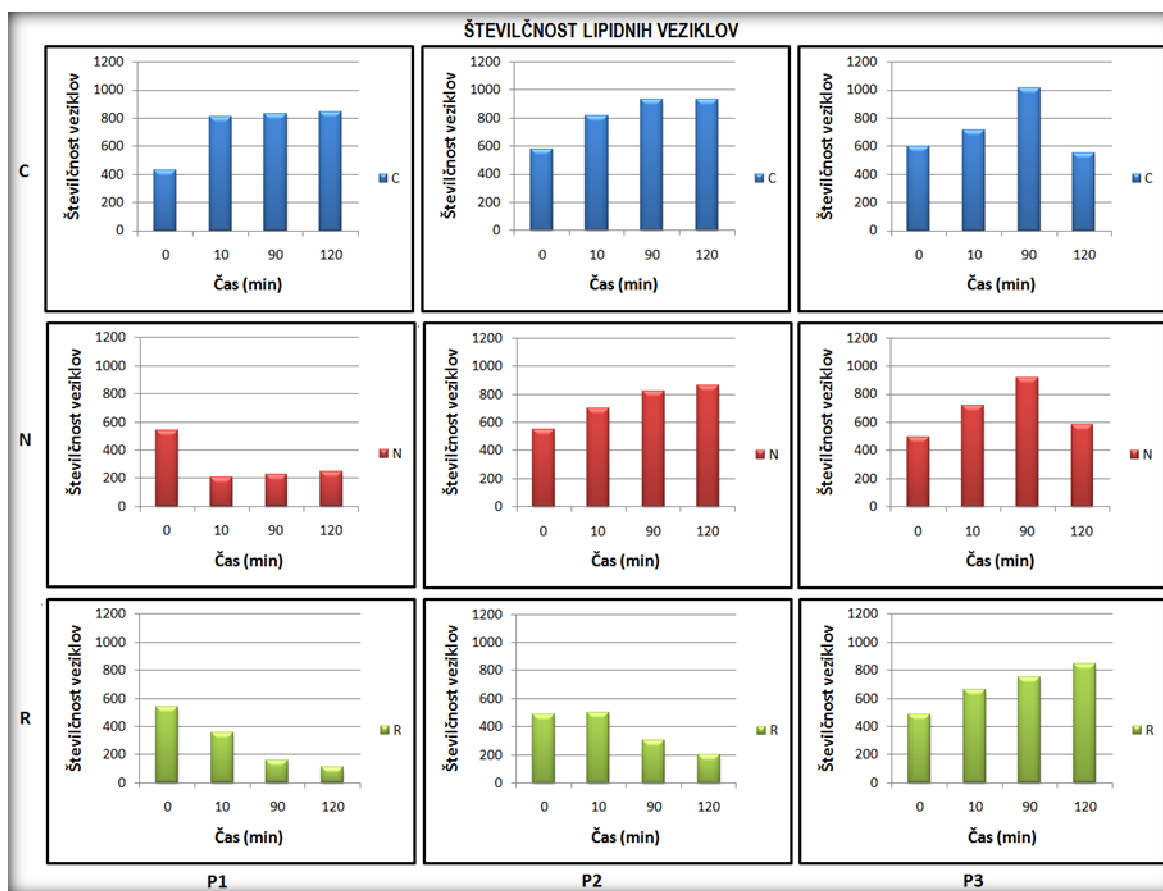
Pri analizi morfoloških transformacij veziklov smo se osredotočili le na hruškasto oblikovane vezikle, veziklov v obliki tub in verižic pa naprej nismo obdelovali. Tudi dveh različnih zgoraj opisanih oblik hrušk z ozkim vratom nadalje nismo obdelovali; posebej smo obravnavali le hruškasto oblikovane vezikle s širokim in hruškasto oblikovane vezikle z ozkim vratom. Ker so take oblike relativno redke, smo število obravnavanih veziklov izrazili kot delež določene oblike veziklov na 1000 v obravnavani skupini detektiranih veziklov.

4 REZULTATI

4.1 ŠTEVILČNOST LIPIDNIH VEZIKLOV

Številčnost lipidnih veziklov je na spodnjem sklopu grafov (Slika 11) prikazana v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Številčnost veziklov predstavlja število detektiranih veziklov v posamezni testni skupini. Vsaka vrednost je povprečje treh vzporednih poskusov. Za lažjo primerjavo posameznih skupin veziklov glede na dodano testno raztopino in mesto zajemanja mikrofotografij, je številčnost veziklov prikazana na ločenih grafih. Prva vrsta grafov predstavlja rezultate kontrolne skupine brez dodanih nanodelcev (C – modro obarvana), srednja vrsta predstavlja skupino, ki smo ji dodali nanodelce C_{60} (N – rdeče obarvana), spodnja vrsta pa predstavlja rezultate poskusov z referenčno kemikalijo $ZnCl_2$ (R – zeleno obarvana). Od leve proti desni si sledijo različni pasovi zajemanja mikrofotografij, P1, P2 in P3. Največje razlike med tretmaji opazimo na mestu P1, kjer je koncentracija testne raztopine največja. Število veziklov se po dodatku testne raztopine z nanodelci C_{60} zmanjša. Opazimo lahko, da sta dve tretjini veziklov počili v prvih 10 minutah inkubacije, nadaljna inkubacija pa številčnosti ni bistveno zmanjšala. Do zmanjšanja številčnosti veziklov pride tudi pri dodatku testne raztopine z referenčno kemikalijo $ZnCl_2$, medtem ko po dodatku testne raztopine brez nanodelcev opazimo povečanje številčnosti veziklov. Slednje lahko razložimo z učinkom gravitacije. V veziklih je čista raztopina saharoze, zunaj veziklov pa mešanica saharoze in glukoze. Sama saharoza v veziklih je težja, zato se vezikli po pripravi preparata začnejo posedati na dno opazovalne komore (Döbereiner in sod., 1999).

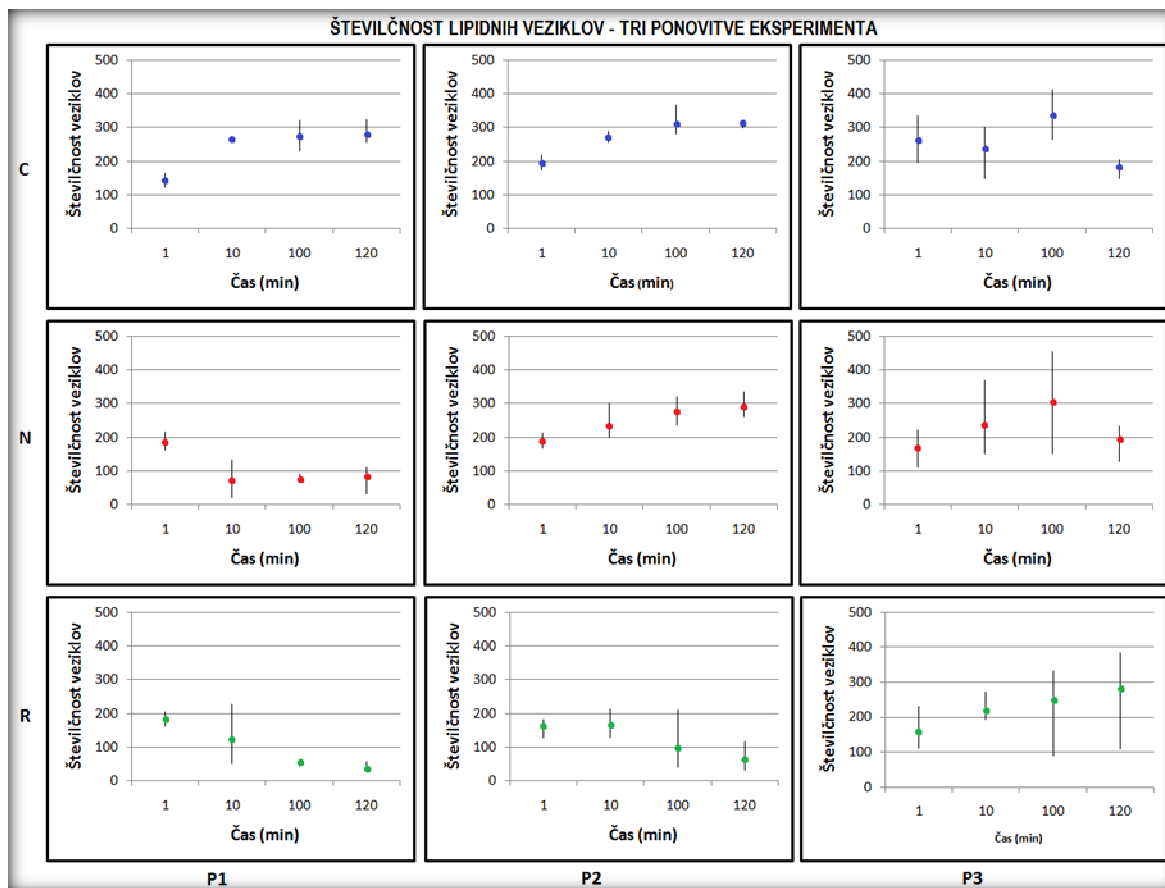
Na mestu P2, kjer je koncentracija dodanih delcev zaradi relativno počasnega procesa difuzije manjša kot na mestu P1, številčnost veziklov pri skupini z dodanimi nanodelci narašča. Rezultati na tem mestu so primerljivi s kontrolno skupino. Na mestu P2 (sredina preparata) je koncentracija očitno že premajhna, da bi prišlo do padca številčnosti kot pri referenčni skupini. Na mestu P3, kjer je koncentracija testnih raztopin najmanjša, med tretmaji C, N in R ni večjih razlik.



Slika 11: Številčnost lipidnih veziklov. Posamezni grafi prikazujejo številčnost veziklov v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Vsaka vrednost je povprečje treh ponovitev poskusa za vsak tretma. Številčnost posameznih skupin veziklov je prikazana na ločenih grafih, glede na dodano testno raztopino in mesto zajemanja mikrografij. Od zgoraj navzdol si sledijo kontrolna skupina (C), skupina z dodanimi nanodelci C_{60} (N) in skupina, kateri smo dodali referenčno kemikalijo $ZnCl_2$ (R). Od leve proti desni si sledijo različni pasovi zajemanja mikrografij, P1 (najvišja koncentracija delcev), P2 (srednja koncentracija delcev) in P3 (najnižja koncentracija delcev).

Poskus z vsako testno raztopino smo naredili v treh ponovitvah. V zgornjih grafih (Slika 11) so prikazana povprečja treh ponovitev poskusa za vsako testno skupino, v naslednjem sklopu grafov (Slika 12) pa so za vsako testno skupino (C, N in R) poleg povprečja treh ponovitev (pike modre, rdeče oziroma zelene barve) prikazani tudi poskusi z maksimalno številčnostjo veziklov (zgornji konec navpične črte) in poskusi z minimalno številčnostjo veziklov (spodnji konec navpične črte). Najmanjše razpone v številčnosti veziklov med tremi ponovitvami poskusa opazimo na mestu P1 in P2 pred dodatkom testnih raztopin (čas 1). Večje razpone opazimo na mestu P1 pri referenčni in nano skupini po 10 minutah

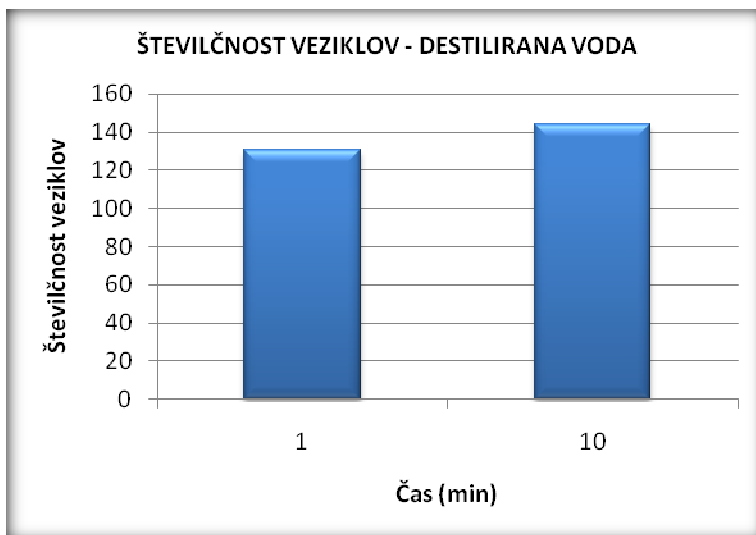
inkubacije, kar je čas dodatka testnih raztopin, in na mestu P2 pri referenčni skupini po 100 minutni inkubaciji. Do največjih razponov v številčnosti veziklov pride na mestu P3.



Slika 12: Številčnost lipidnih veziklov (maksimumi, minimumi in povprečja treh ponovitev poskusa za vsak tretma). Posamezni grafi prikazujejo številčnost veziklov v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Zgornji konec vsake črte predstavlja ponovitev z maksimalno številčnostjo veziklov v določeni skupini, spodnji z minimalno, barvna pika pa predstavlja povprečje treh ponovitev. Številčnost posameznih skupin veziklov je prikazana na ločenih grafih, glede na dodano testno raztopino in mesto zajemanja mikrografij. Od zgoraj navzdol si sledijo kontrolna skupina (C), skupina z dodanimi nanodelci C₆₀ (N) in skupina, kateri smo dodali referenčno kemikalijo ZnCl₂ (R). Od leve proti desni si sledijo različni pasovi zajemanja mikrografij, P1 (najvišja koncentracija delcev), P2 (srednja koncentracija delcev) in P3 (najnižja koncentracija delcev).

V vseh primerih smo nanodelce suspenziji lipidnih veziklov dodajali v raztopini glukoze, prav tako referenčno kemikalijo, v primeru kontrole pa smo dodali le glukozno raztopino. Pri tem smo zanemarili dejstvo, da ravno fullerene (C₆₀), ki smo jih izmed vseh nanodelcev edine nadalje obdelali, nismo pripravili v glukozni raztopini, saj je bila založna raztopina že dovolj razredčena (C₆₀ v destilirani vodi). Da bi dokazali, da to ni imelo velikega vpliva

na rezultate, smo naredili še dodaten kontrolni poskus, s katerim smo pokazali vpliv same destilirane vode na populacijo lipidnih veziklov.



Slika 13: Vpliv destilirane vode na številčnost veziklov. Graf prikazuje številčnost veziklov v odvisnosti od časa inkubacije, pri čemer 1 minuta inkubacije predstavlja številčnost veziklov pred dodatkom destilirane vode, 10 minutna inkubacija pa številčnost veziklov takoj po dodatku destilirane vode.

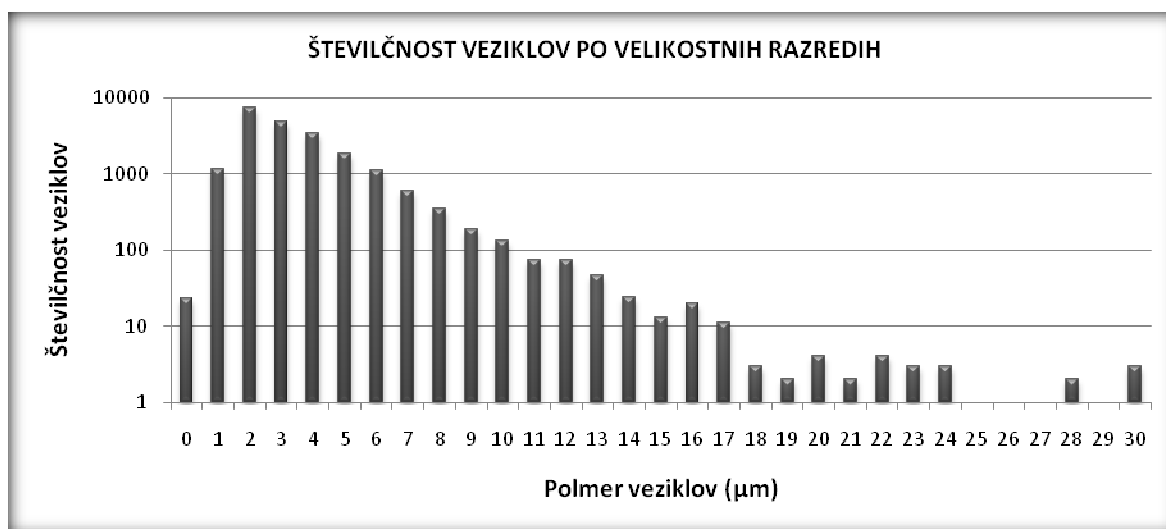
Na zgornjem grafu (Slika 13) vidimo, da se po dodatku destilirane vode (čas 10) številčnost veziklov rahlo poveča.

4.2 VELIKOSTNA RAZPOREDITEV POPULACIJE LIPIDNIH VEZIKLOV

Da bi preučili velikostno porazdelitev veziklov, smo vse vezikle, ki smo jih detektirali, razvrstili v velikostne razrede (Tabela 2). Tabela prikazuje število veziklov v posameznem razredu. Velikosti veziklov zavzemajo vrednosti med 0.2 μm in 30.3 μm . Razredov je 30, širina vsakega razreda pa je 1 μm . Izjema je razred 0, ki ima širino 0.5 μm .

Tabela 2: Vsi detektirani vezikli, grupirani po velikostnih razredih. V prvem stolpcu so velikostni razredi, v drugem širine razredov glede na polmere veziklov in v tretjem število veziklov v posameznem razredu.

Velikostni razred	Polmer (μm)	Št. Veziklov
0	0 - 0.5	23
1	0.5 - 1.5	1142
2	1.5 - 2.5	7486
3	2.5 - 3.5	4831
4	3.5 - 4.5	3368
5	4.5 - 5.5	1833
6	5.5 - 6.5	1096
7	6.5 - 7.5	591
8	7.5 - 8.5	347
9	8.5 - 9.5	185
10	9.5 - 10.5	133
11	10.5 - 11.5	74
12	11.5 - 12.5	74
13	12.5 - 13.5	46
14	13.5 - 14.5	24
15	14.5 - 15.5	13
16	15.5 - 16.5	20
17	16.5 - 17.5	11
18	17.5 - 18.5	3
19	18.5 - 19.5	2
20	19.5 - 20.5	4
21	20.5 - 21.5	2
22	21.5 - 22.5	4
23	22.5 - 23.5	3
24	23.5 - 24.5	3
25	24.5 - 25.5	0
26	25.5 - 26.5	0
27	26.5 - 27.5	0
28	27.5 - 28.5	2
29	28.5 - 29.5	0
30	29.5 - 30.5	3

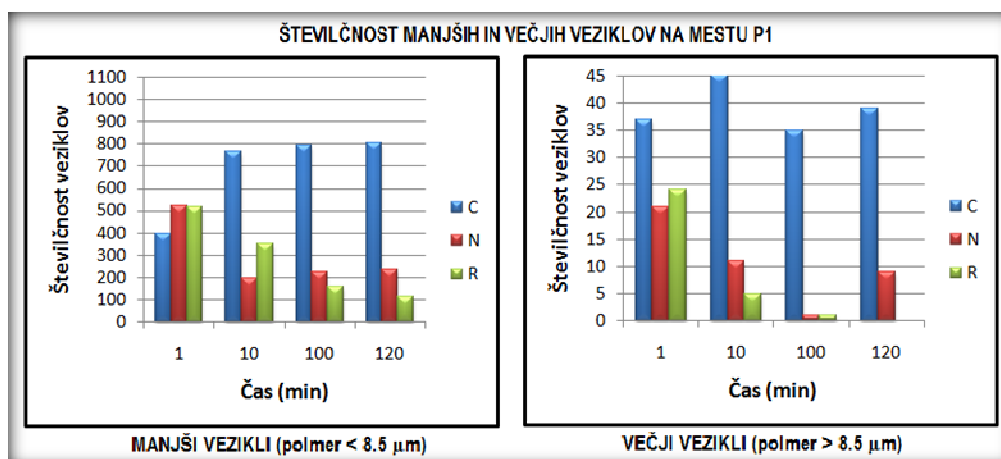


Slika 14: Številčnost veziklov po velikostnih razredih. Skala na ordinatni osi je logaritemska.

Zgornji graf (Slika 14) prikazuje število veziklov v posameznem velikostnem razredu. Velikostna razporeditev populacije lipidnih veziklov je neenakomerna. Večina veziklov se nahaja v velikostnih razredih z manjšimi radiji. Največ veziklov pade v velikostni razred 2 μm , a so vezikli lahko veliki tudi nad 30 μm . Vrednost mediane je 2.9 μm .

4.3 ŠTEVILČNOST VEČJIH IN MANJŠIH LIPIDNIH VEZIKLOV

Zaradi neenakomerne velikostne razporeditve populacije veziklov smo se odločili, da bomo vezikle razdelili v dve skupini in sicer v skupino z manjšimi vezikli, ki predstavljajo večinski del populacije veziklov, in pa v skupino z večjimi vezikli, ki predstavljajo manjši del populacije veziklov. Mejo, ki razmejuje ti dve skupini, smo postavili pri polmeru 8.5 μm . Tako prva skupina vsebuje vezikle s polmeri med 0 in 8.5 μm , kar zajema 97.2% vseh veziklov, in druga skupina vezikle s polmeri med 8.5 in 30.5 μm , kar pa predstavlja le 2.8% populacije.



Slika 15: Številčnost manjših (polmer < 8.5μm) in večjih (polmer > 8.5μm) veziklov na mestu najvišje koncentracije testne raztopine (pas P1). Grafa prikazujeta številčnost veziklov v odvisnosti od dodane testne raztopine (C – brez nanodelcev, N – nanodelci C₆₀ ter R – referenčna kemikalija ZnCl₂) in časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Vsaka vrednost je povprečje treh ponovitev eksperimenta za vsak tretma. Levi graf predstavlja številčnost manjših veziklov (polmer < 8.5μm), desni pa številčnost večjih veziklov (polmer > 8.5μm).

Na zgornjih grafih (Slika 15) lahko primerjamo številčnost večjih (polmer > 8.5μm) in manjših (polmer < 8.5μm) veziklov na mestu najvišje koncentracije testne raztopine (pas P1). Na vsakem grafu je prikazana številčnost veziklov v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Skupna številčnost veziklov se pri kontroli poveča zaradi povečanja številčnosti manjših veziklov, saj število večjih veziklov med inkubacijo ostaja dokaj nespremenjeno. Pri skupini, kateri smo dodali nanodelce C₆₀, se številčnost veziklov s časom zmanjša, kar opazimo tudi pri skupini, kateri smo dodali referenčno kemikalijo ZnCl₂. V primeru dodatka referenčne kemikalije število večjih veziklov po 120 minutni inkubaciji pade na vrednost 0, medtem ko število manjših pade le za približno dve tretjini. Po dodatku nanodelcev ni opaziti razlik med padcem številčnosti večjih in manjših veziklov; v obeh primerih število veziklov pade za približno dve tretjini.

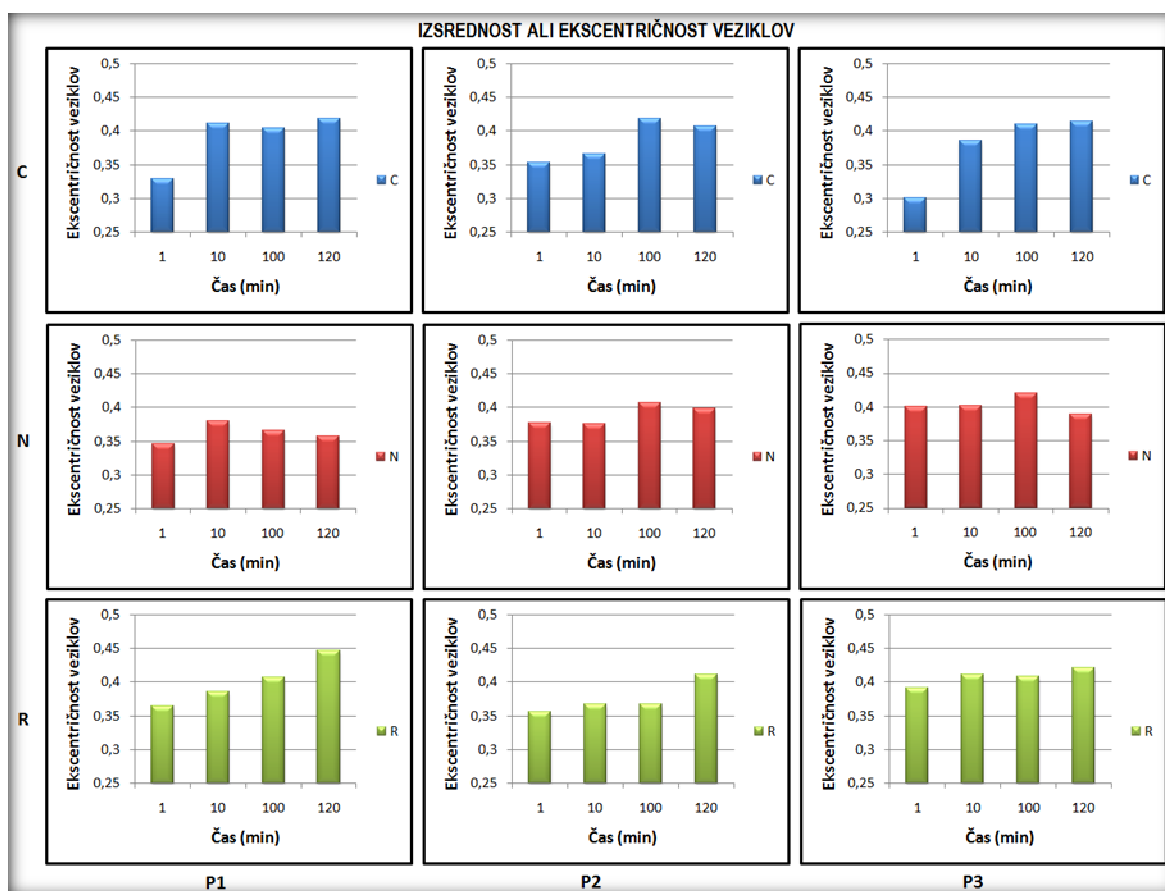
4.4 SPREMINJANJE OBLIKE LIPIDNIH VEZIKLOV

Populacije pripravljenih veziklov se ne razlikujejo le v velikosti in številčnosti veziklov, ampak tudi v obliki veziklov. V populacijah prevladujejo posamezni sferični vezikli (94% detektiranih veziklov), vendar v posameznih populacijah veziklov lahko opazimo tudi

manjši delež hruškasto oblikovanih veziklov (6% detektiranih veziklov). Tudi preprosti sferični vezikli se med seboj razlikujejo, saj imajo različne stopnje ekscentričnosti.

Zanimalo nas je, če med posameznimi tretmaji obstajajo razlike v stopnji ekscentričnosti in v deležu hruškasto oblikovanih lipidnih veziklov.

4.4.1 Izsrednost ali ekscentričnost lipidnih veziklov



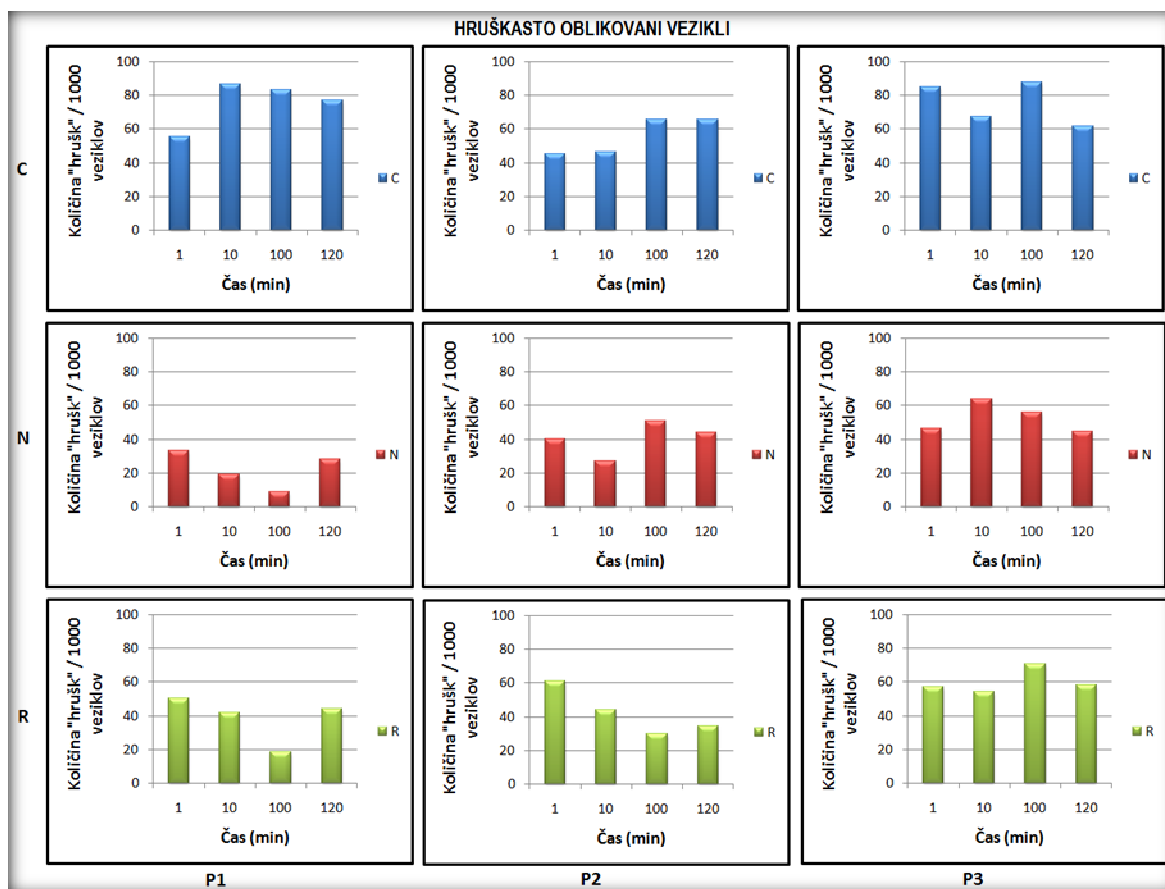
Slika 16: Ekscentričnost veziklov. Ekscentričnost pove, za koliko se stožnica razlikuje od krožnice. Za elipso se vrednosti nahajajo med 0 in 1, pri čemer je 0 krožnica. Posamezni grafi prikazujejo ekscentričnost veziklov v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Vsaka vrednost je povprečna izsrednost veziklov treh ponovitev poskusa. Ekscentričnost posameznih skupin veziklov je prikazana na ločenih grafih, glede na dodano testno raztopino in mesto zajemanja mikrografij. Od zgoraj navzdol si sledijo kontrolna skupina (C), skupina z dodanimi nanodelci C_{60} (N) in skupina, kateri smo dodali referenčno kemikalijo $ZnCl_2$ (R). Od leve proti desni si sledijo različni pasovi zajemanja mikrografij, P1 (najvišja koncentracija delcev), P2 (srednja koncentracija delcev) in P3 (najnižja koncentracija delcev).

Slika 16 prikazuje povprečno ekscentričnost veziklov za vsak tretma (C, N in R) in mesto zajemanja mikrografij (P1, P2 in P3), v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 minut). Ekscentričnost pove, za koliko se stožnica razlikuje od krožnice. Za elipso se vrednosti nahajajo med 0 in 1, pri čemer je 0 krožnica. Pri vseh tretmajih opazimo povečanje ekscentričnosti; vezikli s časom postajajo vedno bolj elipsoidni (če vezikle jemljemo kot dvodimenzionalne oblike, kakršni so na mikrografijah), kar pomeni, da se jim s časom relativni volumen zmanjšuje.

4.4.2 Posebne oblike veziklov

Morfološko transformirane vezikle smo razvrstili v dve kategoriji, v vezikle v obliki verižic in tub in v vezikle v obliki hrušk. Nadalje smo obdelali le drugo od omenjenih skupin. V to skupino uvrščamo vezikle s širokim in vezikle z ozkim vratom.

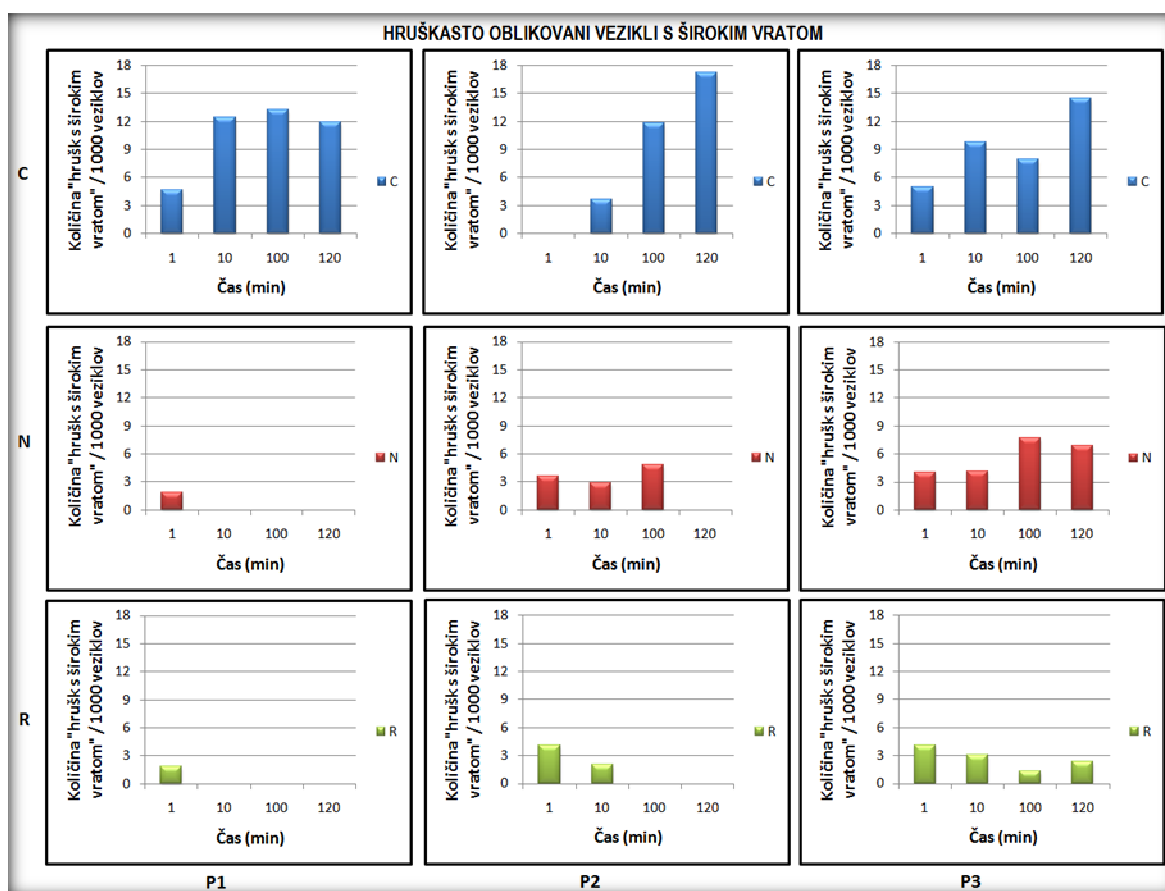
Spodnji grafi (Slika 17) prikazujejo količino hruškasto oblikovanih veziklov / 1000 veziklov v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Številčnost posameznih skupin veziklov je prikazana na ločenih grafih, glede na dodano testno raztopino (C, N in R) in mesto zajemanja mikrografij (P1, P2 in P3). Razlike med tretmaji C, N in R so minimalne.



Slika 17: Količina hruškasto oblikovanih veziklov / 1000 veziklov. Posamezni grafi prikazujejo delež hruškasto oblikovanih veziklov v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Vsaka vrednost je povprečje treh ponovitev poskusa za vsak tretma. Številčnost posameznih skupin veziklov je prikazana na ločenih grafih, glede na dodano testno raztopino in mesto zajemanja mikrografij. Od zgoraj navzdol si sledijo kontrolna skupina (C), skupina z dodanimi nanodelci C_{60} (N) in skupina, kateri smo dodali referenčno kemikalijo $ZnCl_2$ (R). Od leve proti desni si sledijo različni pasovi zajemanja mikrografij, P1 (najvišja koncentracija delcev), P2 (srednja koncentracija delcev) in P3 (najnižja koncentracija delcev).

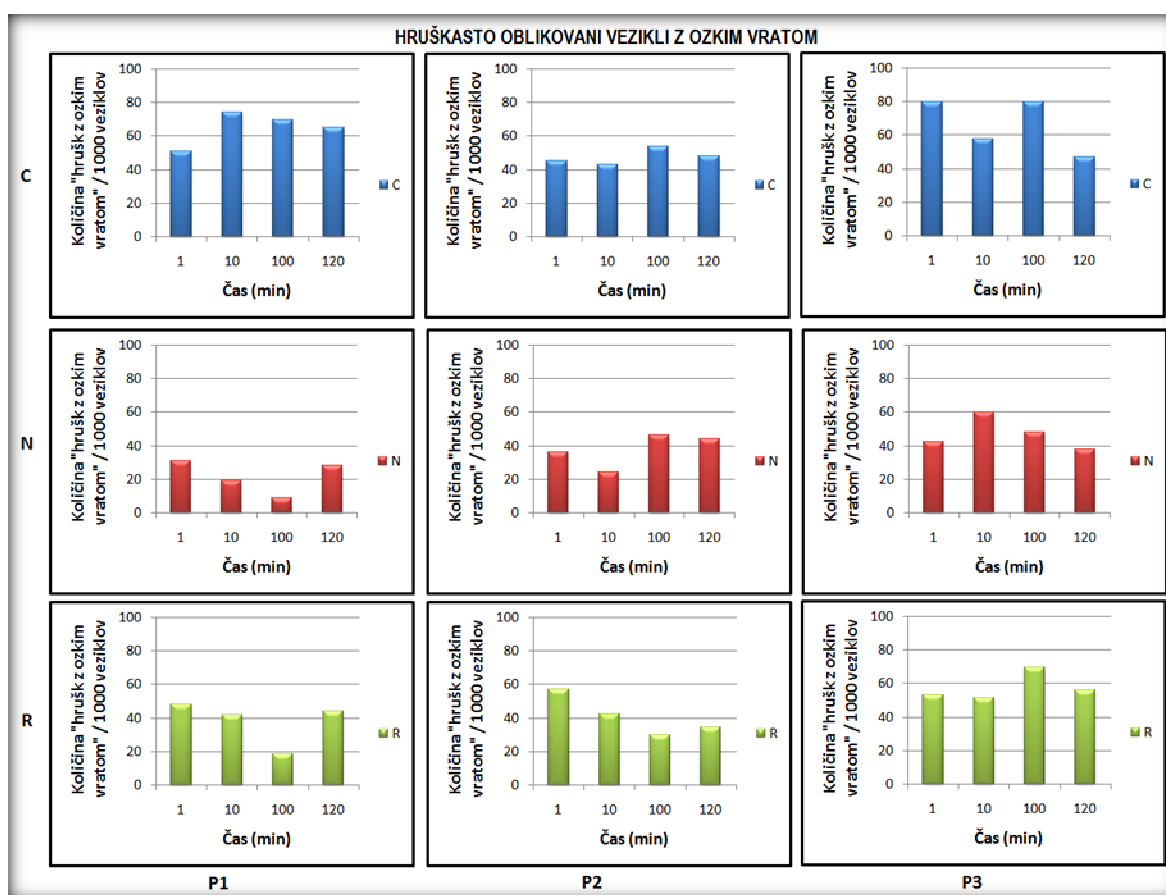
Spodnji grafi (Slika 18) prikazujejo količino hruškasto oblikovanih veziklov s širokim vratom / 1000 veziklov v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Številčnost posameznih skupin veziklov je prikazana na ločenih grafih, glede na dodano testno raztopino (C, N in R) in mesto zajemanja mikrografij (P1, P2 in P3). Razlike med tretmaji opazimo na mestu P1; pri kontroli se po dodatku testne raztopine delež veziklov z obliko hrušk s širokim vratom poveča, pri nano (C_{60}) in referenčni skupini ($ZnCl_2$) pa delež takih veziklov po dodatku testnih raztopin pade na vrednost 0. Na mestu P2 je situacija podobna; pri kontroli delež veziklov v obliki hrušk s širokim vratom med inkubacijo narašča, pri

referenčni skupini pada, pri skupini z dodanimi nanodelci pa delež omenjenih veziklov v končni fazi pade na nič, vendar je delež te oblike že na začetku zelo majhen. Na mestu P3 so manjše razlike opazne, vendar niso zelo izrazite; pri kontroli delež takih veziklov narašča, pri skupini, kateri smo dodali nanodelce, rahlo narašča pri referenci pa rahlo pada. Ker so deleži te oblike glede na skupno število veziklov zelo majhni, ne moremo komentirati morebitnega vpliva nanodelcev C_{60} na redukcijo veziklov hruškaste oblike, saj se delež te oblike verjetno zmanjša le glede na skupno število veziklov.



Slika 18: Količina hruškasto oblikovanih veziklov s širokim vratom / 1000 veziklov. Posamezni grafi prikazujejo delež hruškasto oblikovanih veziklov s širokim vratom v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Vsaka vrednost je povprečje treh ponovitev poskusa za vsak tretma. Številčnost posameznih skupin veziklov je prikazana na ločenih grafih, glede na dodano testno raztopino in mesto zajemanja mikrografij. Od zgoraj navzdol si sledijo kontrolna skupina (C), skupina z dodanimi nanodelci C_{60} (N) in skupina, kateri smo dodali referenčno kemikalijo $ZnCl_2$ (R). Od leve proti desni si sledijo različni pasovi zajemanja mikrografij, P1 (najvišja koncentracija delcev), P2 (srednja koncentracija delcev) in P3 (najnižja koncentracija delcev).

Spodnji grafi (Slika 19) prikazujejo količino hruškasto oblikovanih veziklov z ozkim vratom / 1000 veziklov v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Številčnost posameznih skupin veziklov je prikazana na ločenih grafih, glede na dodano testno raztopino (C, N in R) in mesto zajemanja mikrografij (P1, P2 in P3). Hruškasto oblikovani vezikli z ozkim vratom so prisotni v vseh treh pasovih in tudi razlike med tretmaji so minimalne.



Slika 19: Količina hruškasto oblikovanih veziklov z ozkim vratom / 1000 veziklov. Posamezni grafi prikazujejo delež hruškasto oblikovanih veziklov z ozkim vratom v odvisnosti od časa inkubacije (1, 10, 100 in 120 min). Vsaka vrednost je povprečje treh ponovitev poskusa za vsak tretma. Številčnost posameznih skupin veziklov je prikazana na ločenih grafih, glede na dodano testno raztopino in mesto zajemanja mikrografij. Od zgoraj navzdol si sledijo kontrolna skupina (C), skupina z dodanimi nanodelci C_{60} (N) in skupina, kateri smo dodali referenčno kemikalijo $ZnCl_2$ (R). Od leve proti desni si sledijo različni pasovi zajemanja mikrografij, P1 (najvišja koncentracija delcev), P2 (srednja koncentracija delcev) in P3 (najnižja koncentracija delcev).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V okviru diplomskega dela smo preučevali vpliv nanodelcev na umetne fosfolipidne membrane, natančneje na orjaške unilamelarne vezikle (ang. Giant Unilamellar Vesicle – GUV). Interakcije med lipidnimi vezikli in nanodelci smo opazovali s fazno-kontrastnim svetlobnim mikroskopom. Preučiti smo želeli morfološke transformacije lipidnih veziklov in morebitni spremembe v dinamiki omenjega procesa po dodatku delcev. Podobne študije smo zasledili tudi v literaturi (Babnik in sod., 2003; Döbereiner in sod., 1993; Iglič in sod., 1999; Iglič in sod., 2003; Imparato in sod., 2005; Kralj-Iglič in sod., 2000; Lipowsky in sod., 2005; Yu in Granick, 2009), vendar so se v večini primerov osredotočili le na opazovanje enega vezikla ali manjše skupine veziklov. Ker smo z našo študijo želeli pridobiti kvantitativne podatke, smo poskus razširili na celotno populacijo veziklov. S kamero, povezano z mikroskopom, smo sistematično zajemali mikrografije. Zaradi obsežnosti obdelave slik, smo v sodelovanju s strokovnjakom s področja računalništva in informatike proces obdelave podatkov poskusili računalniško avtomatizirati.

5.1.1 Optimizacija metode

Na začetku preučevanja morfoloških transformacij lipidnih veziklov še nismo vedeli, kako velike spremembe med netretiranimi in z nanodelci tretiranimi vezikli lahko pričakujemo. Odločili smo se, da bomo za začetek naredili le kratke reprezentativne videoposnetke preparatov lipidnih veziklov inkubiranih z različnimi nanodelci in jih primerjali z negativnim kontrolnim poskusom, pri katerem nismo dodajali nobenih delecev, in pozitivnim kontrolnim poskusom, pri katerem smo veziklom dodali referenčno kemikalijo. Kot referenčno kemikalijo smo uporabili ZnCl_2 , ki povzroči peroksidacijo lipidov (Brocardo in sod., 2004) in zato pokanje lipidnih veziklov.

Ker na videoposnetkih med tretmaji ni bilo opaziti očitnih morfoloških sprememb lipidnih veziklov, smo se v sodelovanju s strokovnjakom s področja računalništva in informatike odločili za bolj kvantitativen pristop. Namesto videoposnetkov smo posneli mikrografije. Ker smo testno raztopino aplicirali z ene strani, se je koncentracija raztopine in tudi v njej raztopljenih delcev zaradi počasne difuzije zmanjševala (nanodelci so bili v vodi, torej

pričakujemo normalno difuzijo). V testni komori smo določili tri pasove z različno koncentracijo delcev (P1 – pas tik ob robu komore, kjer smo testno raztopino aplicirali, P2 – pas na sredini komore in P3 – pas ob robu komore, ki je nasproti robu aplikacije testne raztopine). Vzdlž vsakega pasu, P1, P2 in P3, smo ob različnih časih inkubacije posneli 15 mikrografij. Tako smo poleg preučevanja vpliva nanodelcev na lipidne vezikle, lahko preučili tudi njihov vpliv na vezikle v odvisnosti od koncentracije testne raztopine.

Do največjih razlik med posameznimi tretmaji (C – kontrolni poskus, N – poskus z nanodelci in R – referenčni poskus) je prišlo na mestu, kjer je bila koncentracija testne raztopine največja (P1). Na mestu P2 je bila koncentracija testne raztopine še vedno dovolj velika, da je bila razlika med referenčnim in kontrolnim poskusom pri večini opazovanih parametrov še vedno očitna, medtem ko je bila koncentracija nanodelcev pri večini opazovanih parametrov premajhna, da bi prišlo do očitnih razlik, v primerjavi s kontrolnim ali referenčnim poskusom. Sklepamo lahko, da nanodelci nimajo tako močnega učinka na lipidne vezikle, kot ga ima referenčna kemikalija $ZnCl_2$. Na mestu P3 je bila koncentracija premajhna, da bi med posameznimi tretmaji opazili očitne razlike. Prav tako je na P3 mestu med inkubacijo prišlo do močnih nihanj znotraj posameznih tretmajev. Na Sliki 12 lahko vidimo, da je tudi do največjih razponov v številčnosti veziklov med tremi ponovitvami poskusa za vsak tretma prišlo ravno na mestu P3. Razlog za to je lahko gručasta razporeditev veziklov ob robu preparata, kar je verjetno posledica aplikacije testne raztopine. Ko smo testno raztopino aplicirali ob robu (ob pasu P1), so nastali tokovi, ki so vezikle potisnili proti nasprotnemu robu preparata (proti pasu P3). Ker smo takoj zatem preparat na teh dveh stranicah zapečatili s silikonsko mastjo, so se vezikli nakopičili ob robu v gručah. Tako smo pri zajemanju mikrografij na tako gručo lahko naleteli ali pa ne. Ker je na tem mestu ponovljivost poskusa majhna, bi v nadaljnjih, podobno zastavljenih poskusih, ta pas lahko izpustili. Mikrografije bi tako zajemali le na mestih P1 in P2.

Čas inkubacije med posameznimi serijami zajemanja mikrografij smo skozi optimizacijo metode spreminjali. V zadnji fazi smo sestavili sledeči protokol: prvo zajemanje mikrografij takoj po pripravi preparata lipidnih veziklov (čas 1); sledila je malo manj kot deset minutna inkubacija, nato dodatek testne raztopine, dokončno zapečatenje preparata in takoj za tem druga serija zajemanja mikrografij (čas 10); po 90 minutni inkubaciji smo

posneli tretjo serijo mikrofotografij (čas 100) ter 110 min po dodatku testne spojine še zadnjo serijo mikrofotografij (čas 120).

Na Sliki 12 vidimo, da je med posameznimi ponovitvami poskusa (tri ponovitve za vsak tretma) na mestu P1 in P2 pred dodatkom testnih raztopin (čas 1) zelo majhen razpon v številčnosti veziklov med tremi ponovitvami poskusa. Do večjega razpona med posameznimi ponovitvami pa pride na mestu P1 takoj po dodatku nanodelcev in referenčne kemikalije (čas 10). Mikrofotografije smo tako zajemali med delovanjem testne raztopine. Verjetno bi bili rezultati med posameznimi poskusi bolj skladni, če bi mikrofotografije zajemali s približno 10 minutnim zamikom. Do podobne situacije pride na mestu P2 90 minut po dodatku referenčne kemikalije (čas 100). V tem času zaradi delovanja ZnCl_2 vezikli najhitreje pokajo. 110 minut po dodatku kemikalij (čas 120) so med posameznimi ponovitvami poskusa razlike že manjše. V nadaljnjih, podobno zastavljenih poskusih, bi bilo čas 1 in čas 120 smiselno obdržati, čas 10 pa podaljšati z 10 minutno inkubacijo. Zajemanje mikrofotografij po 100 minutni inkubaciji (čas 100) bi iz nadaljnjih poskusov lahko izpustiti, s tem pa bi delno zmanjšali tudi zamudno računalniško obdelavo slik.

Med optimizacijo metode smo poskuse izvajali z različnimi nanodelci, vendar smo v zadnji fazi za preučevanje vpliva nanodelcev na orjaške unilamelarne vezikle uporabili le fulerene C_{60} , ZnO (nano in makrometrskih velikosti) ter TiO_2 (nano in makrometrskih velikosti). Zaradi obsežnosti obdelave podatkov smo računalniško in statistično obdelali le mikrofotografije posnete pri poskusu s fulereni C_{60} .

5.1.1.1 Ročna segmentacija slik

Z mikrofotografij, ki smo jih posneli, smo v programu za urejanje slik (Adobe Photoshop CS2) vse vezikle segmentirali ročno. Ta proces je zelo zamuden, saj je treba za visoko reprezentativnost eksperimenta analizirati veliko slik. Zelo pomembna je tudi natančnost, saj segmentacija predstavlja točko, kjer se kvalitativni podatki pretvarjajo v kvantitativne. Zato je v našem velikem interesu, da bi bil ta proces v prihodnje računalniško avtomatiziran. V tem primeru bi računalniški program sam zaznal in segmentiral objekte, pomembne za nadaljno analizo. S tem bi skrajšali čas obdelave podatkov in tako bi poskus

lahko razširili na več testnih spojin. Na tej stopnji naših raziskav avtomatska segmentacija slik še ni bila zadostna in ročne segmentacije ni mogla nadomestiti.

5.1.1.2 Avtomatizirana segmentacija slik

Segmentacijo lipidnih veziklov smo najprej poskusili avtomatizirati z metodo "thresholding", ki je najlažji in najbolj pogost način za ločitev objektov z ozadja. To je nelinearna operacija, ki pretvori črno-belo sivinsko sliko v binarno sliko, tako da vsakemu pikslu pripiše eno od dveh vrednosti, glede na to, ali je nad ali pod določeno mejno vrednostjo. Ta pristop se je v našem primeru izkazal za neprimerne, saj so lipidni vezikli lahko v različnih žariščih in njihovi robovi niso vedno razločno vidni. Zato smo se odločili za uporabo algoritma za detekcijo krogov, varianto Houghove transformacije (predlagano po: Illingworth in Kittler, 1986). Algoritem izkoristi gradient polja fotografije, kjer so meje objektov bolj determinirane v primerjavi z intenzivnostjo polja. To se obnese pri okroglih lipidnih veziklih, bolj elipsoidnih pa morda ne zazna. Naša trenutna adaptacija Houghove transformacije zazna približno 90% vseh veziklov. Ker so tudi bolj elipsoidni vezikli pomemben del naše raziskave, je detekcija le-teh pomemben cilj za delo v prihodnosti (Zupanc in sod., 2009).

5.1.2 Vpliv fulerenov C₆₀ na umetne fosfolipidne membrane

Vsakemu od 21.323 detektiranih POPC veziklov smo določili polmer in stopnjo izsrednosti, ga uvrstili v določen velikostni razred ter mu pripisali morfološko obliko. Vpliv nanodelcev na GUV smo opazovali v odvisnosti od dodane testne raztopine (N – raztopina nanodelcev C₆₀, R – raztopina z referenčno kemikalijo ZnCl₂ ali C – kontrolna raztopina brez dodatka delcev), koncentracije testne raztopine (mesto na preparatu – P1, P2 ali P3) ter časa inkubacije (1, 10, 100 ali 120 min). Za ovrednotenje interakcij nanodelcev z lipidnimi membranami smo vsaki populaciji veziklov določili številčnost, velikostno razporeditev, stopnjo izsrednosti ter delež veziklov z določeno morfološko transformacijo.

5.1.2.1 Spremembe v številčnosti in velikostni razporeditvi lipidnih veziklov

Zaradi neenakomerne velikostne razporeditve populacije veziklov smo vezikle razdelili v dve skupini in sicer v skupino z manjšimi vezikli, ki predstavljajo večinski del populacije

veziklov, in pa v skupino z večjimi vezikli, ki predstavljajo manjši del populacije veziklov. Mejo, ki razmejuje ti dve skupini, smo postavili pri radiju 8.5 μm . Prva skupina torej vsebuje vezikle z radiji med 0 in 8.5 μm , kar zajema 97.2% vseh veziklov, druga skupina pa vezikle z radiji med 8.5 in 30.5 μm , kar pa zajema le 2.8% populacije. Pri tako razdeljeni populaciji veziklov lahko vidimo ali imajo nanodelci vpliv na večje ali manjše vezikle.

Iz rezultatov je razvidno (Slika 11), da se številčnost veziklov v poskusu, kjer med inkubacijo nismo dodali nikakršnih delcev, povečuje. To razlagamo z učinkom gravitacije. V veziklih je čista raztopina saharoze, zunaj veziklov pa mešanica saharoze in glukoze. Saharoza v veziklih je težja, zato se vezikli po pripravi preparata začnejo posedati na dno opazovalne komore (Döbereiner in sod., 1999). Po 10 minutni inkubaciji je večina veziklov že v isti ravnini in s tem tudi v istem žarišču. Z nadaljno inkubacijo se številčnost skoraj ne povečuje več. Poleg tega je iz Slike 15 razvidno, da se številčnost veziklov poveča na račun povečanja številčnosti manjših veziklov, medtem ko število večjih veziklov med inkubacijo ostaja nespremenjeno. Do tega pride, ker so večji vezikli težji in se hitreje zberejo na dnu opazovalne komore.

Po dodatku nanodelcev C_{60} se številčnost veziklov zmanjša na mestu P1, kjer je koncentracija testne spojine največja (Slika 11). Zmanjševanje številčnosti veziklov opazimo tudi pri skupini, ki smo ji dodali referenčno kemikalijo ZnCl_2 . Ker vemo, da ZnCl_2 povzroči pokanje veziklov zaradi peroksidacije lipidnih molekul (Brocardo in sod., 2004), kar vpliva na zmanjšanje številčnosti veziklov, lahko sklepamo, da do podobnega pojava pride tudi zaradi nanodelcev C_{60} . Pokanje veziklov po dodatku referenčne kemikalije ZnCl_2 prizadene tako manjše kot večje vezikle, vendar večje v večji meri (Slika 15), saj se število večjih veziklov po 120 minutni inkubaciji popolnoma reducira, medtem ko število manjših upade za približno dve tretjini. Sklepamo, da se ostanki nekaterih počenih veziklov lahko organizirajo v manjše vezikle. V nasprotju z ZnCl_2 pa med padcem številčnosti večjih in manjših veziklov po dodatku fulerenov C_{60} ni razlik; v obeh primerih število veziklov pade za približno dve tretjini. Vendar pa je številčnost večjih veziklov relativno majhna in vrednosti med posameznimi časi inkubacije zelo nihajo.

Vzrok za pokanje veziklov je lahko dodatek destilirane vode, v kateri so bili raztopljeni fulereni C_{60} . Ker je elektroformacija veziklov potekala v raztopini saharoze, nadalje pa smo vezikle suspendirali v raztopini glukoze, bi po aplikaciji destilirane vode zaradi razlik v osmolarnosti raztopin zunaj in znotraj veziklov lahko prišlo do pokanja veziklov. Membrana prepušča molekule vode, molekul topljenca pa ne; za izenačitev osmotskega potenciala na obeh straneh membrane je zato potrebna difuzija vode, kar pa poveča pritisk na membrano (Kralj-Iglič in Iglič, 2008) in vezikel počí. Da bi izključili možnost, da so vezikli pokali zaradi različne osmolarnosti raztopin, smo naredili dodaten kontrolni poskus, s katerim smo pokazali vpliv same destilirane vode na populacijo lipidnih veziklov. Po dodatku destilirane vode se je po 10 minutah številčnost veziklov povečala za cca 7% (Slika 13), kar je primerljivo s kontrolnim poskusom, v katerem smo kot testno raztopino uporabili raztopino glukoze brez nanodelcev. Tudi v tem primeru lahko to povečanje pripišemo posedanju veziklov na dno opazovalne komore zaradi učinka gravitacije. Po 10 minutni inkubaciji je bila že večina veziklov v isti ravnini in s tem tudi v istem žarišču. Količina destilirane vode je bila očitno premajhna, da bi vplivala na zmanjšanje številčnosti veziklov tretiranih s fulereni C_{60} .

Da je zmanjšanje številčnosti veziklov vpliv nanodelcev potrjuje tudi dejstvo, da do zmanjšanja številčnosti veziklov na mestu P1 pride že po 10 minutni inkubaciji, kar je v bistvu takoj po dodatku kemikalije (C_{60} ali $ZnCl_2$), na mestu P2 pa padec številčnosti veziklov opazimo šele po zajemanju slik po 100 minutni inkubaciji ($ZnCl_2$), saj delci potrebujejo nekaj časa da difundirajo do sredine preparata (Slika 11).

Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da je med posameznimi tretmaji, C, N in R, prišlo do razlik v številčnosti lipidnih veziklov, zato lahko sklepamo, da nanodelci C_{60} imajo potencialno kvaren učinek na POPC lipidne vezikle oziroma umetne fosfolipidne membrane.

Mnoge študije o vplivu nanodelcev na membrane poročajo o kvarnih učinkih fulerenov in drugih nanodelcev, vendar pa si glede mehanizmov, s katerimi razlagajo ta vpliv, niso enotne. V literaturi prevladujejo študije, ki poškodbe membran, tako celičnih kot umetnih, razlagajo s povečano permeabilnostjo membran zaradi peroksidacije (Kamat in sod., 2000; Li in sod., 2000; Sayes in sod., 2005). Fulereni lahko inducirajo tvorbo reaktivnih

kisikovih zvrsti (ang. Reactive Oxygen Species – ROS), ki oksidirajo lipidne molekule (Wong-Ekkabut in sod., 2007). V vodi raztopljen fuleren C_{60} generira vire prostih radikalov (Li in sod., 2000; Guldi in Prato, 2000; Foley in sod., 2002), med katerimi je najpomembnejši superoksidni anion (Foley in sod., 2002). V študiji, kjer so preučevali vpliv nanodelcev na hemocite morske školjke *Mytilus galloprovincialis*, pa so poleg tega, da nanodelci inducirajo protivnetni odziv, ugotovili tudi, da med vplivi različnih nanodelcev (C_{60} , TiO_2) kljub njihovi različni kemijski sestavi ni bistvene razlike. Ti delci imajo zelo pomembno skupno lastnost; obe spojini sta redoks aktivni in zato povzročita oksidativni stres (Canesi in sod., 2010). Zanimiva je tudi študija Sayesa in sod. (2004), ki so poleg citotoksičnosti v vodi topnih fulerenov na človeške celične linije kožnih fibroblastov in jetrnih rakastih celic, ugotovili tudi, da je nederivatiziran, v vodi slabo topen fuleren C_{60} , bolj toksičen za obe celični liniji kot visoko derivatizirani, v vodi topni fulereni. Nederivatizirani fulereni v stiku z vodo tvorijo slabo topne koloidne skupke imenovane nano- C_{60} . Ta oblika nastane ko C_{60} pride v kontakt z nevtralno vodo. Pokazali so tudi, da v brezcelični vodni raztopini nano- C_{60} lahko tvori superoksidni anion, ki pa ga popolnoma hidroksilirani fulereni ne morejo. Predvidevajo, da slabo topni fulereni povzročijo oksidativne poškodbe celičnih membran celo pri relativno nizkih koncentracijah in da se toksičnost zmanjšuje z večjo derivatizacijo in s tem večjo topnostjo (Sayes in sod., 2004).

Med možnimi mehanizmi interakcije nanodelcev z membranami je tudi vezava nanodelcev C_{60} na membrano. Spurlin in Gewirth (2006) navajata, da se fulereni lahko vežejo na lipidno membrano, vendar ne prehajajo med lipidne ogljikovodikove verige. Vezava delcev na membrano pa lahko po mnenju nekaterih avtorjev (Chang in Violi, 2006; Ginzburg in Balijepalli, 2007) povzroči velike lokalne ukrivljenosti in nastanek por. Leroueil in sod. (2007) povdarjajo, da C_{60} lahko povzroči strukturne spremembe lipidnih membran, ki vodijo k povečani permeabilnosti le-teh, ni pa nujno, da se v membranah tvorijo dejanske luknje, saj se termin pora lahko nanaša tudi na bolj subtilne spremembe v kompoziciji dvosloja, ki pa vodijo le k povečani difuziji skozi membrano. Wang in sod. (2008) na primer navajajo, da na lokalnem nivoju zaradi vpliva nanodelcev lahko pride do sprememb v fluidnosti membrane. Tako membrana lahko postane bolj fluidna ali pa bolj rigidna. Ginzburg in Balijapalli (2007) pa trdijo, da je med nanodelci in lipidi močan

privlak, tako da lahko molekule C_{60} fosfolipide povlečejo iz membrane, zaradi česar se membrane lahko stanjšajo ali raztrgajo. Qiao in sod. (2007) navajajo, da ko je C_{60} blizu površine dvoplasti, to poveča prostor med lipidnimi glavami in tako inducira tvorbo mikropor, ter da lahko pride do adsorpcije C_{60} v lipidni dvosloj zaradi hidrofobnih interakcij med molekulami C_{60} in repi fosfolipidov. Jusufi in sod. (2011) so predstavili simulacijsko študijo od velikosti odvisne translokacije fulerenov v središče lipidne dvoplasti DOPC. Potrdili so, da se fulereni hitro in spontano absorbirajo v dvoplast in samo-agregirajo v nanoskupke. De Vane in sod. (2010) navajajo, da v DOPC lipidnem sistemu fulereni C_{60} agregirajo celo pri najnižji od preučevanih koncentracij. Tudi Wong-Ekkabut in sod. (2008) navajajo, da je permeacija fulerenskih agregatov v lipidni dvosloj termodinamsko ugodna in hitra ter da visoka koncentracija fulerenov inducira spremembe v strukturnih in elastičnih lastnostih lipidne dvoplasti, vendar pa po njihovem mnenju te spremembe niso dovolj velike za dezintegracijo in mehansko poškodbo membrane. Jusufi in sod. (2011) pa trdijo celo, da do sprememb v morfologiji dvosloja pride le po dodatku fulerenov C_{540} , medtem ko fulereni C_{60} ne spremenijo morfologije dvosloja.

Če bi v našem primeru prišlo do tvorbe por, bi se to videlo na posnetih mikrofografijah, saj smo imeli sistem raztopin različnih gostot. Saharozna raztopina znotraj veziklov je bila gostejša od saharozno-glukozne raztopine zunaj njih, zato so bili vezikli s faznokontrastnim svetlobnim mikroskopom videti kot temnejši krogi v svetlejšem mediju. Skozi potencialno nastale pore bi se raztopini v veziklih in v okoliškem mediju izenačili, kar bi bilo videti kot posvetlitev veziklov. Ker tega nismo opazili, lahko sklepamo, da je tvorba por malo verjetna.

Zanimivo je tudi, da v poskusu, kjer smo dodajali nanodelce C_{60} , na mestu P1 večina veziklov (približno dve tretjini) počí po prvih desetih minutah inkubacije (Slika 11). Z nadaljno inkubacijo se številčnost veziklov te testne skupine bistveno ne spreminja, kar je drugače kot v primeru dodatka referenčne kemikalije $ZnCl_2$, kjer se številčnost veziklov med inkubacijo postopno zmanjšuje. Možno je, da se nanodelci C_{60} vključijo v nekatere vezikle. S tem se koncentracija C_{60} v okoliškem mediju zniža, zato se številčnost veziklov nadalje ne znižuje. O prehodu nanodelcev skozi membrano poročajo Foley in sod. (2002), ki navajajo, da fulereni lahko vstopijo v evkariontsko celico in se nalagajo v mitohondrijih.

O prehodu skozi celično membrano poročajo tudi Verma in sod. (2008), ki pa niso opazili, da bi nanodelci po prehodu v celico prešli tudi v jedro celic ali da bi se iz celic izločili. Ugotavljajo, da je možno, da nanodelci v citosolu izgubijo sestavno ravnovesje in strukturni motiv, ki je potreben za prehod skozi membrano.

5.1.2.2 Spremembe oblike lipidnih veziklov

Sferični vezikli oziroma vezikli brez posebnih izrastkov in struktur se med seboj razlikujejo v stopnji izsrednosti oziroma ekscentričnosti. Izsrednost je mera, ki pove, za koliko se stožnica razlikuje od krožnice. Za elipso se vrednosti nahajajo med 0 in 1, pri čemer je 0 krožnica. Vrednosti se nanašajo na dvodimenzionalne oblike (elipse), na oblike, ki smo jih segmentirali z mikrofotografij, in ne na vezikle same, ki so tridimenzionalne sfere. Iz rezultatov je razvidno (Slika 16), da se izsrednost veziklov med inkubacijo povečuje, kar pomeni, da vezikli s časom postajajo vedno bolj elipsoidni. Pri tem se relativni volumen veziklov zmanjšuje, povprečna srednja ukrivljenost veziklov pa se povečuje. Po elektroformaciji so vezikli napeti in sferični in imajo tubularne izrastke, med seboj so povezani s tankimi tubularnimi izrastki, ki s svetlobnim mikroskopom niso vidni. Med inkubacijo se te izrastki počasi krajšajo. Pri tem se lipidne molekule izrastkov vključujejo v lipidni dvosloj materinskih veziklov. V večji meri se vključujejo v zunanji lipidni sloj, saj so izrastki tubularne oblike, kar pomeni, da imajo v zunanjem sloju več lipidnih molekul. Vezikli začnejo fluktuirati. S tem lahko razložimo manjše povečanje izsrednosti. O omrežju nanotub so poročali že številni avtorji, med njimi tudi Hotani in sod. (1999), Iglič in sod. (2003), Kralj-Iglič in sod. (2001) ter Mathivet in sod. (1996).

Osnovna oblika lipidnih veziklov je sferična oziroma kvazi sferična, v vsaki populaciji veziklov pa lahko opazimo tudi vezikle v različnih fazah dinamične morfološke transformacije, ki so značilne za lipidne vezikle POPC. Vezikli so na mikrofotografijah ujeti v določeni prehodni metastabilni obliki (Kralj-Iglič in sod., 2001). Mi smo morfološko transformirane vezikle razvrstili v dve kategoriji (Slika 10), in sicer v različne stopnje morfološke transformacije vezikla z brstom oziroma t.i. hruškasto oblikovani vezikli ter v tube in verižice (vezikli tubularne oblike, vezikli z obliko verižice – niz povezanih majhnih sferičnih veziklov približno enake velikosti in tanke tubularno oblikovane strukture z izrastki). Pri analizi morfoloških transformacij veziklov smo se osredotočili le na hruškasto

oblikovane vezikle, veziklov v obliki tub in verižic pa nismo podrobneje preučili. Hruškasto oblikovane vezikle smo nadalje razdelili na hruškasto oblikovane vezikle s širokim in hruškasto oblikovane vezikle z ozkim vratom. Ker so ti vezikli prisotni v relativno majhnem deležu, smo število obravnavanih veziklov izrazili kot delež določene oblike veziklov na 1000 v obravnavani skupini detektiranih veziklov.

V deležu hruškasto oblikovanih veziklov med tretmaji C, N in R ni opaziti velikih razlik (Slika 17). V to kategorijo pa smo vključili dve različni obliki veziklov, hruškasto oblikovane vezikle s širokim in hruškasto oblikovane vezikle z ozkim vratom. Ti dve obliki smo preučili še ločeno.

Hruškasto oblikovani vezikli z ozkim vratom so prisotni v vseh treh pasovih in tudi razlike med tretmaji so minimalne že na mestu P1, kjer je koncentracija nanodelcev največja (Slika 19).

Delež hruškasto oblikovanih veziklov s širokim vratom takoj po dodatku nanodelcev C_{60} na mestu največje koncentracije testne raztopine pade na vrednost 0 (Slika 18). Enak rezultat dobimo tudi v primeru referenčnega poskusa (dodatek $ZnCl_2$), medtem ko se delež hruškasto oblikovanih veziklov s širokim vratom v kontrolnem poskusu po aplikaciji glukozne raztopine poveča. Ker je število veziklov te oblike glede na skupno število veziklov zelo majhno, bi težko trdili, da nanodelci povzročijo popolno izginotje veziklov omenjene oblike. Poskus bi bilo dobro razširiti na večjo populacijo veziklov, ker pa bi bila obdelava teh podatkov zelo obsežna, bi bilo dobro poskus ponoviti, ko bo izpopolnjena avtomatska računalniška segmentacija.

Rezultati kažejo, da so nanodelci C_{60} spremenili dinamiko transformacije oblike veziklov POPC. Transformacijo oblik lipidnih veziklov zaradi vpliva nanodelcev so opazili že nekateri drugi avtorji. Yu in Granick (2009) sta poročala o tvorbi izboklin in rasti tub iz parentalnega vezikla po dodatku kationskih nanodelcev ter o nadaljnjem razpadu tub na nanizanim biserom podobne strukture. Po njuno naj bi adsorbcija nanodelcev na dvosloj povečala površino glav amfifilnih lipidov. Zaradi tega se razlika med površino notranje in površino zunanje plasti dvosloja poveča, kar pa vpliva na obliko veziklov. Lipowsky in Döbereiner (1998) prav tako navajata, da se delec lahko vrine med glave lipidov in tako

poveča površino membrane, vendar le če je delec manjši ali enako velik kot glave lipidnih molekul. To povečanje površine pa narašča s številom vrinjenih molekul. Jeng in sod. (2003), ki so uporabili lipofilne C_{60} derivate, pa navajajo, da se lipofilni C_{60} lahko vključijo v lipidne membrane ter spremenijo upogibne in tlačne lastnosti lipidnih membran. Tudi Wong-Ekkabut in sod. (2008) navajajo, da fulereni povzročijo spremembe v strukturnih in elastičnih lastnostih lipidne dvoplasti.

Padec številčnosti veziklov inkubiranih z vodno suspenzijo C_{60} nanodelcev lahko razložimo z vplivom nanodelcev na povprečno srednjo ukrivljenost dvosloja membrane. Med transformacijo lipidnih veziklov se sferični vezikli transformirajo v hruškasto oblikovane vezikle s širokim vratom, ti pa nadalje v hruškasto oblikovane vezikle z ozkim vratom. V tem procesu se povečuje povprečna srednja ukrivljenost veziklov, kar vodi vezikle proti limitni obliki. Pri transformaciji hruškasto oblikovanih veziklov s širokim vratom v hruškasto oblikovane vezikle z ozkim vratom se relativni volumen veziklov zmanjša, membrana postane bolj napeta in ker ne prenese več nadaljnega povečevanja povprečne srednje ukrivljenosti v končni fazi lahko poči (Kralj-Iglič, 2000). Da poteka proces, ki vezikle vodi do limitnih oblik, dodatno podpira dejstvo, da je delež hruškasto oblikovanih veziklov s širokim vratom manjši v vzorcu, kjer smo veziklom dodali C_{60} kot v kontroli, ter da je v sistemu s C_{60} relativno manj hrušk z debelim vratom in relativno več tistih s tankim vratom.

5.2 SKLEPI

- Naša metoda omogoča zajetje dinamike transformacije oblike veziklov med interakcijo z nanodelci. Zasnovana je kvantitativno in je zato primerna za preučevanje večjih populacij lipidnih veziklov. Zaradi obsežnosti obdelave podatkov pa v prihodnje želimo ročno segmentacijo slik nadomestiti z avtomatsko segmentacijo, ki na tej stopnji raziskav še ni zadostna in ročne segmentacije ne more nadomestiti.
- Po dodatku suspenzije C_{60} lipidnim veziklom POPC je v prvih 10 minutah počilo približno dve tretjini veziklov.

- Po dodatku suspenzije C_{60} lipidnim veziklom POPC se je spremenilo relativno razmerje med posameznimi metastabilnimi oblikami veziklov.
- Nanodelci C_{60} vplivajo na obliko lipidnih veziklov. Povečajo povprečno srednjo ukrivljenost veziklov, kar vodi vezikle proti limitni obliki. V tem procesu se relativni volumen veziklov zmanjšuje in ker membrana ne prenese več nadaljnjega povečevanja povprečne srednje ukrivljenosti, lahko v končni fazi vezikel poči.

6 POVZETEK

V okviru diplomskega dela smo proučevali vpliv nanodelcev na umetne fosfolipidne membrane POPC, natančneje na orjaške unilamelarne vezikle (GUV). Ker je za lipidne vezikle značilna morfološka transformacija smo želeli preučiti morebitne spremembe v dinamiki omenjega procesa po dodatku nanodelcev različnih kemijskih struktur. Želeli smo razviti metodo, s katero bi lahko opazovali morfološke transformacije večje populacije lipidnih veziklov. Za opazovanje interakcij nanodelcev z lipidnimi membranami smo uporabili fazno-kontrastni svetlobni mikroskop, obdelava posnetih mikrografij pa je potekala v sodelovanju s strokovnjakom s področja računalništva in informatike. Ker je obdelava slik zelo zamudna, smo v okviru te študije proces želeli računalniško avtomatizirati.

Žal proces avtomatizacije na tej stopnji raziskave ni bil zadosten in je segmentacija vseh slik potekala ročno. To nas je prisililo, da smo se omejili le na preučevanje interakcij med lipidnimi membranami in fulereni C_{60} . Ena od delavnih hipotez zato ostaja za delo v prihodnje.

Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da se številčnost lipidnih veziklov zmanjša v medijih z dodanimi fulereni C_{60} . Številčnost se je zmanjšala na približno eno tretjino začetne vrednosti že v prvih desetih minutah inkubacije lipidnih veziklov v suspenziji C_{60} . Sklepamo lahko, da nanodelci C_{60} reagirajo z lipidnimi membranami in imajo potencialno kvaren učinek na lipidne vezikle POPC oziroma umetne fosfolipidne membrane. Rezultati se skladajo z mnogimi drugimi študijami, ki prav tako preučujejo vplive fulerenov ali drugih nanodelcev na umetne membrane.

Poleg tega rezultati naše študije potrjujejo hipotezo, da nanodelci C_{60} vplivajo na dinamiko transformacije oblike veziklov, saj je po inkubaciji lipidnih veziklov v suspenziji C_{60} prišlo do sprememb v relativnem razmerju med posameznimi metastabilnimi oblikami veziklov. Sklepamo, da nanodelci C_{60} vplivajo na proces morfološke transformacije, ki lipidne vezikle vodi do limitnih oblik. V tem procesu se relativni volumen veziklov zmanjšuje in ker membrana ne prenese več nadaljnjega povečevanja povprečne srednje ukrivljenosti,

lahko v končni fazi vezikel počí. Transformacijo oblik lipidnih veziklov po dodatku nanodelcev so opazili tudi nekateri drugi avtorji.

Dobljeni rezultati so doprinos k razumevanju dinamike transformacije oblike lipidnih veziklov in njihove interakcije z nanodelci, saj so študije o transformaciji oblik lipidnih veziklov, ki smo jih zasledili v literaturi, večinoma osnovane na opazovanje enega vezikla ali manjše skupine veziklov, naša metoda pa je primerna za preučevanje večje populacije lipidnih veziklov. Tako lahko dinamiko transformacije oblik veziklov ovrednotimo kvantitativno in rezultati so bolj reprezentativni kot v študijah posameznih veziklov.

7 VIRI

- Adlakha-Hutcheon G., Khaydarov R., Korenstein R., Varma R., Vaseashta A., Stamm H., Abdel-Mottaleb M. 2009. Nanomaterials, nanotechnology: applications, consumer products and benefits. *Nanomaterials: Risks and Benefits*: 195-207
- Albrecht M. A., Evan C. W., Raston C. L. 2006. Green chemistry and the health implications of nanoparticles. *Green Chemistry*, 8: 417-32
- Angelova M.I., Dimitrov D.S. 1988. A mechanism of liposome electroformation. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 76: 59-67
- Angelova M. I., Soleau S., Meleard P., Faucon J. F., Bothorel P. 1992. Preparation of giant vesicles by external AC fields. *Progress in Colloid and Polymer Science*, 89: 127-131
- Babnik B., Miklavčič D., Kandušer M., Hägerstrand H., Kralj-Iglič V., Iglič A. 2003. Shape transformation and burst of giant POPC unilamellar liposomes modulated by non-ionic detergent C₁₂E₈. *Chemistry and Physics of Lipids*, 125: 123-138
- Bagatolli L. A., Parasassi T., Gratton E. 200. Giant phospholipid vesicles: comparison among the whole lipid sample characteristics using different preparation methods – A two photon fluorescence microscopy study. *Chemistry and Physics of Lipids*, 105: 135-147
- Bhatt I., Tripathi B. N. 2011. Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere*, 82: 308–317
- Borm P., Klaessig F. C., Landry T. D., Moudgil B., Pauluhn J., Thomas K., Trottier R., Wood S. 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, Part V: Role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicological Sciences*, 90, 1: 23-32
- Brocardo P. S., Pandolfo P., Takahashi R. N., Rodrigues A. L. S., Dafre A. L. 2005. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in the cerebral cortex and hippocampus following acute exposure to malathion and/or zinc chloride. *Toxicology*, 207: 283-291
- Bronštejn I. N., Semendjajev K. A., Musiol G., Mühlig H. 1997. *Elipsa. V: Matematični priročnik*. 2. izdaja. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 165-167

- Bystrzejewska-Piotrowska G., Golimowski J., Urban P. L. 2009. Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Management*, 29: 2587-2595
- Cabiscol E., Tamarit J., Ros J. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 3: 3-8
- Canesi L., Ciacci C., Vallotto D., Gallo G., Marcomini A., Pojana G. 2010. *In vitro* effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus hemocytes*. *Aquatic Toxicology*, 96: 151-158
- Chang, R., Violi, A. J. 2006. Insights into the effect of combustion-generated carbon nanoparticles on biological membranes: A computer simulation study. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 10: 5073-5083
- Dawson T. L. 2008. Nanomaterials for textile processing and photonic applications. *Coloration Technology*, 124, 5: 261-272
- Derfus A. M., Chan W. C. W., Bhatia S. N. 2004. Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots. *Nano Letters*, 4, 1: 11-18
- De Vane R., Jusufi A., Shinoda W., Chiu C., Nielsen S. O., Moore P. B., Klein M. L. 2010. Parametrization and application of a coarse grained force field for benzene/fullerene interactions with lipids. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 49: 16364-16372
- Dick C. A. J., Brown D. M., Donaldson K., Stone V. 2003. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhalation Toxicology*, 15, 1: 39-52
- Donaldson K., Stone V., Tran C. L., Kreyling W., Borm P. J. A. 2004. Nanotoxicology. *Occupational and Environmental Medicine*, 61, 9: 727-728
- Döbereiner H.-G. 2000. Properties of giant vesicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5: 256-263
- Döbereiner H.-G., Käs J., Noppl D., Sprenger I., Sackmann E. 1993. Budding and fission of vesicles. *Biophysical Journal*, 65: 1396-1403
- Döbereiner H.-G., Selchow O., Lipowsky R. 1999. Spontaneous curvature of fluid vesicles induced by trans-bilayer sugar asymmetry. *European Biophysics Journal*, 28: 174-178

- Drobne D., Kralj-Iglič V. 2009. Lipid membranes as tools in nanotoxicity studies. V: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 10: 121-134
- Dunford R., Salinaro A., Cai L., Serpone N., Horokoshi S., Hidaka H., Knowland L. 1997. Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Letters*, 418, 1-2: 87-90
- Elder A., Lynch I., Grieger K., Chan-Remillard S., Gatti A., Gnewuch H., Kenaway E., Korenstein R., Kuhlbusch T., Linker F., Matias S., Monteiro-Riviere N., Pinto V. R. S., Rudnitsky R., Savolainen K., Shvedova A. 2009. Human health risks of engineered nanomaterials: critical knowledge gaps in nanomaterials risk assessment. *Nanomaterials: Risks and Benefits*: 3-29
- Elechiguerra J. L., Burt J. L., Morones J. R., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H. H., Yacaman M. J. 2005. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1, *J. Nanobiotechnology*, 3, 6: 1-10
- Foley S., Crowley C., Smaih M., Bonfils C., Erlanger B. F., Seta P., Larroque C. 2002. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294: 116-119
- Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S. R., Moussa F. 2005. Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Letters*, 5, 12: 2578-2585
- Ginzburg V. V., Balijepalli S. 2007. Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes. *Nano Letters*, 7, 12: 3716-3722
- Gruhn T., Franke T., et al. 2007. Novel method for measuring the adhesion energy of vesicles. *Langmuir*, 23, 10: 5423-5429
- Guldi D. M., Prato M. 2000. Excited-state properties of C60 fullerene derivatives. *Accounts of Chemical Research*, 33, 10: 695-703
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3. izdaja. New York, Oxford University Press
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4. izdaja. New York, Oxford University Press

- Handy R. D., Owen R., Valsami-Jones E. 2008. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, 17: 315-325
- Heymann D. 1996. Solubility of fullerenes C₆₀ and C₇₀ in seven normal alcohols and their deduced solubility in water. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*, 4, 3: 509-515
- Hirakawa K., Mori M., Yoshida M., Oikawa S., Kawanishi S. 2004. Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide. *Free Radical Research*, 38, 5: 439-447
- Hope M. J., Bally M. B., Mayer L. D., Janoff A. S., Cullis P. R. 1986. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 40: 89-107
- Hotani H., Nomura F., Suzuki Y. 1999. Giant liposomes: From membrane dynamics to cell morphogenesis. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 4: 358-368
- Iglič A., Hägerstrand H., Bobrowska-Hägerstrand M., Arrigler V., Kralj-Iglič V. 2003. Possible role of phospholipid nanotubes in directed transport of membrane vesicles. *Physics Letters A*, 310: 493-497
- Iglič A., Kralj-Iglic V., Majhenc J. 1999. Cylindrical shapes of closed lipid bilayer structures correspond to an extreme area difference between the two monolayers of the bilayer. *Journal of Biomechanics*, 32: 1343-1347
- Illingworth J., Kittler J. The adaptive Hough Transform. 1986. *IEEE Transactions Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 9, 5: 690-698
- Imparato A., Shillcock J. C., Lipowsky R. 2005. Shape fluctuations and elastic properties of two-component bilayer membranes. *Europhysics Letters*, 69, 4: 650-656
- Jensen A., Wilson S., Schuster D. 1996. Biological applications of fullerenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 4, 6: 767-779
- Jusufi A., De Vane R. H., Shinoda W., Klein M. L. 2011. Nanoscale carbon particles and the stability of lipid bilayers. *Soft Matter*, 7: 1139-1146

- Kamat J. P., Devasagayam T. P. A., Priyadarsini K. I., Mohan H. 2000. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivates and its possible biological implications. *Toxicology*, 155: 55-61
- Kamat J. P., Devasagayam T. P. A., Priyadarsini K. I., Mohan H., Mittal J. P. 1998. Oxidative damage induced by the fullerene C₆₀ on photosensitization in rat liver microsomes. *Chemico-Biological Interactions*, 114: 145-159
- Kavkler I., Potočnik P., Vadnal A. 2008. Matematika. 4. izdaja. Ljubljana, Cankarjeva založba: 36
- Klingshirn C. 2007. ZnO: Material, physics and applications. *Chemphyschem*, 8, 6: 782-803
- Kreuter J. 2007. Nanoparticles – a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331: 1-10
- Kroto H. W., Heath J. R., O'Brien S. C., Curl R. F., Smalley R. E., 1985. C₆₀: buckminsterfullerene. *Nature*, 318: 162-163
- Kralj-Iglič V., Gomišek G., Majhenc J., Arrigler V., Svetina S. 2001. Myelin-like protrusions of giant phospholipid vesicles prepared by electroformation. *Physicochemical and Engineering Aspects*, 181: 315-318
- Kralj-Iglič V., Iglič A. 2008. Osmoza. V: Izbrana poglavja iz biofizike – I. Teoretične osnove. 1. izdaja. Ljubljana, Založba FE in FRI: 69
- Kralj-Iglič V., Iglič A., Hägerstrand H., Peterlin P. 2000. Stable tubular microexovesicles of the erythrocyte membrane induced by dimeric amphiphiles, *Physical Review E*, 61, 4: 4230-4234
- Lee J., Kim D.-K., Kang W. 2006. Preparation of Cu Nanoparticles from Cu Powder Dispersed in 2-Propanol by Laser Ablation. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 27, 11: 1869-1872
- Leirer C. T., Wunderlich B., Wixforth A., Schneider M. F. 2009. Thermodynamic relaxation drives expulsion in giant unilamellar vesicles. *Physical Biology*, 6, 1: 016011

- Leroueil P. R., Hong S. Y., Mecke A., Baker J. R., Orr B. G., Banaszak H. M. 2007. Nanoparticle interaction with biological membranes: Does nanotechnology present a janus face? *Accounts of Chemical Research*, 40, 5: 335-342
- Li Q.-T., Yeo M. H., Tan B. K. 2000. Lipid Peroxidation in Small and Large Phospholipid Unilamellar Vesicles Induced by Water-Soluble Free Radical Sources. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 1: 72-76
- Linke G. T., Lipowsky R., Gruhn T. 2005. Free fluid vesicles are not exactly spherical. *Physical Review E*, 71, 5: 051602
- Lipowsky R. 1991. The Conformation of Membranes. *Nature*, 349, 6309: 475-481
- Lipowsky R. 1995. The Morphology of Lipid-Membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 5, 4: 531-540
- Lipowsky R., Brinkmann M., Dimova R., Haluska C., Kierfeld J., Shillcock J. 2005. Wetting, budding, and fusion-morphological transitions of soft surfaces. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 17, 31: 2885-S2902
- Lipowsky R., Döbereiner H.-G. 1998. Vesicles in contact with nanoparticles and colloids. *Europhysics Letters*, 43, 2: 219-225
- London L. 2002. Insights into lipid raft structure and formation from experiments in model membranes. *Current Opinion in Structural Biology*, 12:480-486
- Markovic Z., Trajkovic V. 2008. Biomedical potencial of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C₆₀). *Biomaterials*, 29: 3561-3573
- Markvoort A. J., Santen R. A., Hilbers P. A. J. 2006. Vesicle shapes from molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 45: 22780-22785
- Masciaglioli T., Zhang W.X. 2003. Environmental technologies at the nanoscale. *Environmental Science & Technology*, 37, 5: 102-108
- Mathivet L., Cribier S., Devaux P. F. 1996. Shape change and physical properties of giant phospholipid vesicles prepared in the presence of an AC electric field. *Biophysical Journal*, 70, 3: 1112-1121

- Maynard A. D., Aitken R. J. 2007. Assessing exposure to airborne nanomaterials: current abilities and future requirements. *Nanotoxicology*, 1: 26-41
- Maynard A. D., Aitken R. J., Butz T., Colvin V., Donaldson K., Oberdörster G., Philbert M. A., Ryan J., Seaton A., Stone V., Tinkle S. S., Tran L., Walker N. J., Warheit D. B. 2006. Safe handling of nanotechnology. *Nature*, 444: 267-269
- Maynard A. D., Baron P. A., Foley M., Shvedova A. A., Kisin E. R., Castranova V. 2004. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 67: 87-107
- Menger F. M., Keiper J. S. 1998. Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2: 726-732
- Murphy S. A. M., Berube K. A., Richards R. J. 1999. Bioreactivity of carbon black and diesel exhaust particles to primary Clara and type II epithelial cell cultures. *Occupational and Environmental Medicine*, 56, 12: 813-819
- Nair S., Sasidharan A., Rani V. V. D., Menon D., Nair S., Manzoor K., Raina S. 2009. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 20: 235-241
- Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311: 622-627
- Nohynek G. J., Lademann J., Ribaud C., Roberts M. S. 2007. Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Critical Reviews in Toxicology*, 37, 3: 251-277
- Nowack B., Bucheli T. D. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environmental Pollution*, 150: 5-22
- Pavlič J. I., Genova J., Zheliaskova A., Iglič A., Mitov M. D. 2010. Electroformation of neutral and negatively charged phospholipid giant vesicles under physiological conditions. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences*, 63, 4: 497-502
- Pecreaux J., Döbereiner H. G., Prost J., Joanny J.-F., Bassereau P. 2004. Refined contour analysis of giant unilamellar vesicles. *European Physical Journal E*, 13, 3: 277-290

- Peterlin P., Jaklic G., and Pisanski T. 2009. Determining membrane permeability of giant phospholipid vesicles from a series of videomicroscopy images. *Measurement Science & Technology*, 20, 5: 055801
- Peetla C., Rao K., Labhasetwar V. 2009. Relevance of biophysical interactions of nanoparticles with a model membrane in predicting cellular uptake: study with TAT peptide-conjugated nanoparticles', *Molecular Pharmaceutics*, 6, 4: 1264-1276
- Qiao R., Roberts A. P., Mount A. S., Klaine S. J., Ke P. C. 2007. Translocation of C₆₀ and its derivatives across a lipid bilayer. *Nano Letters*, 7, 3: 614-619
- Rai M., Yadav A., Gade A. 2009. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27: 76–83
- Rejeski D., Lekas D. 2008. Nanotechnology field observations: scouting the new industrial west. *Journal of Cleaner Production*, 16, 8/9: 1014-1017
- Ruoff R. S., Tse D. S., Malhotra R., Lorents D. C. 1993. Solubility of C₆₀ in a variety of solvents. *The Journal of Physical Chemistry*, 97: 3379-3383
- Savolainen K., Alenius H., Norppa H., Pylkkänen L., Tuomi T., Kasper G. 2010. Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies – A review. *Toxicology*, 269: 92-104
- Sayes C. M., Gobin A. M., Ausman K. D., Mendez J., West J. L., Colvin V. L. 2005. Nano-C-60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials*, 26, 36: 7587-7595
- Sene J. A., Pinheiro M. V. B., Krambrock K., Barbeira P. J. S. 2009. Quantification of fullerene nanoparticles suspensions in water based on optical scattering. *Talanta*, 78: 1503-1507
- Shinohara N., Matsumoto K., Endoh S., Maru J., Nakanishi J. 2009. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity tests on fullerene C₆₀ nanoparticles. *Toxicology Letters*, 191: 289-296
- Skebo J. E., Grabinski C. M., Schrand A. ., Schlager J. J., Hussain S. M. 2007. Assessment of metal nanoparticle agglomeration, uptake, and interaction using high-illuminating system. *International Journal of Toxicology* 26, 2: 135-141
- Sondi I., Salopek-Sondi B. 2004. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E-coli as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275, 1: 177-182

- Spurlin T. A., Gewirth A. A. 2006. Poly-L-lysine-induced morphology changes in mixed anionic/zwitterionic and neat zwitterionic-supported phospholipid bilayers. *Biophysical Journal*, 91, 8: 2919-2927
- Šegota S., Težak Đ. 2006. Spontaneous formation of vesicles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 121: 51-75
- Verma A., Uzun O., Hu Yu., Hu Yi., Han H.-S., Watson N., Chen S., Irvine D. J., Stellacci F. 2008. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nature materials*, 7: 588-595
- Wang B., Zhang L., Bae S. C., Granick S. 2008. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 47: 18171-18175
- Wang C., Guo Z.-X., Fu S., Wu W., Zhu D. 2004. Polymers containing fullerene or carbon nanotube structures. *Progress in Polymer Science*, 29: 1079-1141
- Wong-Ekkabut J., Baoukina S., Triampo W., Tang I.-M., Tieleman P. D., Monticelli L. 2008. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. *Nature Nanotechnology*, 3: 363-368
- Wong-Ekkabut J., Xu Z., Triampo W., Tang I.-M., Tieleman D. P., Monticelli L. 2007. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: A molecular dynamics study. *Biophysical Journal*, 93: 4225-4236
- Yamamoto O. 2001. Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. *International Journal of Inorganic Materials*, 3, 7: 643-646
- Yu Y., Granick S. 2009. Pearling of lipid vesicles induced by nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 131: 14158-14159
- Zupanc J., Valant J., Dobnikar A., Kralj-Iglič V., Iglič A., Drobne D. 2009. Interactions of nanoparticles with lipid vesicles: A population based computer aided image analysis approach. 31st annual international conference of the IEEE EMBS. Minneapolis, Minnesota, USA. September 2-6: 1400-1403
- Zupanc J., Valant J., Kralj-Iglič V., Iglič A., Drobne D. 2010. A new approach to analyze effect of nanoparticles on lipid vesicles. *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology*, 1, 1: 34-51

Zhang L. L., Jiang Y. H., Ding Y. L., Povey M., York D. 2007. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). Journal of Nanoparticle Research, 9, 3: 479-489

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorci prof. dr. Damjani Drobne za navodila za izdelavo diplomske naloge ter za strokovno pomoč pri obdelavi in vrednotenju rezultatov.

Dr. Janezu Valantu se zahvaljujem za delovno mentorstvo. Hvala za uvajanje v mikroskopijo in reševanje težav pri razvoju metode. Barbari hvala za pomoč pri vrednotenju rezultatov in prijateljsko vzdušje. Za prijaznost hvala tudi Sari in ostalim članom "nanoskupine".

Hvala Jerneju Zupancu za razvoj računalniškega dela metode ter za obdelavo videoposnetkov.

Prof. dr. Alešu Igliču se zahvaljujem za somentorstvo in prijazen sprejem v kolektiv Laboratorija za biofiziko na Fakulteti za elektrotehniko. Mojci se zahvaljujem za uvajanje v pripravo veziklov. Hvala Janezu in Maruši za reševanju težav z mikroskopiranjem. Hvala Vidu za pomoč pri pripravi veziklov. Hvala tudi prof. dr. Veroniki Kralj-Iglič za razlago dinamike spreminjanja oblik veziklov. Vsem sodelavcem Laboratorija za biofiziko se zahvaljujem za organiziranost in prilagodljivost pri uporabi laboratorija.

Hvala tudi recenzentu prof. dr. Gregorju Anderluhu in predsednici komisije prof. dr. Jasni Štrus za kritično presojo diplomske naloge.

Družini in prijateljem se zahvaljujem za podporo v času pisanja diplomske naloge. Še posebej hvala Moniki za koristne nasvete pri pisanju.