

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Barbara DRAŠLER

**VPLIV NANODELCEV C_{60} IN $CoFe_2O_4$ NA UMETNE
FOSFOLIPIDNE MEMBRANE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Barbara DRAŠLER

**VPLIV NANODELCEV C₆₀ IN CoFe₂O₄ NA UMETNE
FOSFOLIPIDNE MEMBRANE**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE EFFECT OF NANOPARTICLES C₆₀ AND CoFe₂O₄ ON
ARTIFICIAL PHOSPHOLIPID MEMBRANES**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, v okviru 'Institute of Biophysics and Nanosystems Research (Austrian Academy of Science) na Sincrotrone Trieste', v Laboratoriju za biofiziko Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani in na Centru za površinsko plazmonsko resonanco Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je dne 5. 6. 2009 sprejela temo in za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Damjano Drobne.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Tom TURK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. ddr. Aleš IGLIČ

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko

Član: prof. dr. Damjana DROBNE, mentorica

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: dr. Michael RAPPOLT, somentor

Austrian Academy of Science, Institute of Biophysics and Nanosystems
Research, c/o ELETTRA (Sincrotrone Trieste)

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.

Barbara DRAŠLER

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579:66.095(043.2)=163.6
KG	Kobaltovo-feritni nanodelci/fulereni/fosfolipidni vezikli/SAXS/svetlobna mikroskopija/citotoksične metode
AV	DRAŠLER, Barbara
SA	DROBNE, Damjana (mentor)/RAPPOLT, Michael (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
LI	2010
IN	VPLIV NANODELCEV C ₆₀ IN CoFe ₂ O ₄ NA UMETNE FOSFOLIPIDNE MEMBRANE
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	X, 59 str., 2 pregl., 16 sl., 4 pril., 94 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	<p>Proučevali smo vpliv fulerenov (C₆₀) ter nevtralnih (CoFe₂O₄) in negativno nabitih (CoFe₂O₄-CA) kobaltovo-feritnih nanodelcev (NP-ev) na umetne POPC-fosfolipidne membrane. Vpliv NP-ev smo testirali tudi s poskusoma <i>in vivo</i> ter semi <i>in vitro</i>. Z metodo sipanja X-žarkov pod majhnim kotom (SAXS) smo ugotavljali vpliv CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA na strukturne spremembe membrane multilamelarnih veziklov (MLV-ov). S svetlobno mikroskopijo smo opazovali morfološke spremembe orjaških unilamelarnih veziklov (GUV-ov). Interakcije med NP-i in membranami smo poskušali ovrednotiti tudi z metodo površinske plazmonske resonance (SPR). Metoda SAXS ni pokazala opaznih interakcij CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA z MLV-i. Ugotovili smo, da testirani NP vplivajo na spremembe velikosti GUV-ov in na povečan pojav nesferičnih oblik veziklov. Rezultati poskusa <i>in vivo</i> so pokazali visok potencial C₆₀ za destabilizacijo membrane, semi <i>in vitro</i> pa smo dokazali vpliv CoFe₂O na biološke membrane pri koncentracijah suspenzij NP-ev 100 in 1000 µg/mL, CoFe₂O₄-CA pa šele pri 1000 µg/mL. SPR ni primerna metoda za proučevanje interakcij med NP-i in lipidnimi vezikli. Kombinacija uporabljenih metod podaja širok pogled na interakcije različnih NP-ev z membranami.</p>

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 579:66.095(043.2)=163.6
CX	Cobalt ferrite nanoparticles/fullerenes/phospholipid vesicles/SAXS/light microscopy/cytotoxic methods
AU	DRAŠLER, Barbara
AA	DROBNE, Damjana (supervisor)/RAPPOLT, Michael (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
PY	2010
TI	THE EFFECT OF NANOPARTICLES C ₆₀ AND CoFe ₂ O ₄ ON ARTIFICIAL PHOSPHOLIPID MEMBRANES
DT	Graduation Thesis, University studies
NO	X, 59 p., 2 tab., 16 fig., 4 ann., 94 ref.
LA	sl sl/en
AL	In the present study, we discuss effects of fullerenes (C ₆₀), neutral (CoFe ₂ O ₄) and negatively charged (CoFe ₂ O ₄ -CA) cobalt ferrite nanoparticles (NPs) on artificial POPC phospholipid membranes. We also tested the effect of NP using <i>in vivo</i> and semi <i>in vitro</i> studies. Small Angle X-ray Scattering (SAXS) technique was applied to asses the effect of CoFe ₂ O ₄ and CoFe ₂ O ₄ -CA on structural properties of the membrane of multilamellar vesicles (MLVs). Light microscopy was used to observe shape transformation of giant unilamellar vesicles (GUVs). We also tried to asses interactions of NPs with artificial phospholipid membranes using Surface Plasmon Resonance (SPR). SAXS method showed no measurable effects of CoFe ₂ O ₄ and CoFe ₂ O ₄ -CA on MLVs. We observed that tested NPs cause changes in GUV size distribution and higher appearance of nonspherical vesicles. Results of <i>in vivo</i> study showed high potential of C ₆₀ on cell membrane destabilisation, whereas semi <i>in vitro</i> test indicated effect of CoFe ₂ O ₄ on biological membrane at suspension concentration of 100 and 1000 µg/mL, and CoFe ₂ O ₄ -CA at concentration of 1000 µg/mL. SPR is not a convenient method for testing interaction of NPs with lipid vesicles. The combination of X-ray scattering technique, microscopic and cytotoxic methods provides a broad prospect of interaction of different NPs with biological membranes.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
1.1 HIPOTEZA.....	2
1.2 NAMEN IN IZHODIŠČA.....	2
1.3 PRIČAKOVANI REZULTATI.....	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 NANOTEHNOLOGIJA	4
2.2 NANODELCI – LASTNOSTI IN UPORABA.....	5
2.3 INTERAKCIJE MED NANODELCI IN BIOLOŠKIMI SISTEMI	6
2.4 METODE ZA PROUČEVANJE INTERAKCIJ MED NANODELCI IN BIOLOŠKIMI MEMBRANAMI	8
2.4.1 Metode, uporabljene v naši študiji.....	8
2.4.1.1 Mikroskopske metode.....	9
2.4.1.1.1 Faznokontrastna svetlobna mikroskopija in GUV-i	9
2.4.1.1.2 Fluorescenčna mikroskopija in citotoksikološka metoda diferencialnega barvanja AO/EB	10
2.4.1.1.2.1 Ocenjevanje permeabiliziranosti celičnih barvil v poskusih semi <i>in vitro</i> ter <i>in vivo</i>	10
2.4.1.2 Analitska metoda sisanja X-žarkov pod majhnim kotom (SAXS)	12
2.4.1.3 Površinska plazmonska resonanca.....	13
2.5 LIPIDNI VEZIKLI.....	14
2.6 NANODELCI, UPORABLJENI V NAŠEM DELU	16
2.6.1 Nanodelci CoFe₂O₄	17
2.6.2 CoFe₂O₄–CA (z vezano citronsko kislino; negativno nabiti)	18
2.6.3 Fulereni (C₆₀)	19
3 MATERIALI IN METODE	22

3.1 MIKROSKOPSKE METODE	22
3.1.1 Faznokontrastna mikroskopija in GUVi.....	22
3.1.1.1 Priprava veziklov in preparatov za mikroskopijo.....	22
3.1.1.2 Priprava suspenzij nanodelcev in raztopin	22
3.1.1.3 Postavitev eksperimenta in zajem mikroskopskih videoposnetkov	23
3.1.1.4 Analiza posnetkov in statistična obdelava podatkov	23
3.1.2 Fluorescenčna mikroskopija in določanje destabilizacije plazemske membrane z metodo AO/EB	24
3.1.2.1 Izpostavite nanodelcem (C ₆₀ , CoFe ₂ O ₄ in CoFe ₂ O ₄ -CA) <i>in vivo</i> ter določanje permeabilnosti celičnih membran.....	24
3.1.2.1.1 Priprava suspenzij nanodelcev in raztopin	24
3.1.2.1.2 Izvedba poskusa.....	25
3.1.2.1.3 Ocena stopnje permeabilizacije celičnih membran in statistična analiza.....	25
3.1.2.2 Izpostavite nanodelcem CoFe ₂ O ₄ in CoFe ₂ O ₄ – CA semi <i>in vitro</i> ter določanje permeabilnosti celičnih membran.....	26
3.1.2.2.1 Priprava suspenzij nanodelcev in raztopin	26
3.1.2.2.2 Izvedba poskusa.....	26
3.2 ANALITSKA METODA SIPANJA X-ŽARKOV SAXS	26
3.2.1 Priprava suspenzij veziklov in nanodelcev.....	27
3.2.1.1 Priprava multilamelarnih veziklov	27
3.2.2 Meritve SAXS	27
3.3 POVRŠINSKA PLAZMONSKA RESONANCA	28
3.3.1 Priprava veziklov in suspenzij nanodelcev.....	28
3.3.1.1 Priprava velikih unilamelarnih veziklov	28
3.3.2 Delo z aparatom Biacore X	29
4 REZULTATI.....	30
4.1 STRUKTURNE SPREMEMBE LIPIDNIH VEZIKLOV PO INKUBACIJI Z NANODELCI.....	30
4.1.1 SAXS	30
4.1.2 Svetlobna faznokontrastna mikroskopija in GUV	31
4.2 SPREMEMBE V PREPUSTNOSTI LIPIDNIH MEMBRAN PO INKUBACIJI Z NANODELCI.....	37
4.2.1 Izpostavite nanodelcem (C₆₀, CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA) <i>in vivo</i> ter določanje stabilnosti celičnih membran	37

4.2.2 Izpostavitve nanodelcem CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄–CA semi <i>in vitro</i> ter določanje stabilnosti celičnih membran	38
4.3 POVRŠINSKA PLAZMONSKA RESONANCA	40
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	42
5.1 RAZPRAVA.....	42
5.2 SKLEPI.....	49
6 POVZETEK.....	50
7 VIRI	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Kopenski rak enakonožec.....	10
Slika 2: Prebavni sistem modelnega organizma (P. Scaber).	11
Slika 3: Faze SPR-eksperimenta.....	13
Slika 4: Shematski prikaz molekule C ₆₀	20
Slika 5: Priprava preparatov in zajem videoposnetkov s svetlobnim faznokontrastnim mikroskopom.	23
Slika 6: Intenziteta sisanja svetlobe iz treh vzorcev kot funkcije sipalnega vektorja q	30
Slika 7: Oblike veziklov pri eksperimentu.	31
Slika 8: Primer posnetka kontrolne skupine veziklov.	32
Slika 9: Povprečni premer sferičnih veziklov (v μm).	33
Slika 10: Količina nesferičnih veziklov.....	35
Slika 11: Količina prolatnih veziklov z obliko verižice.	36
Slika 12: Stopnja destabilizacije celičnih membran po oralni izpostavitvi nanodelcem....	37
Slika 13: Stopnje destabilizacije celičnih membran po izpostavitvi nanodelcem CoFe ₂ O ₄ (CF) semi <i>in vitro</i>	38
Slika 14: Stopnje destabilizacije celičnih membran po izpostavitvi nanodelcem CoFe ₂ O ₄ -CA (CF-CA) semi <i>in vitro</i>	39
Slika 15: Vezava nanodelcev CF-CA na pretočni celici Fc1 in Fc2.	40
Slika 16: Nespecifična vezava nanodelcev (CF-CA) na dekstranski matriks senzorskega čipa.	41

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Velikostna distribucija premera sferičnih veziklov (eksperiment št. 6, fulereni)	34
Preglednica 2: Velikostna distribucija premera sferičnih veziklov (eksperiment št. 7, kobaltovo-feritni nanodelci)	34

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AO – akridin oranž

AO/EB – akridin oranž/etidijev bromid

C₆₀ – fulereni

CF – kobaltovo-feritni nanodelci (CoFe₂O₄), v nevtralnem pH brez naboja

CF–CA – kobaltovo-feritni nanodelci (CoFe₂O₄–CA) z vezano citronsko kislino, v nevtralnem pH negativno nabiti

EB – etidijev bromid

GUV – orjaški unilamelarni vezikel (Giant Unilamellar Vesicle, ang.)

IJS – Inštitut Jožefa Štefana, Ljubljana

LUV – veliki unilamelarni vezikel (Large Unilamellar Vesicle, ang.)

MLV – multilamelarni vezikel (Multilamellar Vesicle, ang.)

NP – nanodelec (Nanoparticle, ang.)

POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3 fosfatidilholin

SAXS – sisanje X-žarkov pod majhnim kotom (Small Angle X-ray Scattering, ang.)

SPR – površinska plazmonska resonanca (Surface Plasmon Resonance, ang.)

X-žarki – rentgenski žarki

1 UVOD

Nanotehnologija je z uporabo nanomaterialov in nanodelcev postala del vsakdanjega življenja. Poznavanje interakcij med nanodelci in lipidnimi membranami je ključnega pomena pri uspešni uporabi nanodelcev za farmacevtske, kozmetične, medicinske in prehrambne namene ter hkrati bistveno pri ugotavljanju potencialnih škodljivih učinkov nanodelcev na biološke sisteme. Razumevanje delovanja nanodelcev na lipidne membrane nam lahko poleg uspešne aplikacije v biomedicini omogoča tudi preprečiti neželene, nepredvidene in potencialno škodljive učinke nanodelcev na biološke sisteme.

V medicini in farmaciji se nanodelci uporabljajo v diagnostične in terapevtske namene. Med trenutno zelo aktualnimi nanodelci v medicini so feromagnetni nanodelci $CoFe_2O_4$, ki so namenjeni ustvarjanju hipertermije v tumorskem tkivu. Fulerene (C_{60}) pa se zaradi edinstvenih elektrokemijskih in fizikalnih lastnosti intenzivno preučuje za uporabo v biomedicini (Pankhurst in sod., 2003; Jensen in sod., 1996). Biološki potencial nanodelcev je povezan z njihovo površinsko reaktivnostjo, zato smo testirali vpliv nevtralnih in negativno nabitih nanodelcev na umetne fosolipidne membrane.

Trenutno je uveljavljeno prepričanje, da nanodelci najprej reagirajo s celično membrano (Hong in sod., 2006; Leroueil in sod., 2008), zato so umetne fosfolipidne membrane primeren sistem za študij interakcij med nanodelci in celičnimi membranami. Metode, s katerimi je mogoče ugotavljati, kako nanodelci reagirajo z umetnimi lipidnimi membranami, so različne. Med pogosto uporabljane sodijo mikroskopske metode, s katerimi opazujemo spremembo oblike umetnih lipidnih veziklov (npr. svetlobna faznokontrastna mikroskopija), ter citotoksikološke metode, ki s pomočjo fluorescenčne mikroskopije temeljijo na ugotavljanju sprememb v prepustnosti lipidnega dvosloja. Z analitskimi metodami sisanja X-žarkov lahko opazujemo strukturne značilnosti umetnih fosfolipidnih membran. Spektroskopske metode omogočajo tudi ugotavljanje prepustnosti lipidnih veziklov (z uporabo različnih polimerov in barvil). Primerna metoda za študij interakcij med membranami in makromolekulami je tudi površinska plazmonska resonanca (tip spektroskopske metode) in mnoge druge.

Izbira metod za proučevanje interakcij med učinkovinami in lipidnimi membranami je pogojena s pričakovanim tipom interakcije. V primeru nanodelcev še ni povsem jasno, kako reagirajo z lipidnimi membranami. Najverjetnejše gre za več tipov interakcij, med katere sodijo strukturne spremembe lipidnega dvosloja, mehanske poškodbe lipidnega dvosloja, spremembe v razmerju med površino in volumnom in podobno (Lipowski in Dobereiner 1998; Kralj-Iglič in sod., 2002; Leroueil in sod., 2008; Wang in sod., 2008).

V okviru diplomskega dela smo se proučevanja interakcij nanodelcev z lipidnimi membranami lotili s faznokontrastno mikroskopijo, z analitsko metodo sisanja X-žarkov SAXS, z metodo površinske plazmonske resonance ter s citotoksičnimi metodami.

1.1 HIPOTEZA

Naše hipoteze so:

- nanodelci reagirajo z umetnimi fosfolipidnimi membranami in lipidnimi membranami tako, da povzročijo strukturne spremembe membran in vplivajo na njihovo destabilizacijo;
- nanodelci z različno površino in enako kemijsko sestavo različno reagirajo z lipidnimi membranami;
- interakcije, ugotovljene v sistemih z lipidnimi vezikli, je mogoče potrditi tudi v sistemu semi *in vitro* z izoliranim organom in s poskusom *in vivo*.

1.2 NAMEN IN IZHODIŠČA

Nameni naše naloge so:

- ugotoviti primernost izbranih metod za ugotavljanje interakcij med nanodelci in lipidnimi membranami;
- ugotoviti, katere so tiste lastnosti nanodelcev, ki vplivajo na njihovo aktivnost oz. biološko inertnost;
- primerjati učinek nanodelcev na lipidne vezikle in na celice v izoliranem tkivu v sistemu semi *in vitro* ter s poskusom *in vivo*.

1.3 PRIČAKOVANI REZULTATI

Pričakujemo, da bodo različni nanodelci različno reagirali s POPC-lipidnimi vezikli. Iz tega bomo sklepali na lastnosti nanodelcev, ki so ključne pri njihovi biološki reaktivnosti. Pričakujemo, da bodo delci z različno površino, a enako kemijsko sestavo delca, različno reagirali s fosfolipidnimi membranami. Pričakujemo, da bodo tisti delci, ki bodo reagirali z umetnimi lipidnimi membranami, reagirali in učinkovali tudi na celice v sistemu semi *in vitro* ter *in vivo*.

Pričakovani rezultati bodo prispevali k uspešnejši aplikaciji nanodelcev in zmanjševanju njihovih neželenih učinkov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANOTEHNOLOGIJA

Nanotehnologija za mnoge predstavlja naslednji logični korak v znanosti, ki povezuje inženiring z biologijo, kemijo in fiziko. Nanotehnologija je znanstvena disciplina, ki gre prek meja miniaturizacije, kjer veljajo nova pravila (Borm in sod., 2006).

Nanotehnologijo je *Subcommittee on Nanoscale Science, Engineering and Technology of the Office of Science and Technology* definiral kot »Znanstveno raziskovanje in tehnološki razvoj na atomskem, molekulskega ali makromolekulskega nivoju, v okvirnem velikostnem rangu 100 nm. Nanotehnologija bistveno doprinese k razumevanju pojavov in materialov nanometrske velikosti ter k proizvodnji in uporabi struktur, naprav in sistemov z novimi lastnostmi in funkcijami, nastalimi kot posledica njihove majhne velikosti. Te nove lastnosti in funkcije se razvijejo pri kritični velikosti snovi, tipično pod 100 nm. Nanotehnološko raziskovanje in razvoj vključujejo integracijo struktur nanometrske velikosti v sestavine, sisteme in strukture večje velikosti. Znotraj teh večjih sestavov pa ureditev in konstrukcija sestavnih elementov ostane na nanometrski velikostni skali.« (Dreher, 2004, cit.po National Research Council, 2002).

Področje nanotehnologije lahko razdelimo v tri glavne segmente; to so materiali, orodja in naprave. Izraz **nanomateriali** opisuje materiale, ki imajo vsaj eno dimenzijo v rangu od 1 do 100 nm. Vključujejo nanodelce, nanozlakna in nanocevke, kompozitne materiale ter nano-strukturirane površine. Nanodelci so definirani kot posamezni delci s premerom, manjšim od 100 nm. Nanozlakna uvrščamo v podrazred nanodelcev, ki imajo dve dimenziji manjši od 100 nm, tretja (osna) pa je mnogo večja (vključujejo tudi nanocevke). **Nanoorodja** so orodja in tehnike za sintezo nanomateriala, rokovanje z atomi, izdelavo nanonaprav ter za merjenje in karakterizacijo materialov in naprav nanometerske velikosti. **Nanonaprave** so pomembne v mikroelektroniki in optoelektroniki ter kot stičišče z biotehnologijo (Borm in sod., 2006).

Z nastopom nanotehnologije različni vidiki uporabe nanodelcev hitro napredujejo. Prednosti nanotehnologije družba in ekonomija s pridom izkoriščata v okviru strukturnega inženiringa, industrije, elektronike, optike, potrošniških produktov, alternativne energije,

remediacije prsti in vode ter medicinske uporabe v terapevtske in diagnostične namene ali kot sredstvo za prenos zdravilnih učinkovin. Možni toksični učinki nanodelcev na zdravje ljudi so v veliki meri še neraziskani (Gwinn in Vallyathan, 2006; Drobne, 2007).

Potencial nanodelcev na vseh teh področjih je izjemno velik in pričakujemo, da bo njihova uporaba v prihodnje še naraščala. S pojavom široke uporabe nanodelcev pa se porajajo tudi potencialni kvarni učinki nanodelcev neposredno na biološke sisteme.

2.2 NANODELCI – LASTNOSTI IN UPORABA

Lastnosti nanodelcev se dokazano razlikujejo od materialov enake kemijske sestave, a z večjo maso. Nove, neobičajne lastnosti pridejo do izraza pri velikosti delcev pod 100 nm, saj se ob zmanjšani velikosti delca poveča število atomov na površini glede na prostornino in tako delci nanometrskih velikosti postanejo reaktivnejši. Nekateri pa nanodelce klasificirajo tudi kot fine delce, velike do približno 200 nm, in ultrafine, ki so manjši od 100 nm (Drobne in Kralj-Iglič, 2009; Koehler in sod., 2008).

Gwinn in Vallyathan (2006) nanodelce definirata kot proizvedene strukture s polmerom, manjšim od 100 nm, ustvarjene s kemičnim in/ali fizikalnim procesom in s specifičnimi lastnostmi, ki se pri makrometrskih dvojnikih po sestavi ne kažejo.

Nanodelci se vedno širše uporabljajo v prehrambni industriji, medicini, prometu in tudi vesoljski tehnologiji. Ena izmed možnih uporab nanodelcev pa je tudi v kozmetičnih izdelkih, kjer delujejo kot prenašalci učinkovin za vlaženje, ali v šamponih, detergentih in zaščitnih kremah proti soncu (Borm in sod., 2006). S pomočjo nanodelcev se izboljšujejo lastnosti že poznanih materialov ali pa iz njih izdelujejo materiale s popolnoma novimi lastnostmi. V prihodnosti bo uporaba nanodelcev v medicinske namene, kot so klinične terapije, diagnostika in tarčno usmerjanje zdravil, še naraščala (Gwinn in Vallyathan, 2006).

Pomembno vlogo pri preučevanju učinkov nanodelcev na biološke sisteme ima določitev površinskih lastnosti nanodelcev. Ob zmanjšani velikosti delca se število atomov na površini poveča glede na prostornino delca. Rezultat tega je večja reaktivnost delcev nanometrskih velikosti in s tem, gledano s stališča uporabnosti nanodelcev, bolj učinkovita

kataliza. Z medicinskega vidika pa reaktivne skupine na površini delca lažje modificirajo biološke učinke. Suspendirani v plinu ali tekočini imajo, odvisno od koncentracije in kemijske sestave medija, tendenco tvorjenja aglomeratov in agregatov (Borm in sod. 2006; Skebo in sod., 2007).

Nanodelci lahko nastanejo pri naravnih procesih (izbruhi vulkanov, erozija, vodni aerosoli) ali pa so rezultat človeškega delovanja, kot je izgorevanje biomase in fosilnih goriv, proizvodnja materialov, promet, gradbeništvo itd. Nanodelce lahko v teoriji proizvedemo iz skoraj vsake kemikalije, vendar danes večinoma uporabljam nanodelce, narejene iz prehodnih kovin, silikona, ogljika (ogljikove nanocevke z enojno steno, fulereni) in kovinskih oksidov (cinkov dioksid in titanov dioksid). Proizvedeni nanodelci imajo specifične fizikalno-kemijske značilnosti in površinske ovoje, ki jim prinesejo edinstvene in zelo zaželene električne, termične in mehanske lastnosti na medicinskem, komercialnem in okoljskem področju. Proizvedeni nanodelci se uporabljajo na zelo različnih področjih, vendar ostajajo mnoga vprašanja o njihovem nadalnjem razvoju in aplikaciji še nepojasnjena (National Research Council, 2002; US Environmental Protection Agency, 2003; Masciangioli in Zhang, 2003; Dreher 2004; Borm in sod., 2006; Nel in sod., 2006; Nikulainen in Palmberg, 2010).

2.3 INTERAKCIJE MED NANODELCI IN BIOLOŠKIMI SISTEMI

Mnogi avtorji zaključujejo, da prve interakcije med nanodelci in celicami potekajo na membrani (Leroueil in sod., 2007; Verma in Stellacci, 2010). Obstaja veliko eksperimentalnih dokazov, da je interakcija nanodelcev s celičnimi membranami intenzivna in da imajo različni nanodelci močan potencial razbitja celičnih membran (Leroueil in sod., 2008). Eden od neželenih učinkov nanodelcev na biološke sisteme pa je njihova potencialna strupenost.

Nekateri avtorji menijo, da nanodelci povzročijo površinske rekonstrukcije membranskih fosfolipidov oziroma lahko fizično razbijejo strukturo lipidnega dvosloja, da lahko na destabilizacijo membrane delujejo prek oksidoreduktičkih procesov oziroma elektronskega prenosa ali pa da je učinek nanodelcev na membrano posledica odtapljanja toksičnih elementov nanodelcev (Hong in sod., 2006; Wang in sod., 2008). Nanodelci se na membrano lahko adsorbirajo, lahko pa s formacijo lukenj, tanjšanjem membrane in

lipidno peroksidacijo zmanjšajo njeno integriteto (Mecke in sod., 2005; Hong in sod., 2006; Zang in Granick, 2006; Ginzburg in Balijepalli, 2007; Leroueil in sod., 2007). Nekateri drugi avtorji (Verma in Stellacci, 2010) pa predvidevajo, da nanodelci ob kontaktu s celično membrano z endocitozo vstopijo v citosol, kar velja tudi za fulerene. Nedavne razprave poročajo o učinkih nanodelcev *in vivo* in *in vitro* (Leroueil in sod., 2007) na stabilnost membrane in oblikovanje por. Izraz luknja ali pora se lahko nanaša na vrsto strukturnih sprememb, ki vodijo v povečano prepustnost membran, od oblikovanja dejanskih lukenj do manjših sprememb v sestavi, ki povečajo difuzijo skozi membrano.

Predlagani so različni možni mehanizmi, kako nanodelci povečajo prepustnost membran (Unfried in sod., 2007). Permeabilnost membrane se lahko poveča zaradi zmanjšane gostote membranskega materiala (lipidi, proteini, holesterol, itd.), možen pa je tudi fazni premik membranskih lipidov iz tekočega kristalnega stanja v stanje gel, čemur sledi povečana prepustnost membrane za ione (Antonov in sod., 1980, 2007).

Študije *in vitro* so pokazale, da nanodelci sprožijo nastanek prostih kisikovih radikalov, ki poškodujejo celice. Poleg tvorbe reaktivnih kisikovih spojin se lahko pojavi tudi oksidativni stres, vnetje, sprememba delovanja mitohondrijev, denaturacija proteinov, poškodbe DNA in druge. Znani so tudi primeri pojava tumorjev (Borm in sod., 2006; Nel in sod., 2006).

Druge študije (Lipowsky in Döbereiner, 1998) predpostavljajo, da nekateri nanodelci v dispergirani obliki ne prečkajo membrane, temveč se nanjo le adsorbirajo in s tem sprožijo različne stopnje spontane ukrivljenosti membran. Leroueil in sod. (2007) pa so opazili, da nanodelci neselektivno prehajajo skozi celične membrane, kar postavlja kot ključni element pri oblikovanju kemoterapevtskih agensov.

Novejše študije potrjujejo (Drobne in Kralj-Iglič, 2009), da so interakcije nekaterih nanodelcev z biološkimi sistemi v veliki meri povezane z njihovo površinsko reaktivnostjo, kar pomeni, da imajo reakcije med površino delca in celično membrano večjo težo kot jedro delca ali velikost, torej površina delca *per se* (sama po sebi) vpliva na razvoj (cito)toksičnih odzivov (Warheit in sod., 2007a, 2007b).

2.4 METODE ZA PROUČEVANJE INTERAKCIJ MED NANODELCI IN BIOLOŠKIMI MEMBRANAMI

Izbira metod za proučevanje interakcij med učinkovinami in lipidnimi membranami je pogojena s pričakovanim tipom interakcije. V primeru nanodelcev še ni povsem jasno, kako reagirajo s fosfolipidnimi membranami. Za študije možnih interakcij je bilo uporabljenih veliko različnih metod. V okviru mikroskopskih metod uporabljajo, poleg svetlobne faznokontrastne in fluorescentne mikroskopije, tudi mikroskopijo na atomsko silo, konfokalno mikroskopijo, transmisijsko elektronsko mikroskopijo, elektronsko paramagnetno resonanco idr.

Veliko raziskovalnih skupin se ukvarja z opazovanjem liposomov in vpliva nanodelcev na membrane s svetlobnim faznokontrastnim mikroskopom (Drobne in Kralj-Iglič, 2009). Pogosto uporabljene so tudi različne spektrofotometrične metode. Lahko opazujemo spremenjeno prepustnost membran za različne polimere in barvila kot posledico destabilizacije membran (Banaszak, 2009), npr. z merjenjem količine sproščenega fluorescentnega barvila (npr. kalceina) iz veziklov. Z metodo sipanja X-žarkov pod majhnim kotom (SAXS - Small Angle X-ray Scattering, ang.) je mogoče opazovati strukturne značilnosti fosfolipidnega dvosloja pri umetnih fosfolipidnih veziklih. Z različnimi metodami je bilo ugotovljeno, da imajo različni tipi nanodelcev različno sposobnost reagiranja z lipidnim dvoslojem. Z uporabo citotoksikoloških metod je mogoče vrednotiti potencialno kvarne učinke nanodelcev na biološke sisteme, ki posledično lahko vodijo v destabilizacijo in permeabilizacijo celičnih membran.

Zelo primeren sistem za študije učinkov različnih substanc na celične membrane so umetne fosfolipidne membrane. Pripravimo jih enostavno s formacijo fosfolipidnih vezikov v vodni suspenziji, sestavo membrane pa do neke mere lahko kontroliramo. Umetne membrane so manj heterogene kot celične membrane in se tako lažje osredotočimo le na določen predmet proučevanja (Peetla in sod., 2009).

2.4.1 Metode, uporabljene v naši študiji

Za natančno informacijo o interakciji nanodelcev z lipidnimi membranami so potrebne študije *in vitro* in tudi *in vivo*, prilagojene edinstvenim lastnostim nanomateriala. Lipidni vezikli predstavljajo zelo pomemben model za proučevanje fizikalnih, kemijskih in

električnih lastnosti bioloških membran, saj jih lahko opazujemo s svetlobnim mikroskopom in so v enakem velikostnem razredu kot celice (Pavlič in sod., 2010), torej so nedvomno ustrezni sistem za študije interakcij nanodelcev s fosfolipidnim dvoslojem.

S faznokontrastno mikroskopijo je mogoče opazovati spremembe oblike in velikostne porazdelitve orjaških unilamelarnih veziklov (GUV – Giant Unilamellar Vesicles, ang.) po dodatku suspenzij različnih učinkovin, npr. nanodelcev.

Z analitsko metodo sipanja X-žarkov pod majhnim kotom (SAXS) je mogoče opazovati strukturne značilnosti multilamelarnih veziklov (MLV – Multilamellar Vesicle, ang.), kot so debelina lipidnega dvosloja, razdalja med lipidnimi dvosloji znotraj multilamelarnega vezikla, urejenost lipidnih dvoslojev itd., po inkubaciji veziklov v suspenzijah različnih nanodelcev.

Metoda površinske plazmonske resonance (SPR – Surface Plasmon Resonance, ang.) se uporablja za vrednotenje kinetičnih lastnosti interakcij med molekulami, med drugim tudi za študije interakcij med neko učinkovino in fosfolipidnimi membranami.

Citotoksične metode lahko uporabimo za preverjanje rezultatov študij *in vitro* na umetnih fosfolipidnih membranah. Raki enakonožci so se izkazali kot zelo ustrezni organizem v različnih citotoksikoloških študijah (Drobne, 1997). Omogočajo nam izvedbo poskusov semi *in vitro* s prebavno žlezo, kot tudi študij *in vivo* z oralno izpostavitvijo nanodelcem.

2.4.1.1 Mikroskopske metode

2.4.1.1.1 Faznokontrastna svetlobna mikroskopija in GUV-i

Proučevanje dinamičnega spremenjanja oblik fosfolipidnih veziklov pod različnimi dražljaji je zelo zahtevno (Markvoort in sod., 2006; Yu in Granick, 2009) in za tovrstne študije je svetlobna mikroskopija neobhodno potrebna. Med svetlobno mikroskopskimi metodami je še posebej uporabna faznokontrastna svetlobna mikroskopija, ki deluje na osnovi različne optične gostote vzorca. Številni avtorji proučujejo posamezne vezikle ali manjše skupine veziklov. Nedavno pa so Zupanc in sod. (2010) začeli proučevati spremembe oblike lipidnih veziklov z opazovanjem celotne populacije veziklov.

2.4.1.1.2 Fluorescenčna mikroskopija in citotoksikološka metoda diferencialnega barvanja

AO/EB

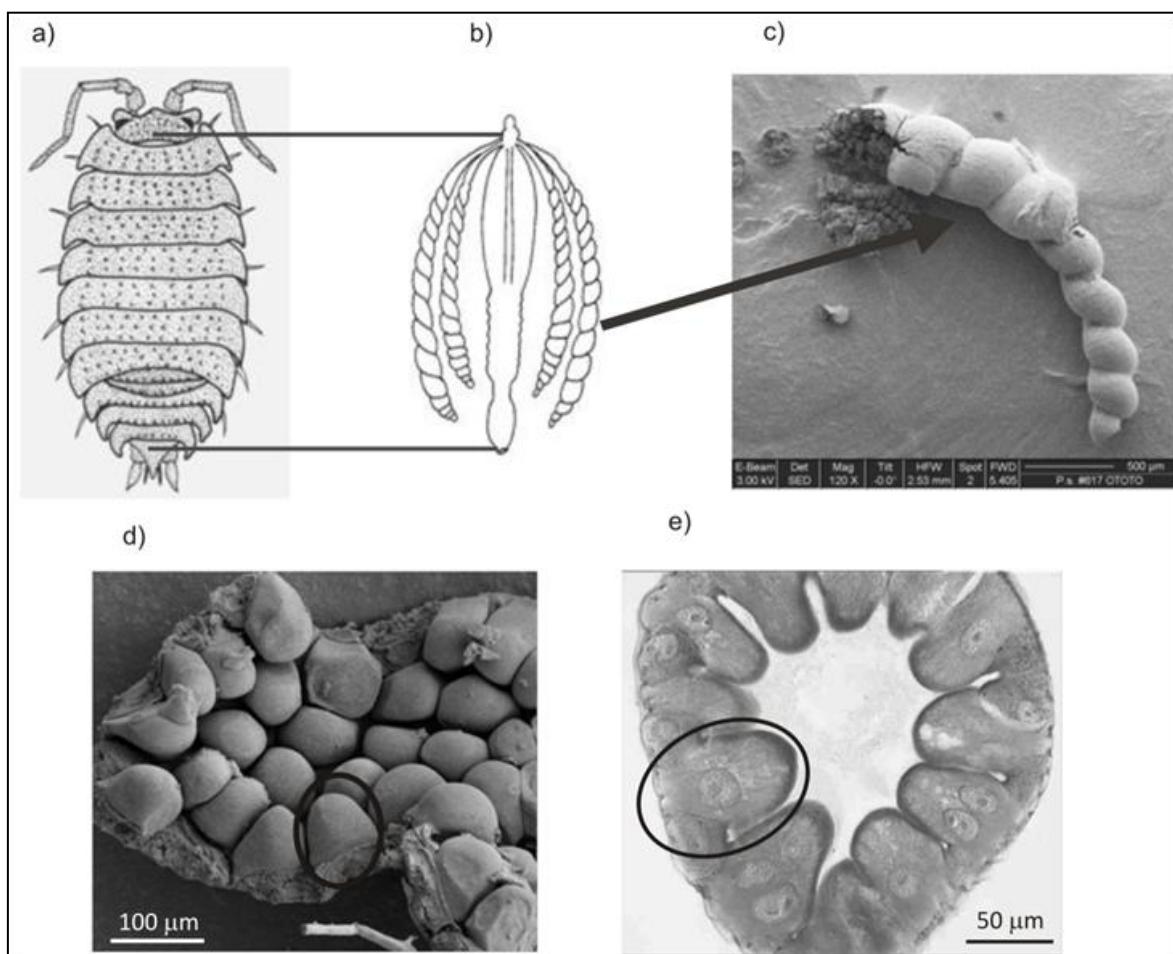
2.4.1.1.2.1 Ocenjevanje permeabiliziranosti celičnih barvil v poskusih semi *in vitro* ter *in vivo*

Izopodni raki so primeren nevretenčarski model za izvedbo številnih fizioloških, histoloških in citoloških študij (Drobne 1997). Mednje sodijo tudi študije strupenosti kemikalij in v zadnjem času nanodelcev (Drobne in sod., 2007). Kopenske rake enakonožce (Isopoda, slika 1) najdemo v vlažnih rastiščih v bližini človekovih bivališč. Hranijo se z razpadlim organskim materialom in so pomembni dekompozitorji.



Slika 1:Kopenski rak enakonožec.

Študije strupenosti pogosto vključujejo raziskave sprememb v zgradbi in delovanju prebavnih žlez, ki prve pridejo v stik z zaužitimi kemikalijami. Prebavni sistem kopenskih rakov enakonožcev je sestavljen iz prebavne cevi in prebavne žleze (hepatopankreasa), sestavljeni iz dveh parov cevk (slika 2).



Slika 2: Prebavni sistem modelnega organizma (P. Scaber).

a) skica raka enakonožca (*Porcellio scaber*), b) skica prebavnega sistema raka *P. scaber*, c) mikrografija vrstične elektronske mikroskopije ene cevke hepatopankreasa, d) mikrografija vrstične elektronske mikroskopije posameznih celic apikalnega dela prebavnih žlez (ena celica je označena), e) prečni prerez prebavne žleze, narejen s svetlobno mikroskopijo (ena celica je označena) (Valant, 2010: 28).

Metoda diferencialnega barvanja z akridin oranžn/etidijev bromidom (AO/EB) je v različnih študijah *in vitro* zelo priljubljena za ovrednotenje destabilizacije celičnih membran različnih tipov celic. Nedavno so Valant in sod. to metodo preoblikovali tako, da je primerna tudi za ocenjevanje membranske stabilnosti celotnega tkiva. Metoda temelji na različni prepustnosti celičnih membran za obe barvili, kar se pokaže v različno obarvanem jedru. Akridin oranž prosto prehaja skozi poškodovane in nepoškodovane membrane, medtem ko so za etidijev bromid prepustne le destabilizirane membrane. V celici obe barvili potujeta v jedro in se specifično vežeta na DNK. Jedra celic z intaktnimi membranami imajo po dodatku obeh barvil zeleno obarvano jedro, saj je v celice vstopil le

akridin oranž. V celice s poškodovanimi celičnimi membranami pa preideta obe barvili, vendar pri ekscitacijski valovni dolžini od 450 do 490 nm in emisiji 515 nm prevlada učinek etidijevega bromida, ki jedra obarva rdeče (Novak, 2009; Valant, 2010).

2.4.1.2 Analitska metoda sisanja X-žarkov pod majhnim kotom (SAXS)

Metoda SAXS je nedestruktivna tehnika sisanja rentgenskih žarkov, ki omogoča določitev strukturnih podrobnosti snovi v rangu od 10 Å do 1000 Å oziroma od 1 nm do 100 nm (Glatter in Kratky, 1982; Guinier, 1963; Koch in sod., 2003). SAXS je zelo široko uporabljeni metoda v različnih študijah bioloških struktur, predvsem za strukturne raziskave tekočih koloidnih sistemov. Najpogosteje se proučuje molekulske agregate, kot so lipidne membrane, ter različne makromolekule. Metoda SAXS temelji na elastičnem sisanju X-žarkov (valovna dolžina od 0,1 do 0,2 nm). Lastnosti teh X-žarkov, sisanih s površine vzorca, so pogojene s kontrastom, nastalim zaradi različne specifične gostote elektronov v vzorcu oziroma zaradi nehomogene površine vzorca v nanometrski skali. Tipični kot sisanja je zabeležen v velikostnem rangu od 0.1 do 10°. SAXS nam poda informacije o velikosti in obliki nanodelcev, omogoča pa nam tudi rekonstrukcijo notranje nanostrukturi urejenih materialov (Glatter in Kratky, 1982).

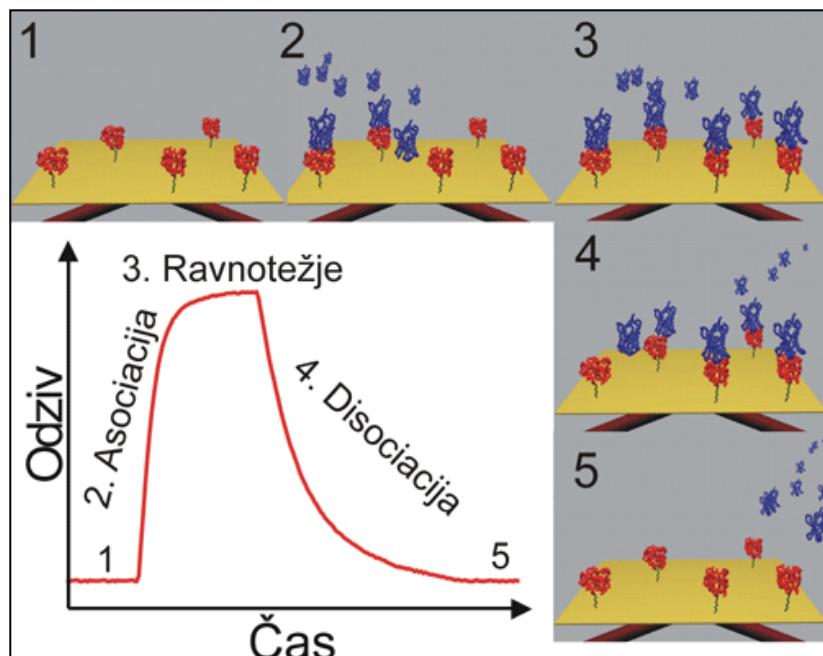
V instrumentu SAXS je monokromatični snop X-žarkov usmerjen do vzorca, od katerega se nekaj X-žarkov sipa, medtem ko se večina fotonov adsorbira, ali pa jih gre skozi vzorec brez interakcije s snovjo. Detektor zabeleži vzorec sisanih X-žarkov, iz katerega dobimo informacije o strukturi vzorca.

Vzorec sisanja svetlobe, dobljen z metodo SAXS, prikazuje intenziteto sisanja kot funkcijo kota sisanja (θ). Vendar intenziteto sisanja pogosteje opišemo kot funkcijo sipalnega vektorja. Prednost slednjega parametra je, da je neodvisen od uporabljenega vira X-žarkov, saj je normaliziran z valovno dolžino X-žarkov (λ). Sipalni vektor lahko v splošnem opredelimo z dvema definicijama, imenovanima q in s :

$$q = 2\pi s = 4\pi \cdot \sin(\theta) / \lambda.$$

2.4.1.3 Površinska plazmonska resonanca

Površinska plazmonska resonanca (SPR) je postala ena izmed najpomembnejših tehnik za proučevanje interakcij med dvema molekulama. Večina raziskovalcev to metodo uporablja za študije interakcij med dvema proteinoma, v zadnjem času pa se uporablja tudi za proučevanje interakcij proteinov z membranami. Biosenzorji, ki temeljijo na površinski plazmonskej resonanci, se uporabljajo za kvalitativno in kvantitativno karakterizacijo kinetike širokega spektra makromolekulskeih interakcij. Z refraktometrije mogoče izmeriti hitrost asocijacije in disocijacije ter afiniteto interakcij med molekulami. Potek odziva spremljamo na senzorgramu, t.j. krivulji, ki prikazuje spremembo intenzitete svetlobe v času (slika 3) (Myszka, 1997; Podlesnik-Beseničar in Anderluh, 2010).



Slika 3: Faze SPR-eksperimenta.

V fazi **asociacije** (2) se analit veže na ligand, kar se kaže kot porast signala na senzorgramu. Na zgornjih slikah je ligand del protitelesa (rdeče), analit pa je nek antigen (modro). Ligand je vezan na senzorski čip (rumeno) z vmesnikom (zeleno). Ob zasedenosti vseh vezavnih mest, pride do zasičenja in odziv se ustali pri neki vrednosti (3). Ob prenehanju vbrizgavanja vzorca preko senzorskega čipa, pride do **disociacije** (4), takrat se analit počasi odceplja z liganda. Na koncu poskusa (5) je na senzorskemu čipu vezan le ligand in odziv je enak kot na začetku (1). Iz faze asocijacije in disocijacije lahko določimo, kako hitra je vezava, iz faze ravnotežja pa lahko sklepamo na to, koliko analita je vezanega na senzorski čip (<http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/Tehnologija.html>).

Optični biosenzorji še niso zelo pogosto uporabljeni v študijah biologije membran, vendar bi rezultati eksperimentov lahko prispevali pomembne kvalitativne in kvantitativne informacije o interakcijah različnih molekul z membranskim dvoslojem (Podlesnik-Beseničar in Anderluh, 2010). Objav o uporabi te metode za študije interakcij med nanodelci in fosfolipidnim dvoslojem nismo zasledili.

2.5 LIPIDNI VEZIKLI

Umetne fosfolipidne membrane so zelo primeren sistem za študije učinkov različnih substanc na membrane. Pripravimo jih enostavno s formacijo fosfolipidnih vezikov v vodni raztopini, sestavo membrane pa do neke mere lahko kontroliramo. Umetne membrane so manj heterogene kot celične membrane, zato se lažje osredotočimo le na določen, izbran mehanizem. Pripravimo lahko vezikle z različno lipidno sestavo, okoljsko raztopino pa je mogoče spremenjati z dodajanjem različnih snovi, npr. s suspenzijo nanodelcev (Drobne in Kralj-Iglič, 2009).

Med najpogosteje uporabljene lipide sodijo:

- nevtralni POPC (palmitoil oleoil fosfatidilholin);
- anionski POPG (palmitoil oleoil fosfatidilglicerol);
- DOPC (diolein fosfatidil holin);
- DPPC (dipalmitoil fosfatidil holin);
- DLPC (dilauroil glicero fosfatidilholin) in drugi (Wang in sod., 2008).

Številne znanstvene študije obravnavajo spreminjanje oblike in velikosti lipidnih veziklov (Moona in sod. 1998; Bagatolli, 2000). Večina raziskovalnih skupin se ukvarja s proučevanjem konformacijskih sprememb veziklov, kot na primer preferenčne oblike veziklov, spremembe ter flktuacije oblik (Lipowsky, 1991; Mathivet in sod., 1996; Svetina in Žekš, 2002; Arriaga in sod., 2010).

Lipidni vezikli so zelo prilagodljive strukture z visoko raznolikostjo oblik. Že majhne asimetrične spremembe v lipidnem dvosloju se lahko izrazijo kot močno spontano ukrivljanje membrane, kar vpliva na preoblikovanje veziklov. Vezikli sferične oblike se pogosto preoblikujejo v prolatno elipsoidno obliko, hruškasto, čašasto ali diskocitno

oblikovane vezikle ter v vezikle z brsti (Lipowsky, 1991; Hotani in sod., 1999; Markvoort in sod., 2006). Transformacija poteka postopoma v zaporednih fazah po eni od ustaljenih transformacijskih poti in je do neke točke lahko reverzibilna (Hotani in sod., 1999). Razlika med osmotskim pritiskom med zunanjostjo in notranjostjo vezikla pa je gonilna sila teh transformacij (Hotani in sod., 1999; Kralj-Iglič in sod., 2001). Transformacije oblik veziklov se lahko med drugim pojavi tudi zaradi kemijske modifikacije lipidov ter zaradi fosfolipidnega flip-flopa (Kralj-Iglič in sod., 2001). Svetina in Žekš (2002) poleg že omenjenih oblik med drugim obravnavata tudi sferične vezikle z invaginiranimi manjšimi vezikli, zrcalno simetrične vezikle v obliki cigar ter v obliki morskih zvezd. Markvoort in sod. (2006) so v študiji opazili, da se vezikli neprestano spreminjajo iz ene v drugo transformacijo, med elipsoidno, diskocitno, hurškasto in čašasto obliko, opazili pa so tudi pogosto zlivanje dveh veziklov.

Kralj-Iglič in sod. (2001) so prvič opazili transformacijo POPC-veziklov z dolgimi tubularnimi izrastki, prek stopnje z valujočimi izrastki do kijasto (ročkasto) oblikovanih veziklov. V predhodnih študijah je bilo ugotovljeno, da so orjaški vezikli po elektroformaciji v raztopini sladkorjev povezani s tankimi in krhkimi tubularnimi strukturami (Mathivet in sod., 1996), ki jih s svetlobnim faznokontrastnim mikroskopom sprva ne opazimo. Po določenem času dolgi tanki tubularni izrastki postanejo vidni. Kralj-Iglič in sod. (2001, 2002) predvidevajo, da so dolgi tubularni izrastki, ki so jih opazili z enim koncem pritrjene na vezikle, le ostanki mrežaste tvorbe, nastale kot posledica elektroformacije lipidnih veziklov v sladkorni raztopini. Sčasoma se izrastki krajšajo in debelijo, videti so kot majhni brsti, ki so z materinskim vezikлом povezani z ozkim vratom, dokler se počasi popolnoma ne vključijo v membrano vezikla. Babnik in sod. (2003) so v študiji opazovali spontano krajšanje dolgega tubularnega izrastka vezikla do oblikovanja vezikla z vključenimi endovezikli. Navajajo, da se kijasto (ročkasto) oblikovani vezikli nato preoblikujejo v vezikle ovalne oblike, čemur sledi oblikovanje manjšega brsta v notranjosti vezikla.

Večina eksperimentalnih dokazov o delovanju membran temelji na študijah, izvedenih na orjaških unilamelarnih veziklih (GUV-ih) (Döbereiner, 2000; Dimova in sod., 2006). Orjaški unilamelarni fosfolipidni vezikli (GUV-i) so s svojim povprečnim premerom od 1 do 100 µm (Döbereiner, 2000) v istem velikostnem razredu kot celice in dovolj veliki za

opazovanje s svetlobnim mikroskopom, ki med drugim omogoča direktno sledenje spremjanju njihove oblike (Drobne in Kralj-Iglič, 2009). GUV-i so lep modelni sistem za proučevanje konformacij in interakcij dvodimenzionalnih površin v tridimenzionalnem prostoru (Döbereiner, 2000).

Multilamelarni vezikli so najpreprostejši liposomi, ki se oblikujejo po mehanski disperziji suhih lipidov v vodni raztopini. Sestavljeni so iz množice koncentričnih lipidnih dvoslojev, vsak posamezni dvosloj je ločen z ozkim kanalom vodne raztopine. Urejena razporeditev dvoslojev v multilamelarnih veziklih predstavlja idealen sistem za študije z uporabo X-žarkov (Hope in sod., 1986).

Veliki unilamelarni vezikli (LUV – Large Unilamellar Vesicle, ang.) POPC so primeren modelni sistem membrane za vezavo na senzorske čipe in izvedbo meritev z optičnimi senzorji v okviru površinske plazmonske resonance (Podlesnik-Besenčar, Hodnik in Anderluh, 2010).

2.6 NANODELCI, UPORABLJENI V NAŠEM DELU

Feromagnetni nanodelci in fulereni (C₆₀) zaradi vsestranske uporabe, predvsem v medicinske namene, spadajo med bolj proučevane nanodelce. O fulerenih, njihovih lastnostih in delovanju je že veliko znanega. Od odkritja molekule C₆₀ pred 25 leti študije lastnosti in delovanja teh nanodelcev potekajo zelo intenzivo, predvsem v smeri biomedicinske aplikacije v terapevtske in diagnostične namene. Uporaba kobaltovo-feritnih magnetnih nanodelcev v medicini za zdravljenje tumorjev v zadnjem času opazno narašča. Kobaltovo-feritni nanodelci imajo zaradi svoje majhne velikosti zelo močan biološki potencial za interakcije z lipidnimi membranami, fulereni pa so, poleg majhne velikosti, hidrofobni, torej dobro topni v celičnih membranah. Proučevanje lastnosti obeh tipov nanodelcev, fulerenov in kobaltovih feritov, postaja vedno bolj intenzivno, predvsem v smeri možnih interakcij z biološkimi sistemi na različnih organizacijskih ravneh in z namenom izboljšati njihovo uporabnost (Jensen in sod., 1996; Pankhurst in sod., 2003; Gyergyek in sod., 2008; Zi in sod., 2008; Bae in sod., 2009).

2.6.1 Nanodelci CoFe₂O₄

Kobaltovo-feritni nanodelci (CoFe₂O₄) so predstavniki skupine magnetnih nanodelcev.

Magnetni nanodelci se uporabljajo za namene:

- uničevanja tumorskih celic s hipertermijo;
- magnetskega shranjevanja podatkov;
- sončnih celic;
- senzorjev;
- *in vivo* ter *in vitro* označevanja celic in ločevanja snovi s pomočjo magnetov;
- ciljne dostave zdravil in
- povečanja kontrasta pri slikanju z NMR-tehniko idr.

Uporaba magnetnih nanodelcev v medicinske namene je še posebno zanimiva, saj nanje lahko vplivamo z magnetnim poljem ter jih spremljamo in upravljamo z njimi na daljavo (Čampelj in sod., 2006). Tako usmerjanje z distance v kombinaciji z učinkovitim širjenjem magnetnega polja po telesnih tkivih omogoča mnogo aplikacij teh delcev, vključujuč transport in/ali imobilizacijo magnetnih nanodelcev ali z njimi označenih materialov po telesu. Tako lahko služijo za usmerjeno dostavo zdravil ali skupkov radionuklidnih atomov do tarčnih tumorskih celic (Wilhelm in sod., 2003; Skumie, 2006; Gyergyek in sod. 2008; Bae in sod., 2009).

Ena izmed najpomembnejših aplikacij teh nanodelcev je zdravljenje tumorjev z magnetno-tekočinsko hipertermijo. To je novejša metoda za zdravljenje lokaliziranih in globoko vsidranih malignih tumorjev, ki omogoča uničenje tumorskih celic s segretjem tkiva na 41–46 °C. Proizvedeni nanodelci CoFe₂O₄ imajo stehiometrično stabilno strukturo, ki zelo zmanjša neželene stranske učinke med nanodelci in komponentami krvi. Bae in sod. (2009) trdijo, da so sintetizirani kobaltovo-feritni delci primeren agens za izvedbo hipotermije *in vivo*, saj po intravenozni aplikaciji delcev niso opazili tvorbe kakršnih koli poškodb intravaskularnega trakta ali strjevanja krvi (Wilhelm in sod., 2003; Skumie, 2006; Gyergyek in sod. 2008; Bae in sod., 2009).

2.6.2 CoFe₂O₄-CA (z vezano citronsko kislino; negativno nabiti)

Vezava citronske kisline na nanodelce spremeni njihove površinske lastnosti, kar vpliva na reaktivnost z biološkimi sistemi. Različni avtorji poročajo, da poleg oblike in velikosti nanomateriala interakcije s celično membrano določajo predvsem kemijske funkcionalne skupine na površini delcev. Ne le vrsta oziroma tip kemijskih skupin, ampak tudi njihova relativna razporeditev na površini igrata pri tem ključno vlogo (Kumar-Gupta in Gupta, 2005; Verma in Stellacci, 2010).

Wilhelm in sod. (2003) ter Wang in sod. (2008) v študijah dokazujejo nespecifično adsorpcijo nabitih nanodelcev na fosfolipidni dvosloj. Wang in sod. (2008) so z metodama kalorimetrije in fluorescence ugotovili, da nanodelci na mestu adsorpcije povzročijo površinsko rekonstrukcijo membrane. Nanodelci z negativnim površinskim nabojem so inducirali lokalno pretvorbo membrane iz tekočega v gel-stanje. V študiji predpostavljajo, da se z vezavo nabitih nanodelcev lahko spremeni kot nagiba fosfatidilholina, kar povzroči spremembo (obrat oziroma preklop) lokalnega faznega stanja fosfolipidnega dvosloja. Negativno nabiti nanodelci preferenčno interagirajo z N⁺-koncem glave fosfatidilholina in posledično se poveča rigidnost oziroma zgoščenost lipidnih repov. Znano je, da se nabiti nanodelci adsorbirajo na fosfatidilholinski del lipidnega dvosloja in tako liposomi ohranijo svojo integriteto. Rezultati, dobljeni s fluorescenčnim upodabljanjem ('imaging'), so pokazali dinamično prostorsko porazdelitev nanodelcev po orjaških unilamelarnih veziklih (GUV-ih) brez agregacije nanodelcev, vsaj ne zaznavne s svetlobno mikroskopijo (Wang in sod., 2008).

Wilhelm in sod. (2003) pa so v študijah intraceličnega privzema anionskih superparamagnetičnih nanodelcev dokazali, da testirane celice linije HeLa privzamejo za tri velikostne razrede več anionskih kot z dekstronom prekritih maghemitnih (Fe₂O₃, γ-Fe₂O₃) nanodelcev. Razlagajo, da nespecifično adsorpcijo anionskih nanodelcev na membrano usmerjajo elektrostatske interakcije. Predvidevajo, da je zelo učinkovit celični privzem anionskih nanodelcev povezan z nespecifično adsorpcijo nanodelcev na plazmalemo (zaradi elektrostatskih interakcij) ter z združevanjem negativno nabitih nanodelcev na kationskih mestih na plazmalemi. Slednje inducira lokalno nevtralizacijo membrane in posledično njen ukrivljanje, kar vodi v olajšan vstop delcev v celico po endocitotski poti.

Spremenjen površinski naboj nanodelcev vpliva tudi na drugačno tvorbo agregatov. V suspenzijah nanodelci tvorijo aggregate v bližini izoelektrične točke. Izoelektrična točka je vrednost pH, pri kateri je površinski naboj delcev v suspenziji enak nič in ti agregirajo zaradi Van der Waalsovih interakcij. Kadar je pH medija različen od izoelektrične točke nanodelcev, jih površinski naboj odbija, zato ne agregirajo. Na agregacijo pa vplivajo tudi nekateri drugi abiotiski dejavniki medija, npr. ionska jakost in prisotnost organskih molekul (Valant, 2010).

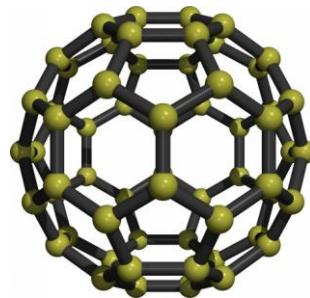
Za uporabo v biomedicini morajo biti nanodelci predhodno obdelani s snovmi, ki jih naredijo stabilne, biološko razgradljive in nestrupe v fizioloških pogojih (Sadeghiani in sod., 2005). Za medicinske namene se navadno uporabljajo v obliki suspenzij v fiziološkem mediju na vodni osnovi. Nanodelci morajo ostati dispergirani v mediju tudi ob večjih spremembah v svojem okolju, kot so npr. spremembe v ionski moči in pH-vrednosti medija (Čampelj in sod., 2006). Pogosto uporabljeni materiali za povečanje kemične stabilnosti suspenzije nanodelcev in preprečitev aglomeracije so dekstran, škrob, albumin, silikoni in polietilen glikol (Babes in sod., 1999; Lacava in sod, 2001), Kamruzzaman-Selim in sod. (2007) pa so kot tovrstno snov uporabili laktobionsko kislino. Eden od načinov za preprečitev aglomeracije nanodelcev je priprava stabilne suspenzije z vezavo citronske kisline na površino delca. Kislina, vezana na površini, sterično preprečuje aglomeracijo nanodelcev, hkrati pa zagotovi na njihovi površini visok naboj, ki prispeva k elektrostatski stabilizaciji suspenzije (elektrosteričena stabilizacija) (Čampelj in sod., 2006).

2.6.3 Fulereni (C₆₀)

Lastnosti fulerenov, kot so majhna velikost (okoli 7 Å; Kroto in sod., 1985), hidrofobnost, tridimenzionalna oblika oz. sferična struktura in prazna notranjost, ustvarijo idealne delce za uporabo v medicini (Farré in sod., 2010). Zaradi svojih edinstvenih fotokemičnih, elektrokemičnih in fizikalnih lastnosti so zanimiv predmet proučevanja za uporabo v diagnostiki in za terapevtske namene zdravljenja raka, srčnih, pljučnih in krvnih bolezni. Že poznane možne biološke aplikacije nanodelcev C₆₀ so fotoinducirana encimska inhibicija (cistein in serin proteinaze), protivirusna aktivnost, cepitev DNK, prenos elektronov, ugotavljanje malignosti oziroma benignosti tumorjev in določanje območij metastaz (“imaging probe, imaging agent”), antioksidantska aktivnost ter kot prenašalci

zdravil (taksol). Zaradi sposobnosti absorbcije UV- in vidne svetlobe pa imajo močan potencial za povzročitev fotodinamične škode na bioloških sistemih (Jensen in sod., 1996; Partha in Conyers, 2009).

Površina najstabilnejše in najpogosteje molekule C₆₀ je sestavljena iz 60 ogljikovih atomov, oblikuje 60 linij in 32 ploskev, od tega jih je 12 pentagonalne in 20 heksagonalne oblike (Kroto in sod., 1985). C₅-C₅ enojne vezi oblikujejo petkotnike, C₅-C₆ dvojne vezi pa ustvarijo heksagonalno obliko (Partha in Conyers, 2009). Vseh 60 ogljikovih atomov pa predstavlja mesto za vezavo različnih kemijskih spojin (slika 4).



Slika 4: Shematski prikaz molekule C₆₀.

Točke predstavljajo ogljikove atome, linije pa enojne in dvojne vezi med atomi.

Zaradi svoje hidrofobne sestave se kopičijo v lipidnih strukturah, torej v celični membrani. V vodnih raztopinah so slabo topni in imajo močno tendenco tvorbe agregatov, velikih od nekaj 10 do nekaj 100 nanometrov in več (Sivaraman in sod., 1992; Ruoff in sod., 1993; Crane in sod., 2008). To bi zmanjšalo njihov potencial biološke uporabnosti, vendar so odkrili mnoge kemijske in supramolekularne pristope, s katerimi je mogoče izboljšati funkcionalnost fulerenov (Jensen in sod., 1996; Da Ros in sod., 1999; Wilson in sod., 2000). Z uporabo različnih topil, z intenzivnim mešanjem ali s sonikacijo aggregate ločimo, da se oblikujejo manjši skupki nanodelcev (Crane in sod., 2008; Spohn in sod., 2009). Ravnotežje med želenimi terapevtskimi učinki in potencialnimi toksičnimi efekti pa se lahko vzpostavi tudi z biokompatibilnimi ovoji na molekulah, ki funkcionalizirajo fulerene (Jensen in sod., 1996; Da Ros in sod., 1999; Wilson in sod., 2000) in s tem zelo povečajo njihovo topnost v polarnih topilih (Partha in Conyers, 2009).

Oberdörster (2004) navaja, da so fulereni hkrati zelo učinkoviti usmerjeni prenašalci zdravil, po drugi strani pa lahko zaradi svojega redoks potenciala poškodujejo lipidne membrane. Mnoge študije *in vivo* ter *in vitro* so pokazale, da fulereni povzročajo oksidativni stres, ki se najverjetneje pojavi zaradi lipidne peroksidacije, ki jo povzroči delovanje prostih kisikovih zvrsti, katerih nastanek katalizirajo fulereni (Oberdörster, 2004; Sayes, 2007). Ti rezultati so v nasprotju z nekaterimi drugimi študijami (Gharbi in sod., 2005), ki ugotavljajo pozitivni vpliv fulerenov na biološke sisteme. Merili so vpliv C₆₀ na podganje ledvice po izpostavitvi *in vivo* in ugotovili, da so fulereni preprečili delovanje prostih radikalov na tkivo ledvic.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MIKROSKOPSKE METODE

3.1.1 Faznokontrastna mikroskopija in GUVi

3.1.1.1 Priprava veziklov in preparatov za mikroskopijo

Orjaške unilamelarne fosfolipidne vezikle smo pripravili z elektroformacijo iz POPC (1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3 fosfatidilholin) in holesterola (vsi lipidi kupljeni pri Avanti Polar Lipids Inc.) pri sobni temperaturi. Uporabljeni lipidi so bili raztopljeni v mešanici kloroforma in metanola s koncentracijo 1 mg/mL. Pripravili smo mešanico POPC-lipidov in holesterola (v volumskem razmerju POPC : holesterol = 4 : 1) in jo nanesli na par platinastih elektrod. Elektrodi z nanešenimi lipidi smo dve uri pustili v vakuumu, da je topilo izhlapelo, nato smo ju postavili v celico (dvomililitrska mikrocentrifugirka z navojem), napolnjeno z 0,3 M raztopino saharoze. Elektrodi smo za 2 uri priključili na izmenično električno polje z amplitudo 5V/mm in frekvenco 10 Hz. Nato smo amplitudo in frekvenco električne napetosti v 15-minutnih intervalih postopoma zmanjševali najprej na 2,5 V/mm in 5 Hz, nato na 2,5 V/mm in 2,5 Hz, ter na 1 V/mm in 1 Hz. Nastale vezikle smo obdali z ekvimolarno raztopino glukoze (povzeto po: Iglič in sod., 2003).

Na vsako objektno stekelce smo odmerili 45 µL suspenzije veziklov. Na dva robova krovnega stekelca smo nanesli silikonski gel, ki je služil za razmik med krovnim in objektnim stekelcem. Dodali smo kapljico 5 µL-testne raztopine (nanodelci C₆₀, CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA) in z gelom napolnili preostala dva robova krovnega stekelca; s tem smo preprečili morebitno evaporacijo vzorca. V primeru kontrole smo namesto suspenzije nanodelcev nanesli raztopino glukoze.

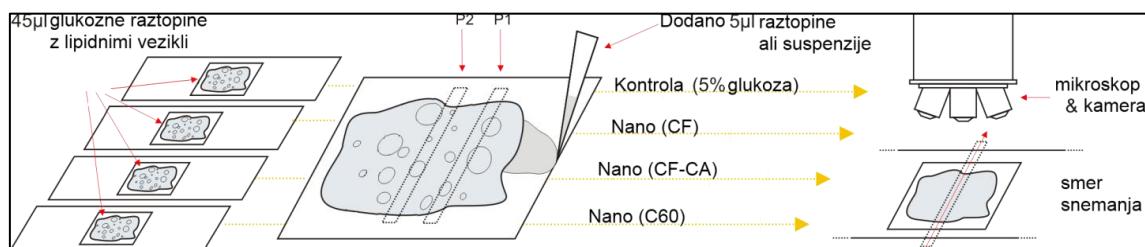
3.1.1.2 Priprava suspenzij nanodelcev in raztopin

Pripravili smo 0,3 M-raztopino saharoze v deionizirani vodi. Uporabili smo že pripravljeno 5% raztopino glukoze za intravenozno uporabo (glukozna raztopina za intravenozno infuzijo, Krka).

Pod vodstvom dr. Darka Makovca so nam na Inštitutu Jožefa Štefana (IJS) pripravili suspenzije kobaltovo-feritnih nanodelcev v fiziološki raztopini s koncentracijo 5 mg/mL in fulrenov s koncentracijo 1mg/mL.

3.1.1.3 Postavitev eksperimenta in zajem mikroskopskih videoposnetkov

Na vsakem izdelanem mikroskopskem preparatu smo izbrali dva pasova zajema videoposnetkov: P1 in P2 (slika 5), pri čemer je pas 1 bližje mestu nanosa testne suspenzije nanodelcev ali kontrolne raztopine in tako je koncentracija testne substance na mestu P1 višja. S tem smo lahko opazovali dinamiko spremnjanja veziklov v koncentracijskem gradientu. Širina vsakega videoposnetka je sovpadala s širino vidnega polja mikroskopa pri 400-kratni povečavi, to je 190 µm. Zajem posameznega posnetka s kamero smo izvedli s sistematičnim premikanjem objektnega stekla od enega do drugega roba. Videoposnetke smo izvedli takoj po nanosu testne suspenzije nanodelcev ali raztopine glukoze (0 minut) in po 90 minutah. Uporabili smo faznokontrastni mikroskop (Nikon Eclipse TE2000-S), priključen na videokamerico CCD, model XC -77 CE, Sony. Poskuse s fulereni in kobaltovo-feritnimi nanodelci smo izvedli v dveh ločenih eksperimentih (eksperiment št.6 in št.7).



Slika 5: Priprava preparatov in zajem videoposnetkov s svetlobnim faznokontrastnim mikroskopom.

Shema ni v merilu. Z dovoljenjem prizerno po: A new approach to analyze effect of nanoparticles on lipid vesicles (Zupanc in sod., 2010: 5).

3.1.1.4 Analiza posnetkov in statistična obdelava podatkov

V sodelovanju s strokovnjaki s področja računalništva in informatike (Zupanc in sod., 2010) smo analizirali spremembe populacije veziklov, inkubiranih v suspenziji nanodelcev, v primerjavi s kontrolno skupino veziklov. Izbrali smo posnetke kontrol obeh eksperimentov, in sicer takoj po dodatku glukoze in po 90 minutah, ter vzorce nanodelcev,

C₆₀, CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA po 90 minutah po dodatku suspenzije nanodelcev. Videoposnetke, pretvorjene v mozaike slik, smo nato ročno segmentirali. Vsakemu veziklu smo pripisali določeno stopnjo transformacije oblike vezikla in s pomočjo računalniškega programa analizirali povprečni premer veziklov, skupno število nesferičnih oblik veziklov in število veziklov z obliko verižice.

S Kolmogorov-Smirnovim tesom za dva vzorca (Massey, 1951) smo izračunali statistično značilne razlike v distribuciji povprečnih premerov sferičnih veziklov vseh testnih skupin v primerjavi s kontrolno skupino (po 0 minutah).

3.1.2 Fluorescenčna mikroskopija in določanje destabilizacije plazemske membrane z metodo AO/EB

Metodo diferencialnega barvanja smo izvedli s poskusom semi *in vitro* z izoliranim organom ter *in vivo* z oralno izpostavitvijo nanodelcem. Pri obeh poskusih smo analizirali integriteto celic prebavne žleze (hepatopankreas) modelnega nevretenčarskega organizma (Isopoda).

3.1.2.1 Izpostavitve nanodelcem (C₆₀, CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA) *in vivo* ter določanje permeabilnosti celičnih membran

V predelani metodi AO/EB (akridin oranž/etidijev bromid) (Valant, 2010) smo modelni organizem *P. scaber* oralno izpostavili raztopini mešanice nanodelcev in flurescenčnih barvil. Prebavna žleza je bila v direktnem kontaktu z nanodelci.

3.1.2.1.1 Priprava suspenzij nanodelcev in raztopin

Na IJS nam je raziskovalna skupina pod vodstvom dr. Darka Makovca pripravila suspenzije nanodelcev v fiziološki raztopini s koncentracijo suspenzije fulerenov 1 mg/mL, 20 mg/mL CoFe₂O₄ (kobaltov ferit; v nevtralnem pH brez naboja) in 90 mg/mL CF-CA (kobaltov ferit z vezano citronsko kislino; v nevtralnem pH z negativnim nabojem). Vse kemikalije (AO/EB in detergente) smo raztopljalili v fiziološki raztopini za *P. scaber* : 248 mM NaCl, 8 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 5 mM glukoza in 10 mM Tris v bidistilirani vodi (Hagedorn in Ziegler, 2002; Valant, 2010). Suspenzije nanodelcev smo pred pripravo mešanice z barvili redčili s fiziološko raztopino za *P. scaber* na koncentracijo 1mg/mL.

Za poskus smo pripravili založno raztopino 1 mg/mL fluorescenčnih barvil AO in EB. Pripravili smo mešanico obeh barvil ter nanodelcev oz. saponina (detergent; pozitivna kontrola) ali fiziološke raztopine (negativna kontrola) v volumskem razmerju barvili : učinkovina = 2 : 3. Po redčenju z barvili so bile nanešene končne koncentracije nanodelcev 600 µg/mL.

Pred izvedbo poskusa smo naredili tudi pozitivno kontrolo z detergentom. Pripravili smo raztopino saponina (100mg/mL) v fiziološki raztopini.

3.1.2.1.2 Izvedba poskusa

Testnim živalim (*P. scaber*) smo na usta nanesli mešanico barvil (AO/EB) in nanodelcev, za vsak tip delcev smo poskus ponovili na šestih živalih. Šestim testnim živalim iz kontrolne skupine pa smo na usta nanesli mešanico AO/EB in fiziološke raztopine za *P. scaber*. Pred nanosom smo živali stehtali, na usta pa smo nanesli 1/10 volumna raztopine (v µL) teže živali (v mg), kar pomeni npr. 50 mg težkemu izopodu smo ob vsakem nanosu odmerili 5 µL raztopine. Raztopino smo nanesli trikrat z deset-minutnimi presledki. Deset minut po zadnjem nanosu smo opravili sekcijsko in izolacijo prebavnih žlez. Posamezne cevke hepatopankreasa smo previdno položili v kapljico fiziološke raztopine na objektnem stekelcu in jih pokrili s krovnim steklom. Sveže preparate smo pregledali s fluorescenčnim mikroskopom (Zeiss Axioimager.Z1) in jih fotografirali. Z uporabo ekscitacijskega filtra 450–490 nm in zapornega filtra 515 nm (filter set 09) smo videli jedra, obarvana z AO in EB, z uporabo ekscitacijskega filtra 365 nm in zapornega filtra 397 (filter set 01) pa jedra, obarvana samo z EB (Valant, 2010).

3.1.2.1.3 Ocena stopnje permeabilizacije celičnih membran in statistična analiza

Fotografije prebavnih žlez smo pregledali dvakrat v časovnem intervalu vsaj štiriindvajsetih ur. Stabilnost celičnih membran smo ocenili glede na količino jeder, obarvanih z EB. Kadar celice prebavnih žlez niso imele jeder, obarvanih z EB (ali pa je bil ta delež zelo nizek $\leq 5\%$), smo permeabiliziranost celičnih membran ocenili z 1. Kadar so bila vsa jedra celic prebavnih žlez obarvana z EB, smo permeabiliziranost celičnih membran ocenili z 9. Vmesne stopnje permeabilizacije (2–8) smo prilagodili deležu jeder, obarvanih z EB. Za določanje statističnih razlik med posameznimi skupinami smo

uporabili Mann-Whitney test (program Statgraphics Plus 4.0 za Windows), pri stopnji tveganja $\alpha = 0,05$ oziroma $\alpha = 0,01$. Vrednosti, ki kažejo na statistično značilne razlike, so tiste, ko so manjše ali od 0,05 ali od 0,01.

3.1.2.2 Izpostavitve nanodelcem CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄ – CA semi *in vitro* ter določanje permeabilnosti celičnih membran

3.1.2.2.1 Priprava suspenzij nanodelcev in raztopin

Uporabili smo enake suspenzije kobaltovo-feritnih nanodelcev (CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA) in založne raztopine barvil AO/EB (s koncentracijo 1 mg/mL) kot je opisano v poskusu *in vivo* (3.1.2.1). Uporabili smo naslednje koncentracije nanodelcev: 0 (kontrola); 0,1; 1; 10; 100; 1000 µg/mL. Vse nanodelce smo redčili v fiziološki raztopini za *P. scaber* (Valant, 2010).

3.1.2.2.2 Izvedba poskusa

Opravili smo sekcijo testne živali (*P. scaber*) in izolirali prebavne žleze. Hepatopankreas smo ločili na posamezne cevke in te inkubirali v suspenzijah nevtralnih (CoFe₂O₄) in negativno (CoFe₂O₄ – CA) nabitih kobaltovo-feritnih nanodelcev. Po 18-urni inkubaciji smo žleze za pet minut namočili v mešanico barvil AO/EB ter naredili preparat za mikroskopijo. Stopnjo permeabiliziranosti celičnih membran smo ovrednotili po postopku, opisanem v poglavju 3.1.2.1.3. V enem poskusu smo naredili dve seriji koncentracij za oba tipa nanodelcev in tako naenkrat pri vsaki skupini inkubirali 12 cevk prebavne žleze. S CoFe₂O₄) smo poskus ponovili 4-krat, s CoFe₂O₄-CA pa nam je iz dveh ponovitev poskusa uspelo pridobiti 5 popolnih serij in dve dodatni kontrolni skupini.

3.2 ANALITSKA METODA SIPANJA X-ŽARKOV SAXS

Poskuse smo izvedli v sodelovanju z dr. Michaelom Rappoltom na avstrijski eksperimentalni postaji SAXS ('Austrian SAXS beamline') (Amenitsch in sod., 1998, Bernstorff in sod., 1998) na 'Sincrotrone Trieste', ELETTRA.

3.2.1 Priprava suspenzij veziklov in nanodelcev

Pripravili smo tri vzorce multilamelarnih veziklov, in sicer dve disperziji POPC-veziklov, izpostavljeni nanodelcem CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA (v citronski kislini) in kontrolo (čista disperzija lipidov POPC).

3.2.1.1 Priprava multilamelarnih veziklov

V mikrocentrifugirko smo natehtali 12,5 mg POPC-lipidov (kupljenih pri Avanti Polar Lipids Inc.) v prahu in dodali 100 µL destilirane vode, kar ustreza 10 % masnega deleža lipidov v vodi. Vzorec smo eno uro pustili na sobni temperaturi in nato 5–10-krat dobro premešali na vorteksu (od 1 do 2 minuti). Pri obeh vzorcih z nanodelci smo vzorec pripravili po enakem postopku, le da smo zmesi lipidov in destilirane vode dodali 100 µL suspenzije nanodelcev CoFe₂O₄ ali Co Fe₂O₄-CA v 5% glukozi s koncentracijo 1mg/mL. Vse mikrocentrifugirke z vzorci smo, preden smo jih ovili s parafilmom, prepihalo s tekočim dušikom.

Uporabili smo suspenzije kobaltovo-feritnih nanodelcev (CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA) s koncentracijo 5mg/mL, pripravljene na IJS pod vodstvom dr. Darka Makovca.

3.2.2 Meritve SAXS

Kamera za detekcijo sisanja X-žarkov pod majhnim in večjim kotom (SWAXS) je opremljena s t.i. kolimacijo Kratky (Laggner in Mio, 1992; SWAXS, Hecus X-ray Systems GmbH, Graz, Austria) in montirana na t.i. "sealed-tube" generator (Philips PW 1729, Philips, Holland), ki funkcioniра pri 2kW. Z volframovim selektorjem valovne dolžine svetlobe je bila izbrana bakrova radiacija valovne dolžine $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ (radiacija Cu-K_a). Linerani enodimensionalni detektor (PSD 50-M, Hecus X-ray Systems GmbH, Graz, Austria), občutljiv na lokacijo sipane svetlobe, pokriva spremenljivko q ($q = 4\pi \sin\theta/\lambda$, λ je valovna dolžina, 2θ je kot sisanja) od 0,02 do 0,6 Å⁻¹. Srebrov behenat, to je srebrova sol z dolgoverižno karboksilno kislino (CH₃-(CH₂)₂₀-COOAg), oblikuje lamelarne strukture popolnoma brez vmesne plasti vode (z vrednostjo $d = 58,38 \text{ \AA}$). Srebrov behenat je difrakcijski standard, ki se uporablja za kalibracijo skale kotov izmerjene intenzitete (Huang in sod., 1993).

Za izvedbo meritev smo vzorec s suspenzijo multilamelarnih POPC-veziklov in kobaltovo-feritnih nanodelcev nanesli v 1,0 mm stekleno kapilaro. Meritve smo izvajali pri sobni temperaturi. Čas izpostavitve vzorca je bil določen na 1 uro. Od dobljenih rezultatov smo odšteli sisanje svetlobe, nastalo zaradi vode in materialov kapilare.

3.3 POVRŠINSKA PLAZMONSKA RESONANCA

Metodo površinske plazmonske resonance (SPR) smo izvedli v sodelovanju s katedro za biokemijo pod vodstvom prof. dr. Gregorja Anderluha. V okviru Infrastrukturnega centra za površinsko plazmonsko resonanco smo meritve opravili na refraktometru Biacore X s pomočjo operaterke te naprave.

3.3.1 Priprava veziklov in suspenzij nanodelcev

POPC-lipide v prahu smo vzeli iz zamrzovalne skrinje, kjer so bili shranjeni na – 80° C, in jih vsaj 10 minut pustili na sobni temperaturi (približno 22° C). V stekleno posodico z navojnim pokrovom in teflonskim vložkom smo natehtali od 10 do 20 mg lipidov v prahu. Dodali smo tako količino topil (v razmerju kloroform : metanol = 3 : 1), da smo dosegli končno koncentracijo lipidov 100 mg/mL. Stekleničko smo priključili na rotavapor za 4 ure, nato nežno prepihalo z dušikom, stekleničko zatesnili s parafilmom in do uporabe shranili na – 20° C.

3.3.1.1 Priprava velikih unilamelarnih veziklov

Pred izvedbo poskusa na Biacore X smo v stekleno posodico z raztopljenimi POPC-lipidi v mešanici kloroforma in metanola odmerili ustrezno količino pufra za lipide (za 5 mg POPC smo odpipetirali 1 mL pufra) in steklena zrnca ter vse skupaj dobro premešali na vorteksu. Suspenzijo lipidov smo iz steklene posodice prestavili v stekleno posodico, odporno na zamrzovanje (kriovialka). Izvedli smo 6 ciklov taljenja (3 minute v topli kopeli) in zamrzovanja v tekočem dušiku (10 sekund). Nastali multilamelarni vezikli so se preoblikovali v velike unilamelarne vezikle (LUV-e) z izrivanjem (ekstruzijo) skozi 100 nm polikarbonatne membrane, zadostovalo naj bi 30 prehodov skozi membrano. Tako nastali veliki unilamelarni vezikli so imeli povprečno velikost premera 100 nm.

Koncentracijo lipidov v vzorcu smo določili z encimatskim kolorimetričnim testom. LUV-e smo do začetka dela na refraktometru Biacore X shranili na 4° C.

Kot delovni pufer smo uporabili mešanico 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 7,4), precejen skozi filter z 0,22µm porami. Suspenzije nanodelcev C₆₀ (s koncentracijo 1 mg/mL), CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA (oboje s koncentracijo 5 mg/mL) so bile na IJS pod vodstvom dr. Darka Makovca pripravljene v 20 mM TRIS in 150 mM NaCl pufru. Suspenzije nanodelcev C₆₀, CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA smo redčili na koncentracije 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL in 125 µg/mL v delovnem pufru.

Poskus smo izvedli s filtriranimi suspenzijami nanodelcev skozi enak filter.

3.3.2 Delo z aparatom Biacore X

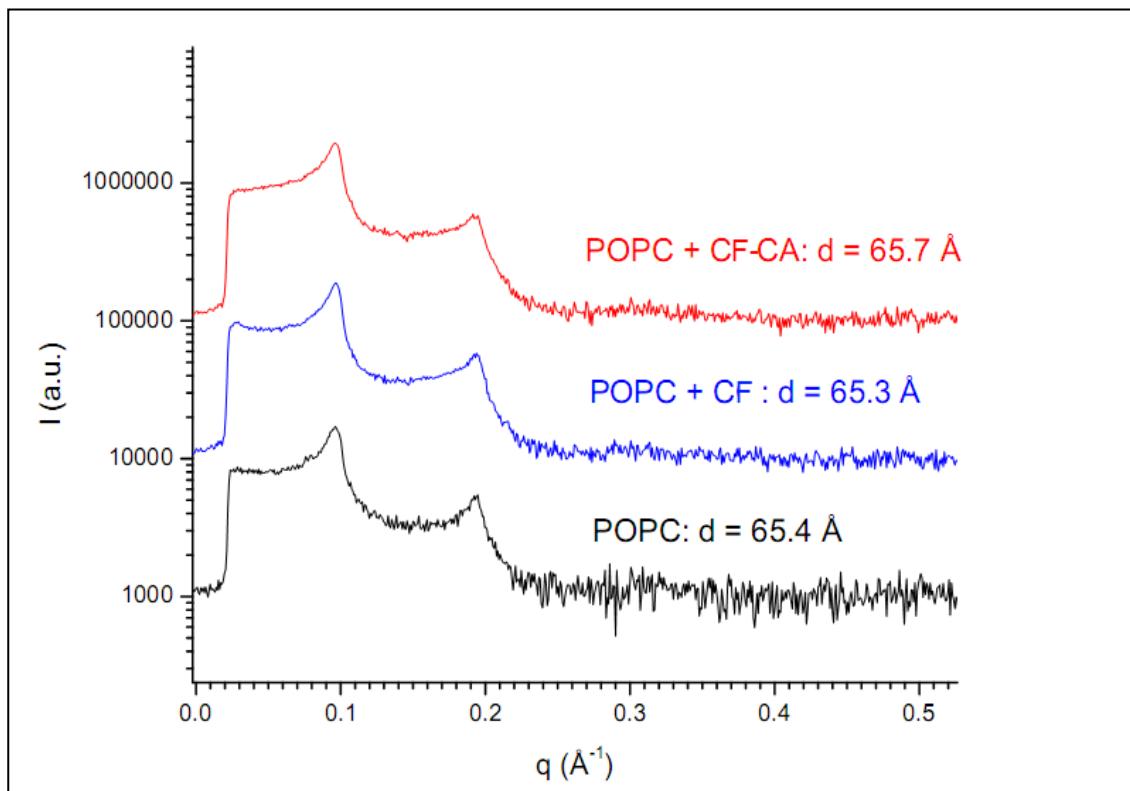
Delo na aparatu Biacore X smo izvajali po postopku, opisanem v Pravilih za delo z aparatom Biacore X (<http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/Uporabno.html>). Na senzorski čip tipa Biacore L1 smo nanesli suspenzijo velikih unilamelarnih veziklov v pufru s koncentracijo lipidov 1 mg/mL. Ločeno smo nanesli suspenzije nanodelcev, najprej vse s koncentracijo 1 mg/mL, nato pa še s prefiltriranimi suspenzijami nanodelcev s koncentracijo 0,2 mg/mL.

Izvedli smo tudi poskus vezave nanodelcev na desktranski matriks brez prisotnosti lipidnih veziklov. Injicirali smo suspenzije nanodelcev C₆₀, CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA s koncentracijami 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL in 125 µg/mL.

4 REZULTATI

4.1 STRUKTURNE SPREMEMBE LIPIDNIH VEZIKLOV PO INKUBACII Z NANODELCI

4.1.1 SAXS



Slika 6: Intenziteta sisanja svetlobe iz treh vzorcev kot funkcije sipalnega vektorja q .

Legenda: $q = 2 \pi/s$; $s = 1/d$; d = razdalja od sredine enega do sredine drugega lipidnega dvosloja.

Slika 6 prikazuje intenziteto sisanja svetlobe iz naših vzorcev v odvisnosti od sipalnega vektorja. Krivulja na sliki predstavlja vzorce sisanja multilamelarnih veziklov POPC in veziklov POPC, pripravljenih z nanodelci: POPC + CF (nevtralni CoFe₂O₄) in POPC + CF-CA (negativno nabiti CoFe₂O₄-CA; z vezano citronsko kislino). Na horizontalni osi so vrednosti sipalnega vektorja q ($q = 2 \pi/d$), vertikalna os pa predstavlja intenziteto sisanja svetlobe iz vzorca. Vsi trije vzorci sisanja, to so kontrola (POPC; na sliki 6 označeno s črno barvo) in multilamelarni vezikli POPC z nevtralnimi (POPC + CF; na sliki 6 modre barve) in negativno nabitim nanodelci (POPC + CF-CA; na sliki 6 rdeče barve), so videti zelo podobno. Iz enakih oblik krivulj na sliki 6 je razvidno, da multilamelarni vezikli, tudi pripravljeni z nanodelci, ostanejo intaktni. Razdalja 'd' ostane enaka oziroma vrednosti

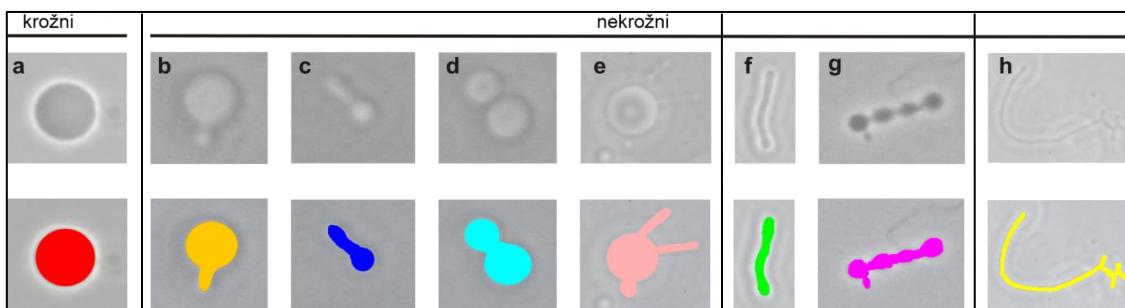
ostanejo znotraj napake. Povprečna razdalja ($d = 65,5 \text{ \AA}$) ustreza debelini membrane s prišteto vmesno plastjo vode.

Iz slike 6 je razvidno, da osrednja širina difrakcijskih vrhov vseh treh vzorcev ostane nespremenjena, torej nanodelci niso vplivali na število dvoslojev v multilamelarnih veziklih.

Intenziteta prvega vrha v razmerju do drugega (na točkah $q_1 = 0.095$ in $q_2 = 0.190 \text{ \AA}^{-1}$) ostane enaka pri vseh treh vzorcih, torej se debelina dvoslojev in hidracija vzorca po dodatku suspenzije nanodelcev nista spremenili.

4.1.2 Svetlobna faznokontrastna mikroskopija in GUV

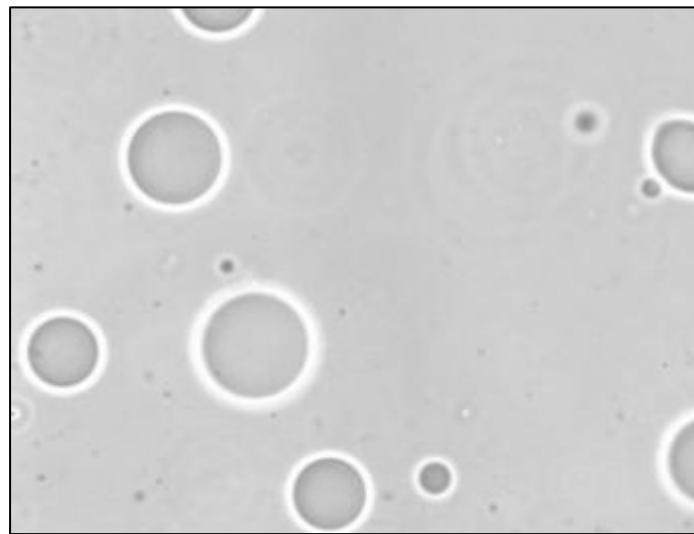
Ocenili smo, da je več kot 90 % vseh veziklov sferičnih (slika 7-a), drugi pa so v različnih fazah transformacije oblike veziklov z brstom (slike 7-b, 7-c, 7-d, 7-e), ali pa drugi tipi nesferičnih oblik (slike 7-f, 7-g, 7-h).



Slika 7: Oblike veziklov pri eksperimentu.

a – sferični vezikel; b, c, d in e so različne transformacije oblike vezikla z brstom (b – dva sferična vezikla različne velikosti, c – kij ali ročka, d – dva sferična vezikla približno enake velikosti, e – sferični vezikel s tubo ali verižico), f – vezikel tubaste oblike, g – verižica, h – tuba z izrastki (avtor slike: Jernej Zupanc).

Slika 7-a prikazuje sferični vezikel, ki je najpogostejsa izvorna oblika veziklov. Oblike veziklov na slikah 7-b, 7-c, 7-d in 7-e so različne stopnje transformacije oblike vezikla z brstom. Slika 7-f predstavlja vezikel tubaste oblike. Na sliki 7-g je prikazan prolatni (potegnjeni) vezikel z obliko verižice, ki je videti kot niz povezanih majhnih sferičnih veziklov enake velikosti. Slika 7-h pa prikazuje tanko tubularno oblikovano strukturo z izrastki, nastali kot posledica elektroformacije lipidnih veziklov v sladkorni raztopini.

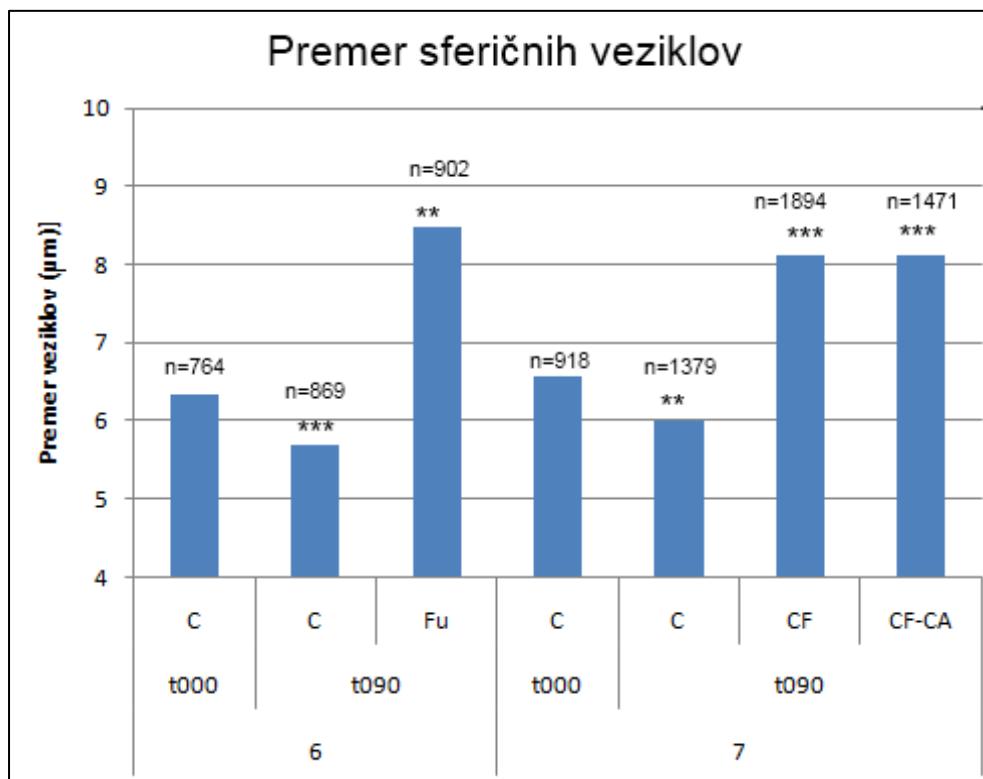


Slika 8: Primer posnetka kontrolne skupine veziklov.

Slika 8 prikazuje primer posnetka kontrolne skupine veziklov (brez dodatka suspenzije nanodelcev) po 90-minutni inkubaciji. Fotografija zajema območje vidnega polja pri 400-kratni povečavi. Okoli vsakega vezikla se ustvari t.i. 'halo efekt', to je bel obroč okoli roba vezikla, ki je nastal zaradi različne optične gostote vsebine vezikla in okoliške raztopine.

Med skupinami veziklov, inkubiranih v suspenzijah CoFe₂O₄, CoFe₂O₄-CA in C₆₀ smo opazili značilne razlike v povprečnem premeru sferičnih veziklov. Ugotovili smo majhne razlike v številu nesferičnih oblik veziklov in v številu veziklov v obliku verižice. Opazili smo tudi razlike med proučevanimi nanodelci.

Skupno število vseh opazovanih veziklov v eksperimentu št. 6 je bilo 2981, v eksperimentu št. 7 pa 6055.



Slika 9: Povprečni premer sferičnih veziklov (v μm).

Vrednosti so podane za vse skupine veziklov pri obeh eksperimentih: eksperiment 6 – fulereni (Fu); eksperiment 7 – kobaltovo-feritni nanodelci (CF in CF-CA). Pri kontrolnih veziklih brez dodatka nanodelcev so vrednosti prikazane pri času 0 in 90 minut, pri veziklih z dodanimi nanodelci pa le po 90 minutah. Statistično značilne razlike v primerjavi s kontrolno skupino (0 minut) so označene z zvezdicami (** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$). Število veziklov (n) v posameznih testnih skupinah je označeno nad stolpci.

Slika 9 prikazuje povprečni premer sferičnih veziklov (v μm) pri vseh skupinah veziklov. V eksperimentnu številko 6 smo kot suspenzijo nanodelcev uporabili fulerene, pri eksperimentnu številka 7 pa nevtralne kobaltovo-feritne nanodelce (CoFe₂O₄, na sliki 9 oznaka CF) in negativno nabite kobaltovo-feritne nanodelce z vezano citronsko kislino (CoFe₂O₄-CA, na sliki 9 oznaka CF-CA). Premer sferičnih veziklov v kontrolni populaciji se je po 90-minutni inkubaciji pri obeh eksperimentih statistično značilno zmanjšal. Pri veziklih, izpostavljenih fulerenom ter nevtralnim in negativno nabitim kobaltovo-feritnim nanodelcem, pa smo v obeh primerih dokazali statistično značilno povečanje premera veziklov.

Statistična analiza podatkov je pokazala razlike v premerih veziklov. Rezultati Kolmogorov-Smirnovega testa za dva vzorca (Massey, 1951) kažejo statistično značilne razlike med skupinami (eksperiment št. 6 v tabeli 1, eksperiment št. 7 v tabeli 2), ki so na sliki 9 in v preglednici 1 označene z naslednjimi simboli: ** p < 0,001, *** p < 0,0001.

Preglednica 1: Velikostna distribucija premera sferičnih veziklov (eksperiment št. 6, fulereni).

Trajanje [min]		0	90	90
	Skupina veziklov	C	C	Fu
0	C	=	***	**
90	C	***	=	***
	Fu	**	***	=

Legenda: C – kontrolna skupina; Fu – vezikli, inkubirani v suspenziji fulerenov.

Posamezne skupine so med seboj primerjane s Kolmogorov-Smirnovim testom za dva vzorca (Massey, 1951). Rezultati statističnega testa so ovrednoteni kot: = enako, ** p < 0,001, *** p < 0,0001.

Preglednica 2: Velikostna distribucija premera sferičnih veziklov (eksperiment št. 7, kobaltovo-feritni nanodelci).

Trajanje [min]		0	90		
	Skupina veziklov	C	C	CF	CF-CA
0	C	=	**	***	***
90	C	**	=	***	***
	CF	***	***	=	***
	CF-CA	***	***	***	=

Legenda: C – kontrolna skupina; CF – vezikli, inkubirani v suspenziji CoFe₂O₄; CF-CA - vezikli, inkubirani v suspenziji CoFe₂O₄-CA.

Posamezne skupine so med seboj primerjane s Kolmogorov-Smirnovim testom za dva vzorca (Massey, 1951). Rezultati statističnega testa so ovrednoteni kot: = enako, ** p < 0,001, *** p < 0,0001.

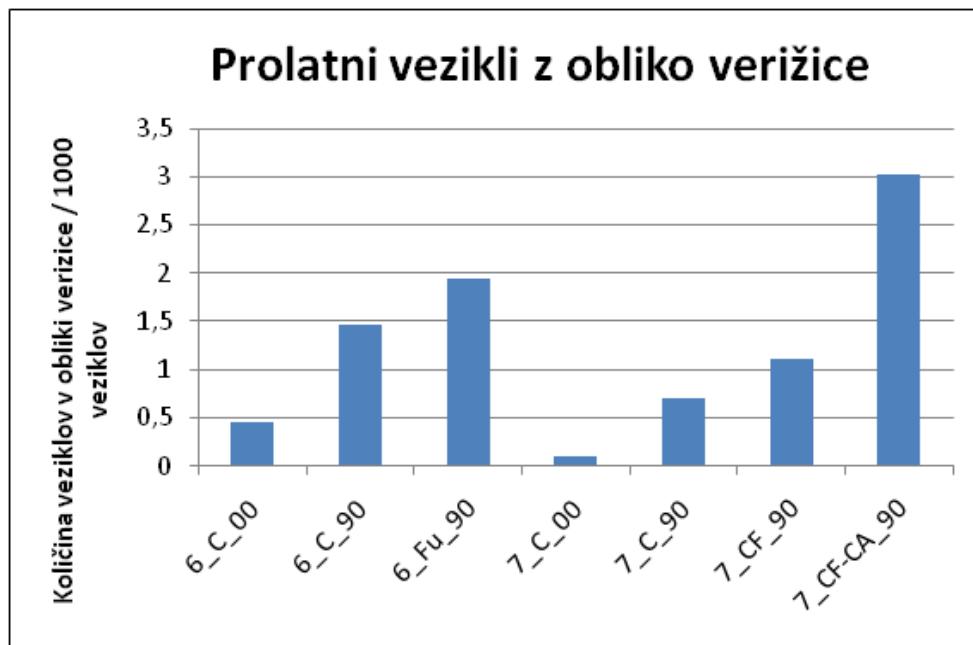


Slika 10: Količina nesferičnih veziklov.

Vrednosti so podane za vse skupine veziklov pri obeh eksperimentih: eksperiment št. 6 – fulereni (Fu); eksperiment 7 – kobaltovo-feritni nanodelci (CF in CF-CA) na 100 veziklov. Pri kontrolnih veziklih brez dodatka nanodelcev so vrednosti podane pri času 0 in 90 minut, pri veziklih z dodanimi nanodelci pa le po 90 minutah.

Slika 10 prikazuje količino nesferičnih oblik veziklov na 100 veziklov. Pri eksperimentu št. 6 smo po 90-minutni inkubaciji opazili povečevanje števila nesferičnih veziklov tako pri kontrolni skupini, kot tudi pri veziklih, inkubiranih v suspenziji fulerenov. Količina nesferičnih oblik veziklov takoj po dodatku raztopine glukoze (0 minut) je 12,28 na 100 veziklov, po 90-minutni inkubaciji pa 15,63. V skupini veziklov, inkubirani v suspenziji fulerenov, pa je izmed 100 veziklov po 90 minutah 16,48 nesferične oblike veziklov. Tudi pri eksperimentu št. 7 s kobaltovo-feritnimi nanodelci se kontrolni skupini (0 in 90 minut) razlikujeta med seboj in od skupine veziklov, inkubirane z nanodelci. V času 0 minut smo v kontrolni skupini opazili 4,79 nesferične oblike veziklov na 100 veziklov, po 90 minutah pa je količina nesferičnih oblik padla na 3,90. Skupina veziklov, tretirana z nevtralnimi kobaltovo-feritnimi delci (na sliki 10 oznaka CF), po 90 minutah vsebuje 7,70, z negativno nabitimi kobaltovo-feritnimi delci (na sliki 10 oznaka CF-CA) pa 8,18 nesferične oblike veziklov na 100 veziklov. Nesferični vezikli so predstavljeni od 5 do 15 % vseh veziklov v izpostavljenih populacijah.

Izmed nesferičnih oblik veziklov so najbolj opazne razlike v količini prolatnih veziklov z obliko verižice, tako med kontrolnimi skupinami in skupinami veziklov, tretiranimi z nanodelci, kot tudi med vsemi tremi skupinami nanodelcev.



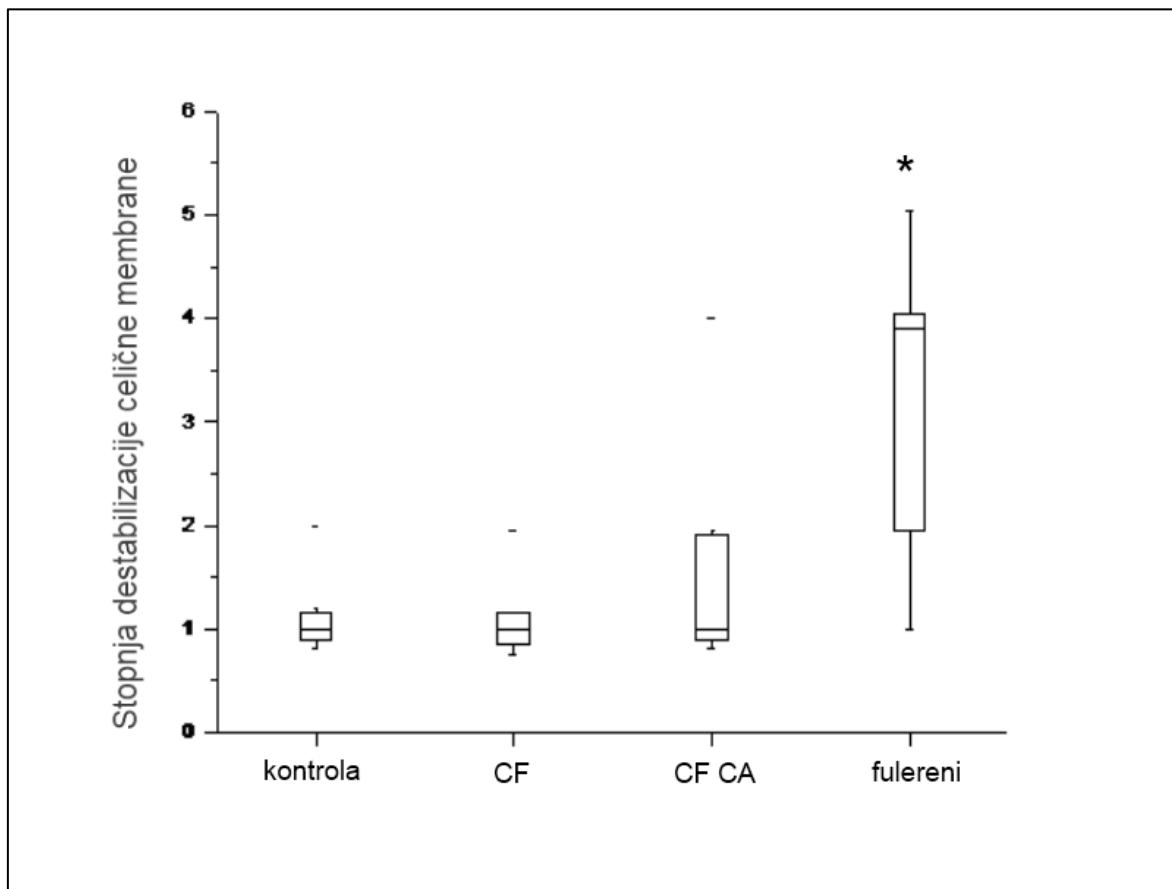
Slika 11: Količina prolatnih veziklov z obliko verižice.

Vrednosti so podane za vse skupine veziklov pri obeh eksperimentih: eksperiment št. 6 – fulereni (Fu); eksperiment 7 – kobaltovo-feritni nanodelci (CF in CF-CA) na 1000 veziklov. Pri kontrolnih veziklih brez dodatka nanodelcev so vrednosti podane pri času 0 in 90 minut, pri veziklih z dodanimi nanodelci pa le po 90 minutah.

Slika 11 prikazuje količino veziklov v obliku verižice na 1000 veziklov. Pri obeh eksperimentih (št. 6 in 7) opazimo trend povečevanja števila veziklov v obliku verižice po 90-minutni inkubaciji pri kontrolni skupini, še več pa pri skupinah z nanodelci. Pri kontrolni skupini eksperimenta št. 6 je takoj po dodatku raztopine glukoze (0 minut) na 1000 veziklov prisotnih 0,46 vezikla v obliku verižice, po 90 minutah pa 1,45. V skupini veziklov, tretirani s fulereni, pa se na 1000 veziklov pojavi 1,94 vezikla v obliku verižice. V eksperimentu št. 7 smo v kontrolni skupini po 0 minutah opazili 0,10, po 90 minutah pa 0,69 vezikla v obliku verižice na 1000 veziklov. Pri nevtralnih kobaltovo-feritnih nanodelcih smo opazili 1,11 verižice na 1000 veziklov, pri negativno nabitih kobaltovo-feritnih nanodelcev pa 3,02.

4.2 SPREMEMBE V PREPUSTNOSTI LIPIDNIH MEMBRAN PO INKUBACIJI Z NANODELCI

4.2.1 Izpostavitve nanodelcem (C_{60} , $CoFe_2O_4$ in $CoFe_2O_4$ -CA) *in vivo* ter določanje stabilnosti celičnih membran

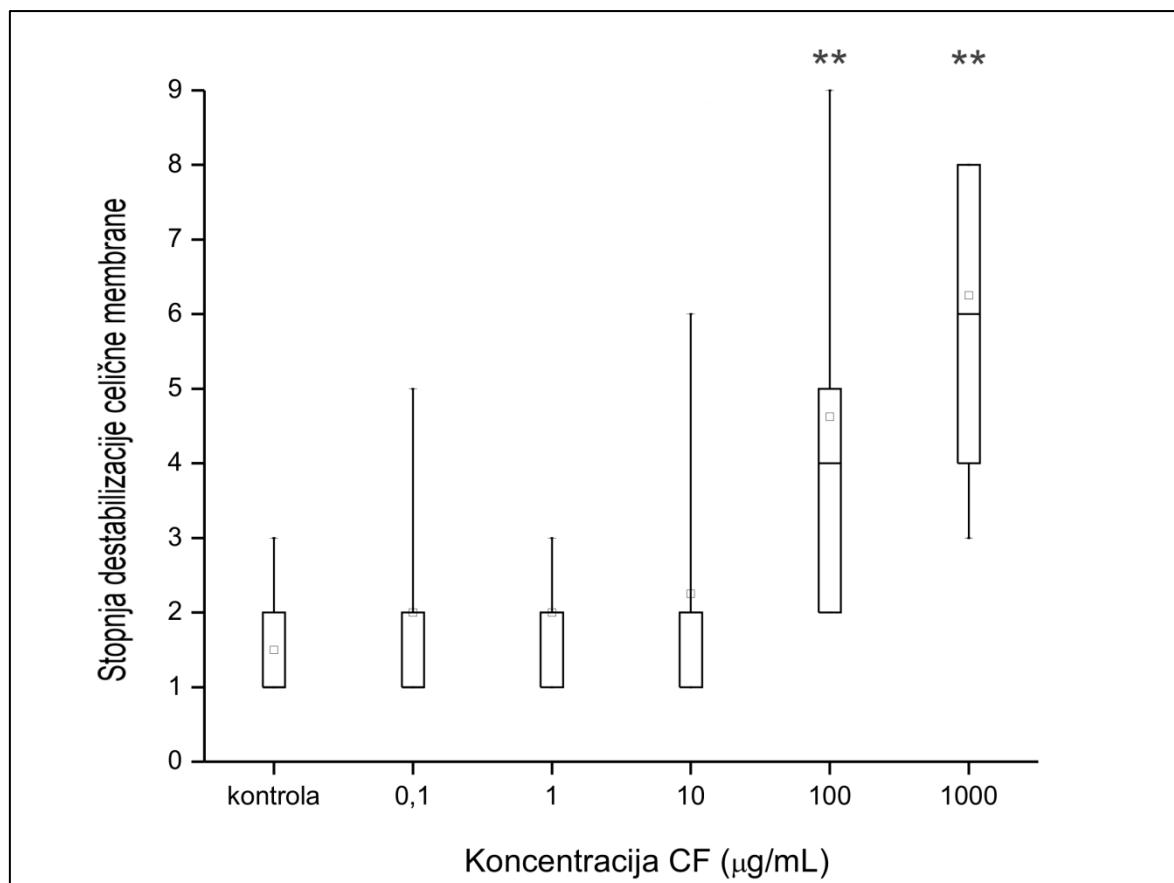


Slika 12: Stopnja destabilizacije celičnih membran po oralni izpostavitvi nanodelcem.

Statistično značilne razlike ($p < 0,05 *$) so prisotne le pri fulerenih. V vsaki skupini (kontrola, CF, CF-CA in fulereni) je bilo testni substanci izpostavljenih 10 živali ($n = 10$), 10 pa jih je bilo tudi v kontrolni skupini.

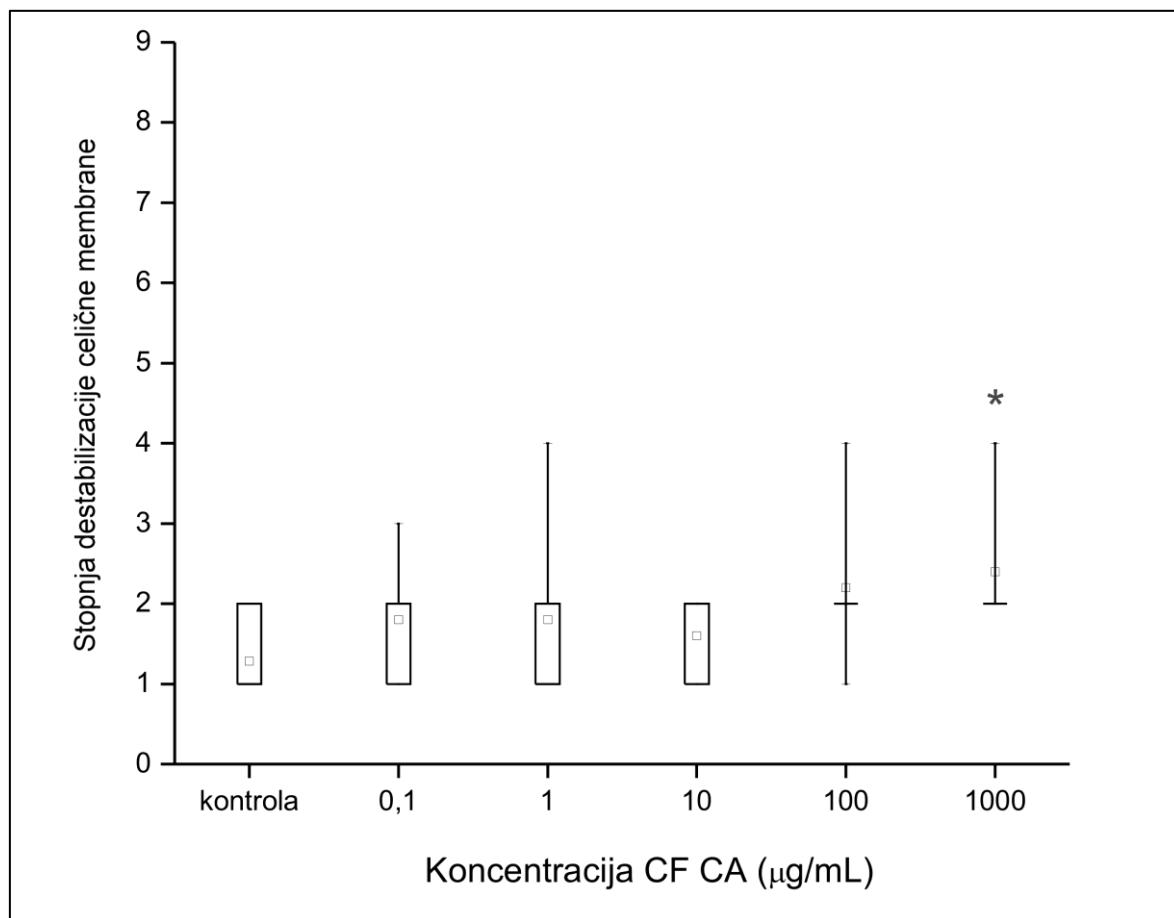
Slika 12 prikazuje stopnjo destabilizacije celičnih membran hepatopankreasa pri modelnem organizmu po oralni izpostavitvi različnim tipom nanodelcev (v mešanici z AO/EB) ter v primeru kontrole mešanici AO/EB in fiziološke raztopine. Statistično značilne razlike destabilizacije membran so opazne le pri fulerenih, drugi nanodelci pa v primerjavi s kontrolo ne kažejo značilnih razlik v destabilizaciji celičnih membran. Preglednica podatkov za vrednotenje stopnje destabilizacije membrane je v prilogi A1.

4.2.2 Izpostavitev nanodelcem CoFe₂O₄ in CoFe₂O₄-CA semi *in vitro* ter določanje stabilnosti celičnih membran



Slika 13: Stopnje destabilizacije celičnih membran po izpostavitvi nanodelcem CoFe₂O₄ (CF) semi *in vitro*.

Statistično značilne razlike ($p < 0,01$ **) so prisotne pri koncentracijah 100 in 1000 $\mu\text{g/mL}$. Vsaki koncentraciji nevtralnih kobaltovo-feritnih nanodelcev (CF) je bilo izpostavljenih 8 živali ($n = 8$), 8 jih je bilo tudi v kontrolni skupini.



Slika 14: Stopnje destabilizacije celičnih membran po izpostavitvi nanodelcem $CoFe_2O_4$ -CA (CF-CA) semi *in vitro*.

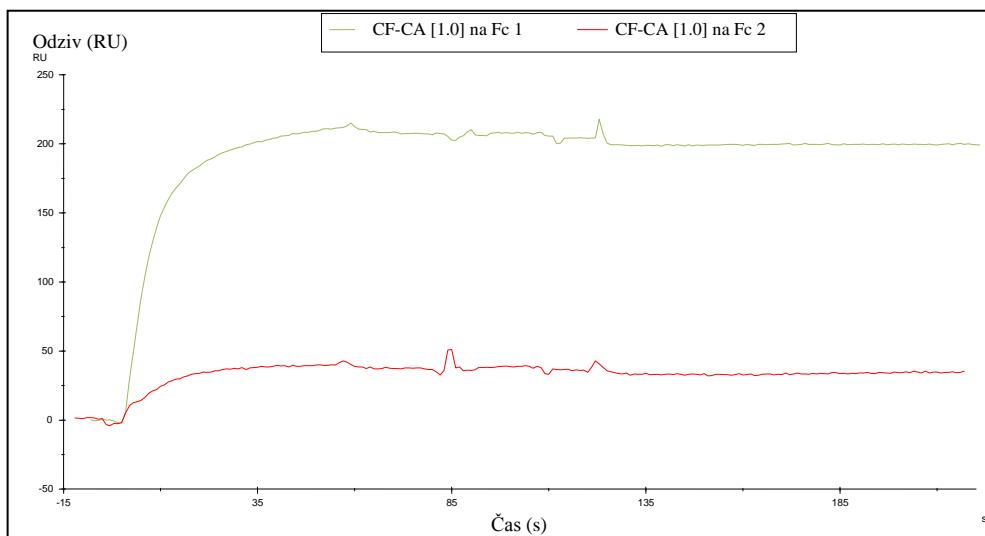
Statistično značilne razlike ($p < 0,05^*$) so prisotne pri koncentraciji $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$. Vsaki koncentraciji negativno nabitih kobaltovo-feritnih nanodelcev (CF-CA) je bilo izpostavljenih 5 živali ($n = 5$), v kontrolni skupini pa jih je bilo 8 ($n = 8$).

Slike 13 in 14 prikazujeta stopnjo destabilizacije celičnih membran izoliranega tkiva (prebavne žleze modelnega organizma) po 18-urnem namakanju v suspenzijah nevtralnih in negativno nabitih kobaltovo-feritnih nanodelcev z različnimi koncentracijami. Med $CoFe_2O_4$ in $CoFe_2O_4$ -CA smo opazili razlike v destabilizaciji celičnih membran hepatopankreasa. Izkazalo se je, da nevtralni kobaltovo-feritni nanodelci (na sliki 13 označeno CF) s koncentracijami suspenzij $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ in $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ne povzročijo stopnje destabilizacije celičnih membran, različne od kontrole (namakanje v fiziološki raztopini za *P. scaber*). Koncentraciji suspenzij $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ in $1000 \mu\text{g}/\text{mL}$ pa statistično značilno ($p < 0,01 **$) povečata stopnjo destabilizacije membran. Po inkubaciji v suspenzijah negativno nabitih kobaltovo-feritnih nanodelcev (na sliki 14 označeno CF-CA)

ostane stabilnost celičnih membran bolj ohranjena. Šele suspenzija s koncentracijo 1000 µg/mL kaže statistično značilne razlike ($p < 0,05$ *), ostale koncentracije pa niso povzročile pomembne destabilizacije membran. Nevtralni kobaltovo-feritni nanodelci imajo večji učinek na destabilizacijo celične membrane. Preglednica podatkov za vrednotenje stopnje destabilizacije membrane je v prilogi A2.

4.3 POVRŠINSKA PLAZMONSKA RESONANCA

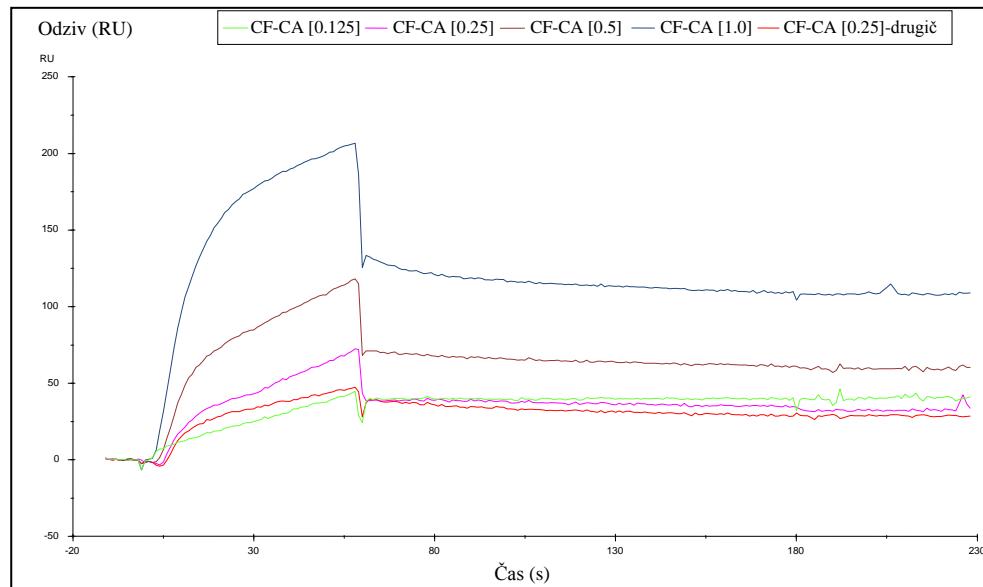
Pri vseh treh tipih nanodelcev je vezava na dekstranski matriks senzorskega čipa predstavljala večjo vrednost odziva v enotah refraktometra (RU) kot vezava nanodelcev na lipidne vezikle. Vezava negativno nabitih kobaltovo-feritnih delcev (CF-CA) v pretočni celici 2 obsega le 40 RU, v celici z le desktranskim matriksom pa 190 RU (slika 15). Pri ostalih dveh tipih nanodelcev smo opazili podoben trend (slike v prilogi B 1). Vezava nevtralnih kobaltovo-feritnih nanodelcev (CF) na lipidne vezikle (in nepokrito območje dekstranskega matriksa) v pretočni celici 2 obsega 120 RU, v celici 1 (prisoten le dekstran) pa 180 RU. Vezava fulerenov v pretočni celici 2 obsega 80 RU, v celici z le desktranskim matriksom pa 360 RU.



Slika 15: Vezava nanodelcev CF-CA na pretočni celici Fc1 in Fc2.

Fc1 je oznaka za prvo pretočno celico, kamor liposomov nismo nanesli, podlaga za vezavo nanodelcev je le izvorni dekstranski matriks (na sliki 15 rdeča krivulja). Fc2 pa označuje drugo pretočno celico, kamor smo predhodno nanesli vezikle (na sliki 15 zelena krivulja).

Pri vseh treh tipih nanodelcev smo opazili nespecifično vezavo na dekstran. Vrednost odziva se je povečevala v skladu z naraščajočo koncentracijo nanodelcev od 125 µg/mL do 1000 µg/mL. Na sliki 16 je prikazan primer nespecifične vezave za CoFe₂O₄-CA (na sliki označeno CF-CA), pri drugih dveh nanodelcih (fulerenih in CoFe₂O₄) smo zabeležili enak trend odziva (slike v prilogi B 2).



Slika 16: Nespecifična vezava nanodelcev (CF-CA) na dekstranski matriks senzorskega čipa.

Vezava nanodelcev CF-CA naraščajoče koncentracije 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL in 1000 µg/mL na osnovo čipa BIACore L1 – desktranski matriks. Koncentracijo 250 µg/mL smo nanesli dvakrat.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V nalogi smo ugotavljali vpliv različnih tipov nanodelcev: fulerenov, nevtralnih kobaltovo-feritnih delcev (CoFe₂O₄) in negativno nabitih kobaltovo-feritnih delcev (CoFe₂O₄-CA, z vezano citronsko kislino) na umetne fosfolipidne membrane. Dobljene rezultate smo preverili semi *in vitro* na izoliranem tkivu modelnega nevretenčarskega organizma ter *in vivo* z oralno izpostavitvijo izopodnih rakov suspenzijam nanodelcev.

Ugotovili smo, da proučevani nanodelci vplivajo na umetne fosfolipidne membrane (a) in tudi na celično membrano (b).

- a) Vpliv nanodelcev na umetne fosfolipidne membrane smo testirali z analitsko metodo sisanja rentgenskih žarkov pod majhnim kotom (SAXS - Small Angle X-Ray Scattering, ang.) in z opazovanjem orjaških unilamelarnih veziklov (GUV-Giant Unilamellar Vesicle, ang.) s svetlobnim faznokontrastnim mikroskopom.

Z metodo SAXS smo testirali interakcije kobaltovo-feritnih nanodelcev z lipidnimi membranami. Pričakovali smo, da bomo v vzorcih multilamelarnih veziklov, pripravljenih skupaj z nanodelci, opazili spremembo razdalje med membranami, ki bi se na grafu intenzitete sisanja svetlobe iz vzorca v odvisnosti od sipalnega vektorja (slika 6) izkazala kot sprememba pozicije vrhov na krivulji. V primeru močnega delovanja nanodelcev na membrane pričakujemo krivuljo brez vseh vrhov, kar bi pomenilo popolno ločitev posameznih fosfolipidnih dvoslojev (v multilamelarnih veziklih) drug od drugega. Poleg teh bolj izrazitih pa smo v našem primeru pričakovali tudi pojav manj opaznih sprememb intenzitete difrakcijskih vrhov na krivulji, ki bi odražale spremembo celotne membranske strukture. Zaradi vrivanja nanodelcev v lipidni dvosloj bi se debelina tega (t.j. razdalja med fosfatnimi skupinami lipidnih glav) lahko povečala, različne površinske rekonstrukcije fosfolipidnih membran, nastale zaradi delovanja nanodelcev, pa bi se lahko kazale kot stanjšanje lipidnega dvosloja. V našem primeru (slika 6) pa sta širina in pozicija vrhov na krivulji ostali nespremenjeni, kar pomeni, da so membrane multilamelarnih veziklov ostale razporejene po enako urejenem vzorcu in na enakih medsebojnih razdaljah.

Opazili smo močan prvi zaporedni vrh na krivuljah pri vseh treh vzorcih (slika 6), kar pomeni, da se v naših vzorcih multilamelarnih veziklov pojavlja struktura skupina z močnim kontrastnem elektronske gostote na enaki razdalji d (d = 65.5 Å). Slika 6 tudi prikazuje dobro izražen drugi zaporedni vrh (okrog $\frac{1}{4}$ do $\frac{1}{2}$ višine intenzitete prvega vrha), kar pomeni, da so membrane multilamelarnih veziklov v vzorcu dobro hidrirane (Rappolt, 2010).

Pri našem vzorcu (multilamelarni veziki POPC, pripravljeni v glukozni raztopini) je razdalja med lipidnimi dvosloji znotraj multilamelarnih veziklov (med fosfatnimi skupinami lipidnih glav; 'd') približno 1 Å večja kot pri POPC-veziklih, pripravljenih v vodni raztopini (Rappolt in Pabst, 2008). Predvidevamo, da ima glukoza blag vpliv na sistem, vendar premajhen, da bi bil pomemben za rezultate pri naši študiji.

Multilamelarni veziki so biološko manj relevantni kot unilamelarni, vendar dajejo zelo koristne informacije o interakcijah med učinkovinami in lipidnimi dvosloji. V našem primeru bi nanodelci lahko povzročili nered v urejenosti dvoslojev v multilamelarnih veziklih in vplivali na integriteto posameznih fosfolipidnih dvoslojev. Pri nobenem od testiranih nanodelcev, nevtralnih ali negativno nabitih kobaltovo-feritnih delcev, nismo opazili pričakovanih sprememb, zato sklepamo, da ti nanodelci ne vplivajo na razdalje med membranami in na debelino posameznih dvoslojev, ugotavljanih z metodo SAXS. Menimo, da je metoda SAXS primerna za študije interakcij različnih nanodelcev z umetnimi fosfolipidnimi membranami, četudi rezultati našega eksperimenta niso pokazali merljivih učinkov proučevanih nanodelcev na fosfolipidne membrane. V našem primeru smo namreč uporabili le enega od možnih načinov priprave multilamelarnih veziklov (Hope in sod., 1986). Sama priprava pa lahko vpliva na interakcije med nanodelci in lipidnimi membranami in s tem na signal, dobljen z metodo SAXS. V nadaljnjih eksperimentnih načrtujemo drugačno pripravo vzorcev multilamelarnih veziklov skupaj s suspenzijami nanodelcev, tako da bi prišlo do bolj intenzivnega mešanja nanodelcev z lipidi. Nanodelce in lipide bi skupaj raztoplili v kloroformu ali podobnem topilu, suspenzijo osušili do oblikovanja lipidne plasti in nato rehidrirali. Menimo, da bi tako pripravljene suspenzije multilamelarnih veziklov in nanodelcev lahko predstavljale učinkovitejši sistem za proučevanje vpliva različnih nanodelcev na membrane z metodo SAXS.

Kot drugi primer študije vpliva nanodelcev na umetne fosfolipidne membrane smo izbrali **orjaške unilamelarne fosfolipidne vezikle** (GUV – Giant Unilamellar Vesicle, ang.). Orjaške unilamelarne vezikle smo inkubirali v suspenziji različnih nanodelcev do 90 minut in opazovali njihove morfološke spremembe. Z računalniško analizo slik in s statistično obdelavo podatkov smo ugotovili razlike v velikosti veziklov (predstavljeno s polmerom), obliki in številu veziklov v posameznih testnih skupinah. Nanodelci so povzročili spremembo velikosti sferičnih veziklov. Pri obeh eksperimentih (št. 6 – fulereni in št. 7 – nevtralni in negativno nabiti kobaltovo-feritni nanodelci) se je v kontrolni skupini po 90 minutah velikost veziklov zmanjšala. Pri veziklih, inkubiranih v suspenzijah vseh treh tipov nanodelcev, pa smo po 90-minutni inkubaciji opazili večji povprečni premer veziklov kot pri obeh kontrolnih skupinah (0 in 90 minut). Naši rezultati kažejo, da fulereni ter nevtralni in negativno nabiti kobaltovo-feritni nanodelci reagirajo z lipidnimi membranami in povzročijo spremembe velikosti veziklov.

Iz naših rezultatov je razvidno tudi povečevanje nesferičnih oblik veziklov. Različne stopnje transformacije oblike veziklov z brstom in druge tipe nesferičnih veziklov smo pri našem eksperimentu obravnavali pod skupnim imenom 'nesferične oblike veziklov'. Opazili smo trend povečevanja števila nesferičnih oblik veziklov, izraženih na 100 veziklov, ki se je pri obeh eksperimentih pokazal sicer tudi pri kontrolni skupini po 90-minutni inkubaciji, izrazito pa v primeru inkubacije veziklov z vsemi tremi tipi nanodelcev. Razlike v količini nesferičnih veziklov so velike med obema eksperimentoma (fulereni – eksperiment št. 6 in kobaltovo-feritni nanodelci – eksperiment št. 7). Te razlike razlagamo na podlagi predhodnih ugotovitev, da je za POPC-vezikle značilna dimamična transformacija oblik (Kralj-Iglič in sod., 2001; Babnik in sod., 2003), torej je možnih več stanj, v katerih z mikroskopskim posnetkom zajamemo vezikle. Gre torej za različne stopnje transformacije oblike veziklov oziroma za različne prehodne oblike veziklov (Kralj-Iglič in sod., 2002; Božič in sod., 2002), ki jih lahko obravnavamo kot 'navidezno ravnotežne' oblike. Potek transformacije oblike lipidnih veziklov lahko opišemo kot značilno zaporedje različnih oblik veziklov (Kralj-Iglič in sod., 2002). Rezultati našega dela kažejo, da so nanodelci spremenili dinamiko transformacije oblike veziklov v populaciji. Sklepamo, da so nanodelci vplivali na mikrookolje veziklov in s tem na dinamiko morfoloških transformacij veziklov. Med nanodelci ni bilo opaznih razlik v

pojavnosti nesferičnih oblik, večje so bile razlike med kontrolnimi in izpostavljenimi vezikli.

Kot tip oblike vezikla, ki ni vključen v različne zgoraj omenjene stopnje transformacije oblike vezikla z brstom, smo po 90-minutni inkubaciji veziklov v suspenzijah nanodelcev našli prolatni vezikel z obliko verižice kot najpogostejo nesferično obliko veziklov. V nasprotju z rezultati naše študije, ki kažejo na najpogostejše oblikovanje prolatnih veziklov z obliko verižice po dodatku suspenzije negativno nabitih nanodelcev, sta Yu in Granick (2009) opazila oblikovanje veziklov z obliko verižice kot rezultat interakcije pozitivno nabitih nanodelcev z lipidnimi vezikli. Yu in Granick razlagata, da adsorpcija kationskih nanodelcev na vezikle povzroči spremembo površinske napetosti zaradi neujemanja med notranjo in zunanjo plastjo lipidnega dvosloja, kar vodi v oblikovanje veziklov v verižico. V našem primeru pa smo dokazali, da tako nevtralni in negativno nabiti kobaltovo-feritni nanodelci kot tudi fulereni povzročijo spremembo oblike v vezikle z obliko verižice.

V predhodnih študijah so Zupanc in sod. (2010) poročali o vplivu fulerenov na količino veziklov in na velikostno porazdelitev veziklov v populaciji. Pokazali so tudi, da eksperimentalni pogoji (npr. dvig temperature, osmotski pritsk itd.) ne povzročajo nastalih sprememb v populaciji veziklov, temveč so le-te res posledica značilnega delovanja posameznih testnih substanc. Iz te ugotovitve smo izhajali pri oblikovanju eksperimentalnega postopka v naši študiji.

Naši rezultati se ujemajo s podatki iz literature o vplivu nanodelcev na umetne fosfolipidne membrane. Tudi drugi avtorji poročajo, da nanodelci povzročijo opazne morfološke spremembe fosfolipidnih veziklov. Ugotovili so površinsko rekonstrukcijo fosfolipidnega dvosloja (Wang in sod., 2008), fizične poškodbe lipidnih membran (Lipowski in Dobereiner 1998, Leroueil in sod., 2008) ter transformacije oblik lipidnih veziklov (Yu in Granick, 2009). Večina drugih študij je usmerjenih v proučevanje posameznih veziklov in s tem transformacij enega vezikla ali le manjše skupine veziklov ob interakciji z nanodelci. Uporabljen pristop v okviru našega raziskovalnega dela pa omogoča razširitev tradicionalne metode opazovanja veziklov s svetlobnim mikroskopom tako, da lahko hkrati dobimo informacije o spremembah oblike in količine velike populacije veziklov.

- b) Vpliv nanodelcev na celične membrane smo testirali z metodama semi *in vitro* ter *in vivo*.

V okviru našega raziskovanja smo se odločili za dopolnitev in nadgradnjo študij na fosfolipidnih veziklih s poskusi semi *in vitro* ter *in vivo*. Z izbranim modelnim nevretenčarskim organizmom (rak enakonožec, Isopoda) smo vrednotili destabilizacijo celične membrane prebavnih žlez. S testiranjem vpliva nanodelcev na celično membrano v poskusu semi *in vitro* smo ugotovili, da nevtralni kobaltovo-feritni nanodelci (CoFe₂O₄) bolj intenzivno destabilizirajo plazemske membrane kot negativno nabiti kobaltovo-feritni delci (CoFe₂O₄-CA). Ti so povzročili statistično značilne razlike v stopnji destabilizacije plazmaleme pri inkubaciji prebavnih žlez v suspenziji nanodelcev s koncentracijo 1000 µg/mL ($p < 0,05$), nevtralni kobaltovo-feritni nanodelci pa destabilizirajo celično membrano že pri koncentracijah 100 µg/mL in 1000 µg/mL ($p < 0,01$). Poskusov semi *in vitro* z namakanjem izoliranih prebavnih žlez v suspenziji fulerenov, zaradi težje dostopnosti in dražjih suspenzij fulerenov, nismo izvedli.

V primeru testiranja vpliva nanodelcev na celične membrane s poskusom *in vivo* pa smo ugotovili, da so fulereni (C₆₀) najbolj biološko aktivni, nevtralni in negativno nabiti kobaltovo-feritni nanodelci pa ne kažejo statistično značilnih razlik od kontrolne skupine. Močno biološko aktivnost fulerenov so v svoji študiji dokazali že Valant in sod. (2010). Z oralno izpostavitvijo različnim nanodelcem *in vivo* so fulereni kazali največji potencial za destabilizacijo celične membrane celic hepatopankreasa v primerjavi z drugimi nanodelci (sonicirane in nesonicirane oblike TiO₂ in ZnO).

Pričakovali smo, da bodo rezultati obeh metod, semi *in vitro* ter *in vivo*, pokazali, da različni nanodelci različno učinkujejo na celične membrane. S poskusom *in vivo* smo dokazali vpliv fulerenov na destabilizacijo celične membrane, ne pa kobaltovo-feritnih nanodelcev. S poskusom semi *in vitro* pa smo ugotovili, da nevralni kobaltovo-feritni nanodelci bolj intenzivno vplivajo na membrane kot negativno nabiti, nismo pa preizkusili vpliva fulerenov. Semi *in vitro* metoda je pokazala učinek nevtralnih in negativno nabitih kobaltovo-feritnih nanodelcev na celične membrane, medtem ko s poskurom *in vivo* tega nismo potrdili. Z obema metodama vrednotimo stabilnost ozioroma integriteto plazemske membrane celic enakega tkiva, vendar so pri poskusu semi *in vitro* z direktnim 18-urnim namakanjem prebavnih žlez v suspenzijah nanodelcev celice dlje ter bolj neposredno

izpostavljeni delovanju nanodelcev. V poskusu *in vivo* pa je celična membrana v stiku z nanodelci krajši čas (30 min). Predvidevamo, da je trajanje izpostavitve pomemben razlog za razliko v rezultatih. Sklepamo, da imajo fulereni močnejšo biološko aktivnost, saj se vpliv na integriteto celične membrane pokaže že ob oralni izpostavitvi. Predvidevamo, da bi fulereni povzročili močno destabilizacijo plazmaleme tudi v poskusu semi *in vitro*.

Z metodama *in vivo* ter semi *in vitro* smo pokazali dejanski vpliv nanodelcev na celično membrano. Predvidevamo, da nanodelci v biološkem sistemu reagirajo z drugimi sestavinami celične membrane (različni membranski proteini), ne le s fosfolipidi, kar povzroči destabilizacijo celične membrane.

Rezultati metode površinske plazmonske resonance (SPR – Surface Plasmon Resonance, ang.) kažejo, da je nespecifična vezava nanodelcev na dekstranski matriks (glavna sestavina senzorskega čipa) previsoka za ustrezno analizo vezave nanodelcev na umetne fosfolipidne membrane. Vezava vseh uporabljenih nanodelcev na dekstran je predstavljal večji odziv kot vezava nanodelcev na lipidne vezikle. Da bi izločili morebitno vezavo aglomeratov nanodelcev na čip in da bi zmanjšali možnost zamašitve mikrotekočinskega sistema, smo vse suspenzije nanodelcev pred vnosom v sistem prefiltrirali. Izvedbo metode pa smo kljub temu morali prekiniti zaradi zamašitve mikrotekočinskega sistema. Predvidevamo, da so jo, kljub filtraciji, povzročile suspenzije nanodelcev, ki so lahko oblikovali agregate v vodni raztopini delovnega pufra tudi po injiciranju suspenzije v mikrotekočinski sistem. Različne študije navajajo, da so nanodelci v vodni raztopini slabo topni in zaradi visoke stopnje difuznosti kot posamezni delci obstajajo le kratek čas, zato zelo hitro pride do agregacije/aglomeracije (Wong in sod., 2009; Canesi in sod., 2010). Že majhne spremembe ionske jakosti, pH-medija ali dodatka različnih topljencev lahko močno vplivajo na agregacijo nanodelcev.

Z metodo SPR nismo dobili ustreznih rezultatov za vrednotenje vpliva nanodelcev na fosfolipidne membrane. Predvidevamo, da je, vsaj z uporabo navedenih suspenzij nanodelcev in izvedbo metode po opisanem postopku, metoda površinske plazmonske resonance neustrezna za vrednotenje vpliva nanodelcev na umetne fosfolipidne membrane.

Naši rezultati so pokazali trend različnega reagiranja različnih nanodelcev s celičnimi membranami. To lahko razložimo z izsledki novejših študij (Drobne in Kralj-Iglič, 2009; Verma in Stellacci, 2010), da so interakcije nekaterih nanodelcev z biološkimi sistemi v veliki meri povezane z njihovo površinsko reaktivnostjo, ki bistveno vpliva na razvoj (cito)toksičnih odzivov (Warheit in sod., 2007a, 2007b). Ne le vrsta oziroma tip kemijskih funkcionalnih skupin, ampak tudi njihova relativna razporeditev na površini igrata ključno vlogo pri interakciji z biološkimi sistemi.

Prednost našega raziskovalnega dela je edinstvena kombinacija uporabljenih metod za vrednotenje vpliva nanodelcev na fosfolipidne membrane. Kot smo seznanjeni z dosedanjim delom drugih raziskovalnih skupin, proučevanje izpostavljenosti različnih sistemov (umetne fosfolipidne membrane, izolirano tkivo, organizem) različnim nanodelcem ni bilo zastopano še v nobeni študiji. Raznolikost in kombinacija uporabljenih metod ter modelnih bioloških sistemov dandanes predstavlja temelj raziskovalnega dela.

5.2 SKLEPI

- Kobaltovo-feritni nanodelci in fulereni različno reagirajo z lipidnimi membranami, njihova biološka reaktivnost je odvisna od površinskih lastnosti nanodelcev.
- Kobaltovo-feritni nanodelci ne povzročajo spremembe debeline membrane in razdalje med fosfolipidnimi dvosloji znotraj multilamelarnih veziklov. Kljub temu ocenujemo, da je metoda SAXS primerna za vrednotenje vpliva različnih nanodelcev na umetne fosfolipidne membrane.
- Proučevani nanodelci povzročajo spremembe velikosti veziklov ter pojav večjega števila nesferičnih oblik veziklov. Opazovanje orjaških unilamelarnih veziklov (GUV-ov) s svetlobno mikroskopijo je primerna metoda za vrednotenje interakcij nanodelcev z umetnimi fosfolipidnimi membranami.
- Različni nanodelci povzročijo različne stopnje destabilizacije celične membrane po izpostavitvi *in vivo* ter semi *in vitro* modelnemu nevretenčarskemu organizmu. Ti dve metodi sta primerni za vrednotenje vpliva nanodelcev na biološke sisteme.
- Metoda površinske plazmonske resonance (SPR) ni primerna za vrednotenje vpliva nanodelcev na umetne fosfolipidne membrane.

6 POVZETEK

V diplomskem delu smo predpostavili, da nanodelci, fulereni ter nevtralni in negativno nabiti kobaltovo-feritni nanodelci, različno reagirajo z umetnimi fosfolipidnimi membranami. Predvidevali smo, da so njihove površinske lastnosti ključne pri biološki reaktivnosti delcev.

Z različnimi metodami smo poskušali določiti tip interakcij nanodelcev s fosfolipidnim dvoslojem in ovrednotiti primernost izbranih spektroskopskih in mikroskopskih metod za ugotavljanje interakcij med nanodelci in lipidnimi membranami. Različne tipe veziklov: orjaške unilamelarne vezikle (GUV – Giant Unilamellar Vesicle, ang.), multilamelarne vezikle (MLV – Multilamellar vesicle, ang.) in velike unilamelarne vezikle (LUV – Large Unilamellar vesicle, ang.) smo v okviru različnih metod izpostavili proučevanim nanodelcem in opazovali njihov vpliv na fosfolipidne membrane.

Rezultate študij na umetnih fosfolipidnih membranah smo preverili s poskusom semi *in vitro* na izoliranem tkivu nevretenčarskega modelnega organizma ter s poskusom *in vivo* z oralno izpostavitvijo organizma suspenzijam proučevanih nanodelcev.

Potrdili smo dve postavljeni hipotezi; fulereni in kobaltovo-feritni nanodelci so reagirali s celičnimi membranami in povzročili njihovo destabilizacijo. Vplivali so tudi na spremembe oblik ter velikosti orjaških unilamelarnih veziklov, nismo pa dokazali vidnega vpliva na spremembo debeline membrane in na integriteto multilamelarnih veziklov (SAXS). Nevtralni in negativno nabiti kobaltovo-feritni nanodelci z različno površino in enako kemijsko sestavo so različno reagirali z lipidnimi membranami.

Interakcije, ugotovljene v sistemih z lipidnimi vezikli, smo dopolnili v sistemu semi *in vitro* z izoliranim organom ter s poskusom *in vivo*. S temo dvema metodama smo tudi potrdili različen vpliv različnih tipov nanodelcev na membrane.

Rezultati diplomskega dela so skladni z objavami v znanstveni literaturi, kjer avtorji poročajo o bistvenem vplivu površinskih lastnosti nanodelcev na interakcije z lipidnimi membranami. Fulereni ter nevtralni in negativno nabiti kobaltovo-feritni nanodelci

vplivajo na povečano destabilizacijo celične membrane in povzročijo spremembe oblik in velikosti umetnih fosfolipidnih veziklov.

Doprinos našega raziskovalnega dela je v uspešni kombinaciji zelo različnih metod za vrednotenje vpliva nanodelcev na fosfolipidne membrane.

7 VIRI

- Amenitsch H., Rappolt M., Kriechbaum M., Mio H., Laggner P., Bernstorff S. 1998. First performance assessment of the small-angle X-ray scattering beamline at ELETTRA. *Journal of Synchrotron Radiation*, 5: 506–508
- Antonov V.F., Petrov V.V., Molnar A.A., Predvoditelev D.A., Ivanov A.S. 1980. The appearance of single-ion channels in unmodified lipid bilayer membranes at the phase transition temperature. *Nature*, 283: 585–586
- Antonov V.F., Anosov A.A., You Nemchenko O., Yu Smirnova E. 2007. V: Ottova-Leitmannova A., Tein H.T. (ur.) *Advances in Planar Bilayers and Liposomes*, 5. izdaja. Amsterdam, Elsevier: 151–172
- Arriaga L.R., Rodriguez-Garcia R., Lopez-Montero I. 2010. Dissipative curvature fluctuations in bilayer vesicles: Coexistence of pure-bending and hybrid curvature-compression modes, *European Physical Journal E*, 31, 1: 105–113
- Babes L., Denzoit B., Tanguy G., Le Jeune J.J., Jallet P. 1999. Synthesis of iron oxide nanoparticles used as MRI contrast agent: a parametric study. *Journal of Colloid and Interface Science*, 212: 474–82
- Bae S., Won Lee S., Hirukawa A., Takemura Y., Haeng Jo Y., Geun Lee S. 2009. AC Magnetic-Field-Induced Heating and Physical Properties of Ferrite Nanoparticles for a Hyperthermia Agent in Medicine. *IEEE Transactions on Nanotechnology*, 8, 1: 86–93
- Bagatolli L.A., Parasassi T, Gratton E. 2000. 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
- Banaszak M.M.H. 2009. Nanotoxicology: a personal perspective. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1, 4: 353–359
- Bernstorff S., Amenitsch H., Laggner P. 1998. High-throughput asymmetric double-crystal monochromator of the SAXS beamline at ELETTRA. *Journal of Synchrotron Radiation*, 5: 1215–1221
- Borm P. J., Robbins D., Haubold S., Kuhlbusch T., Fissan H., Donaldson K., Schins R., Stone V., Kreyling W., Lademann J., Krutmann J., Warheit D., Oberdörster E. 2006. The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and Fibre Toxicology*, 3: 11
- Božič B., Gomišček G., Kralj-Iglič V., Svetina S., Žekš B. 2002. Shapes of phospholipid vesicles with beadlike protrusions. *European Biophysics Journal*, 31: 487–496

- Canesi L., Ciacci C., Vallotto D., Galloa G., Marcomini A., Pojanac G. 2010. In vitro effects of suspensions of selected nanoparticles (C60 fullerene, TiO₂, SiO₂) on *Mytilus* hemocytes. *Aquatic Toxicology*, 96: 151–158
- Crane M., Handy R., Garrod J., Owen R., 2008. Ecotoxicity tests methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 5: 421–437
- Čampelj S., Makovec D., Bele M., Drofenik M., Jamnik J. 2006. Sinteza magnetnih nanodelcev, funkcionaliziranih s tanko plastjo silike. *Materiali in tehnologije*, 41, 2: 103–107
- Da Ros T., Prato M. 1999. Medicinal chemistry with fullerenes and fullerene derivatives. *Chemical Communications*, 8: 663–669
- Dimova R., Aranda S., Bezlyepkina N., Nikolov V., Riske K.A., Lipowsky R. 2006. A practical guide to giant vesicles. Probing the membrane nanoregime via optical microscopy. *Journal of Physics: Condensed Matter* 18: 1151–1176
- Döbereiner H.G. 2000. Properties of giant vesicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 5 (3–4): 256–263
- Dreher K. L. 2004. Health and Environmental Impact of Nanotechnology: Toxicological Assessment of Manufactured Nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 77 (1): 3–5
- Drobne D., 1997. Terrestrial Isopods—a good choice for toxicity testing of Pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16, 6: 1159–1164
- Drobne, D. 2007. Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. *Arch Hig Rada Toksikol*; 58: 471–478
- Drobne D., Kralj-Iglič V. 2009. Lipid membranes as tools in nanotoxicity studies. V: *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*. Leitmannova Liu A., Iglič A. (eds.) 10: 121–134
- Drobne D., Pipan Ž., Lešer V., Valant J., Gunde-Cimerman N., Remškar M., 2007. Metoda za določanje vplivov nanodelcev (TiO₂) na celice in tkiva v strupenostnem testu in vivo. *Zdrav. var.*, 46, 3: 96–102
- ELETTRA- Sincrotrone Trieste S.C.p.A. 2008. (29. 6. 2010). <http://www.elettra.trieste.it/> (12. 7. 2010).
- Farré M., Pérez S., Gajda-Schrantz K., Osorio V., Kantiani L., Ginebreda A., Barceló D. 2010. First determination of C₆₀ and C₇₀ fullerenes and N-methylfulleropyrrolidine C₆₀ on the suspended material of wastewater effluents by liquid chromatography hybrid quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Hydrology*, 383: 44–51

- Gharbi N., Pressac M., Hadchouel M., Szwarc H., Wilson S.R., Moussa F. 2005. [60]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 membrane. *Nano Letters*, 7, 12: 3716–3722
- Glatter O., Kratky O. 1982. Small Angle X-ray Scattering. Academic Press, London: 308 str.
- Guinier A. 1963. X-ray diffraction. W.H. Freeman, San Francisco: 378 str.
- Gyergyek S., Makovec D., Drofenik M. 2008. Priprava co-feritnih nanodelcev z ozko porazdelitvijo velikosti z metodo termičnega razpada oleatov. *Materiali in tehnologije*, 42, 6: 285–289
- Gwinn M.R., Vallyathan V. 2006. Nanoparticles: Health Effects – Pros and Cons. *Environmental Health Perspectives*, 114: 1818–1825
- Hagedorn M., Ziegler A. 2002. Analysis of Ca²⁺ uptake into the smooth endoplasmic reticulum of permeabilised sternal epithelial cells during the moulting cycle of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Journal of Experimental Biology*, 205, 13: 1935–1942
- Hodnik V., Anderluh G. 2010. Capture of Intact Liposomes on Biacore Sensor Chips for Protein–Membrane Interaction Studies. V: Surface Plasmon Resonance, Methods in Molecular Biology 627. N.J. de Mol, M.J.E. Fischer (ur.): 201–211
- Hong S., Hessler J.A., Banaszak-Holl M.M., Leroueil P., Mecke A., Orr B.G. 2006. Physical interactions of nanoparticles with biological membranes: The observation of nanoscale hole formation. *Journal of Chemical Health and Safety*, 13, 3: 16-20
- 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
- Huang T.C., Toraya H., Blanton T.N., Wu Y. 1993. X-ray powder diffraction analysis of silver behenate, a possible low-angle diffraction standard. *Journal of Applied Crystallography*, 26: 180–184
- 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
- Jensen A., Wilson S., Schuster D. 1996. Biological applications of fullerenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 4, 6: 767–779

- Kamruzzaman-Selim K.M., Ha Y.-S., Kim S.-J, Chang Y., Kim T.-J., Lee G.H., Kang I.-K. 2007. Surface modification of magnetite nanoparticles using lactobionic acid and their interaction with hepatocytes. *Biomaterials*, 28: 710-716
- Koch M.H.J., Vachette P., Svergun D.I. 2003. Small-angle scattering : a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Quarterly Review of Biophysics*, 36: 147–227
- Koehler A., Marx U., Broeg K., Bahns S., Bressling J. 2008. Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas – A new threat to marine life? *Marine Environmental Research*, 66: 12–14
- Kralj-Iglič V., Gomišček 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., Gomišček G., Sevšek F., Arrigler V., Hägerstrand H. 2002. Microtubes and nanotubes of a phospholipid bilayer membrane. *Journal of physics A: mathematical and general*, 35: 1533–1549
- Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C., Curl R.F., Smalley R.E., 1985. C₆₀: buckminsterfullerene. *Nature*, 318: 162–163.
- Kumar Gupta A., Gupta M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26, 18: 3995-4021
- Lacava L.M., Lacava Z.G.M., Da Silva M.F., Silva O., Chaves S.B., Azevedo R.B., Pelergini F., Gansau C., Buske N., Sabolovic D., Morais P. C. 2001. Magnetic resonance of a dextran-coated magnetic fluid intravenously administered in mice. *Biophysical Journal*, 80: 2483–6
- Laggner P., Mio H. 1992. SWAX, a dual-detector camera for simulations small and wide angle X-ray diffraction in polymer and liquid crystal research. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 323: 86–90
- Leroueil P. R., Hong S., Mecke A., Baker J.R. Jr., Orr B.G, Banaszak Holl M.M. 2007. Nanoparticle interaction with biological membranes: does nanotechnology present a Janus face? *Accounts of Chemical Research*, 40, 5: 335–42
- Leroueil P. R., Berry S.A., Duthie K., Han G., Rotello V.M., MnNerny D.Q., Baker J.R. Jr., Orr B.G, Banaszak Holl M.M. 2008. Wide varoety of cationic Nanoparticles Induce Defects in Supported Lipid Bilayers. *Nano Letters* 8, 2: 420–424
- Lipowsky R. 1991. The conformation of membranes. *Nature*, 349: 475–485 F
- Lipowsky R., Döbereiner H.-G. 1998. Vesicles in contact with nanoparticles and colloids. *Europhysics Letters*, 43, 2: 219–225

- Makovec D. 2007. Structural properties of magnetic nanoparticles. Konferenca SLOANANO 2007 - Ljubljana. Inštitut Jožefa Štefana (18. jan. 2008). http://videolectures.net/slonano07_makovec_spm/ (24. jun. 2010)
- Markvoort A. J., Van Santen R. A., Hilbers P. A. J. 2006. Vesicle Shapes from Molecular Dynamics Simulation. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 45: 22780–22785
- Masciangioli T., Zhang W.-X. 2003. Environmental Technologies and the nanoscale. American Chemical Society. *Envrionmental Science & Technology*: 102A–108A.
- Massey F.J. 1951. The Kolmogorov-Smirnov Test for Goodness of Fit. *Journal of the American Statistical Association*, 46, 253: 68-78
- 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
- Mecke A., Majoros I.J., Patri A.K., Baker J.R. Jr., Banaszak-Holl M.M., Orr B.G. 2005. Lipid Bilayer Disruption by Polycationic Polymers: The Roles of Size and Chemical, *Langmuir*, 21, 23: 10348–10345
- Moona M.H., Parka I., Kimb Y. 1998. Size characterization of liposomes by field-flow fractionation and photon correlation spectroscopy: Effect of ionic strenght and pH of carries solutions. *Journal of Chromatography*, 813, 1: 91–100
- Myszka D. G. 1997. Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Current Opinion in Biotechnology*, 8: 50–57
- Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. 2006. Toxic potential of materilas at the nanolevel. *Science*, 311: 622–627
- Nikulainen T., Palmberg C. 2010. Transferring science-based technologies to industry— Does nanotechnology make a difference? *Technovation*, 30: 3–11
- Novak S. 2009. Vpliv nanodelcev titanovega dioksida (tio₂) na kopenske rake enakonožce (Isopoda, Crustacea). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta:72
- Oberdörster E. 2004. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C₆₀) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass. *Environmental Health Perspectives*, 112, 10: 1058–1062
- Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics: Applied physics*, 36: R167–R181
- Partha R., Conyers J.L. 2009. Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. *Int J Nanomedicine*, 4: 261–275
- 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

- Peetla C., Rao K., Labhsetwar 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
- Podlesnik-Beseničar M., Anderluh G. 2010. Preparation of Lipid Membrane Surfaces for Molecular Interaction Studies by Surface Plasmon Resonance Biosensors. V: Surface Plasmon Resonance, Methods in Molecular Biology 627. N.J. de Mol, M.J.E. Fischer (ur.): 191–200
- Pravila za delo z aparatom Biacore X. Mreža raziskovalnih infrastrukturnih centrov Infrastrukturni center za površinsko plazmonske resonanco. 16. 11. 2009. <http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/Uporabno.html>. (21. 6. 2010)
- Rappolt M., Pabst G. 2008. Flexibility and Structure of Fluid Bilayer Interfaces. V: Structure and Dynamics of Membranous Interfaces, Kaushik Nag (ur.). JohnWiley & Sons, Hoboken (NJ): 45–74
- Rappolt M. 2010. Bilayer thickness estimations with "poor" diffraction data. Journal of Applied Physics, 107, 084701: 1-7
- Ruoff R.S.Tse D.S., Malhotra R., Lorents D.C. 1993. Solubility of fullerene (C₆₀) in a variety of solvents. Journal of Physical Chemistry, 97: 3379–3383
- Sadeghiani N., Barbosa L.S., Silva L.P., Azevedo R.B., Morais P.C., Lacava Z.G.M. 2005. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyasparticacid. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 289: 466–8
- Sayes C.M., Marchione A.A., Reed K.L., Warheit D.B. 2007. Comparative pulmonary toxicity assessments of C-60 water suspensions in rats: Few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles. Nano Letters, 7, 8: 2399–2406
- Sivaraman N., Dhamodaran R., Kaliappan I., Srinivasan T.G., Rao P.R.V., Mathews C.K. 1992. Solubility of C₆₀ in organic solvents. Journal of Organic Chemistry, 57: 6077–6079
- Skebo J.E., Grabinski C.M., Schrand A.M., 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
- Skumie A. 2006. Suitability of water based magnetic fluid with CoFe₂O₄ particles in hyperthermia. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 307, 1: 85–90
- Spohn P., Hirsch C., Hasler F., Bruinink A., Krug H.F., Wick P. C₆₀ fullerene: A powerful antioxidant or a damaging agent? The importance of an in-depth material characterization prior to toxicity assays. Environmental Pollution, 157: 1134–1139

- Svetina S., Žekš B. 2002. Shape behavior of lipid vesicles as the basis of some cellular processes. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 268, 3: 215–225
- Yaghmur A., Paasonen L., Yliperttula M., Urtti A., Rappolt M. 2010. Structural elucidation of light activated vesicles. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 1, 6: 962–966
- Yu Y., Granick S. 2009. Pearling of Lipid Vesicles Induced by Nanoparticles. *Journal of American Chemical Society*, 131: 14158–14159
- Unfried K., Albrecht C., Klotz L.O., Von Mikecz A., grether A., Beck R.P., Schins R.. 2007. Cellular responses to nanoparticles: target structures and mechanisms. *Nanotoxicology*, 1: 52–71
- US Environmental Protection Agency. 2003. Proceedings: EPA Nanotechnology and the Environmental: Applications and Implications STAR Progress Review Workshop. EPA Document Number: EPA/600/R-02/080.
- Valant J., Drobne D., Sepčić K., Jemec A., Kogej K., Kostanjšek R. 2009. Hazardous potential of manufactured nanoparticles identified by in vivo assay. *Journal of Hazardous Materials*, 171: 160–165
- Valant J. 2010. Interakcije med nanodelci in modelnim sistemom celica-tkivo-organ pri nevretenčarjih. Doktorska disertacija. Ljubljana, Medicinska fakulteta: 95
- Verma A., Stellacci, F. 2010. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small Journal* 6, 1: 12–21
- Wilhelm C., Billotey C., Roger J., Pons J.N., Bacri J.-C., Gazeau F. 2003. Intracellular uptake of anionic supraparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* 24: 1001–1011
- 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
- Warheit D.B., Hoke R.A., Finlay C., Donner E.M., Reed K.L., Sayes C.M. 2007. Development of a base set toxicity test using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicology Letters*, 171: 99–110 a
- Warheit D.B., Webb T.R., Reed K.L., Frerich S., Sayes C.M. 2007. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology*, 230: 90–104 b
- Wilson S.R. 2000. Biological aspects of fullerenes. V: Fullerenes: Chemistry, physics and technology. Kadish K.M., Ruoff R.S (ur.). New York, NY: John Wiley and Sons, Inc: 431–436

Wong B.A., Nash D.G., Moss O.R. 2009. Generation of Nanoparticle Agglomerates and their Dispersion in Lung Serum Simulant or Water. *Journal of Physics: Conference Series* 151: 012036

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. 31ta letna mednarodna konferenca IEEE EMBS (31st Annual International Conference of the IEEE EMBS), Minneapolis, Minnesota, ZDA: T67

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

ZAHVALA

Vesela sem, da sem imela priložnost sodelovanja in izdelave diplomske naloge pod mentorstvom prof. dr. Damjane Drobne. Hvala za strokovno pomoč, sproščeno vzdušje ob delu ter vedno odprta vrata za nasvet, spodbudo in prijazno besedo.

Zahvaljujem se dr. Michaelu Rappoltu z 'Institute of Biophysics and Nanosystems Research, Austrian Academy of Science' za priložnost sodelovanja in možnost izvedbe poskusov na eksperimentalni postaji SAXS na ELETTRI ('Sincrotrone Trieste'). Hvala za vso strokovno podporo pri vrednotenju rezultatov.

Za pomoč se zahvaljujem tudi celotni 'bionano' skupini. Še posebej hvala dr. Janezu Valantu za izvrstno delovno mentorstvo. Vpeljal me je v laboratorijsko delo in mi odprl pot v znanstveno raziskovanje. Hvala Sari Novak za potrpežljivo izvedbo mnogih ponovitev AO/EB, za prijateljsko oporo in pomoč pri delu v laboratoriju ter za koristne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Sabini Boljte se zahvaljujem za uvajanje v pripravo veziklov in v mikroskopiranje. Posebej bi se rada zahvalila Jerneju Zupancu za sodelovanje pri eksperimentih z vezikli ter za računalniško obdelavo, analizo videoposnetkov in za pomoč pri vrednotenju rezultatov. Za podporo in sodelovanje se zahvaljujem tudi ostalim sodelovcem z nanopodročja: Mihu, Živi, Tei, Anji in Mateju.

Hvala prof. ddr. Alešu Igliču in vsem sodelavcem iz Laboratorija za biofiziko Fakultete za elektrotehniko za možnost izvedbe eksperimentov v njihovem laboratoriju. Hvala Vidu, Mojci, Janezu, Maruši in Jasni za strokovno pomoč pri veziklih in mikroskopiranju.

Zahvaljujem se predstojnici Katedre za splošno zoologijo prof. dr. Jasni Štrus in sodelovcem s katedre za možnost sodelovanja in dela v laboratoriju.

Hvala tudi prof. dr. Gregorju Anderluhu in Vesni Hodnik s Katedre za biokemijo Oddelka za biologijo za priložnost izvedbe poskusov z nanodelci v Centru za površinsko plazmonske resonanco.

Zahvaljujem se dr. Darku Makovcu za pripravo suspenzij nanodelcev.

Rada bi se zahvalila tudi družini in prijateljem za nesebično podporo ter za veliko mero potrpežljivosti v času izdelave diplomskega dela.

Vsem skupaj še enkrat hvala za čudovito popotnico v svet znanosti.

PRILOGE

Priloga A1

Podatki za vrednotenje stopnje destabilizacije celične membrane pri poskusu *in vivo*.

Preglednica A1-a. Ocene stopnje destabilizacije celične membrane pri poskusu *in vivo*.

kontrola	CF	CF-CA	fulereni
1	1	2	4
1	1	2	5
2	2	1	3
1	1	4	2
1	2	1	4
1	1	1	4
1	1	1	1
1	1	1	1
1	1	1	4
1	1	1	5
p	0,479498	0,248212	0,0118927*

Legenda: p = stopnja zaupanja, izračunana po Mann-Whitney-evem statističnem testu.

Statistično značilne razlike ($p < 0,05^*$) so prisotne pri fulerenih. Številke od 1 do 9 predstavljajo oceno stopnje destabilizacije membrane.

Priloga A2

Podatki za vrednotenje stopnje destabilizacije celične membrane pri poskusu semi *in vitro*.

Preglednica A2-a. Ocene stopnje destabilizacije celične membrane pri poskusu semi *in vitro* po inkubaciji v suspenziji nevtralnih kobaltovo-feritnih nanodelcih.

kontrola	CF (0,1)	CF (1)	CF (10)	CF (100)	CF (1000)
1	1	1	1	4	8
1	1	2	1	2	6
1	1	2	3	5	7
3	2	3	2	6	8
1	5	2	6	9	4
2	1	3	2	4	8
1	2	1	1	2	3
2	3	2	2	5	6
p	0,558945	0,192875	0,331662	0,003091**	0,000892975**

Legenda: p = stopnja zaupanja, izračunana po Mann-Whitney-evem statističnem testu.

Statistično značilne razlike ($p < 0,01^{**}$) so prisotne pri koncentracijah 100 in 1000 $\mu\text{g/mL}$. V oklepajih so podane koncentracije suspenzij nanodelcev CoFe_2O_4 . Številke od 1 do 9 predstavljajo oceno stopnje destabilizacije membrane.

Preglednica A2-b. Ocene stopnje destabilizacije celične membrane pri poskusu semi *in vitro* po inkubaciji v suspenziji negativno nabitih kobaltovo-feritnih nanodelcih.

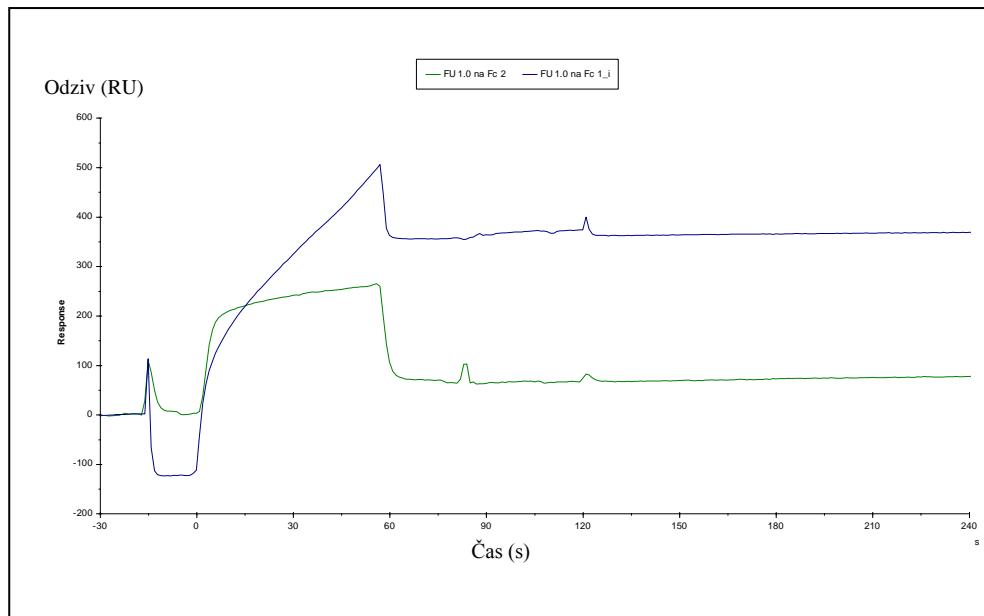
kontrola	CF-CA (0,1)	CF-CA (1)	CF-CA (10)	CF-CA (100)	CF-CA (1000)
1	1	1	1	2	2
1	2	1	2	1	4
1	1	1	2	2	2
2	3	2	2	4	2
1	2	4	1	2	2
2					
1					
p	0,266574	0,625582	0,343328	0,08604	0,0188177*

Legenda: p = stopnja zaupanja, izračunana po Mann-Whitney-evem statističnem testu.

Statistično značilne razlike ($p < 0,05^*$) so prisotne pri koncentraciji 1000 $\mu\text{g/mL}$. V oklepajih so podane koncentracije suspenzij nanodelcev $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$. Številke od 1 do 9 predstavljajo oceno stopnje destabilizacije membrane.

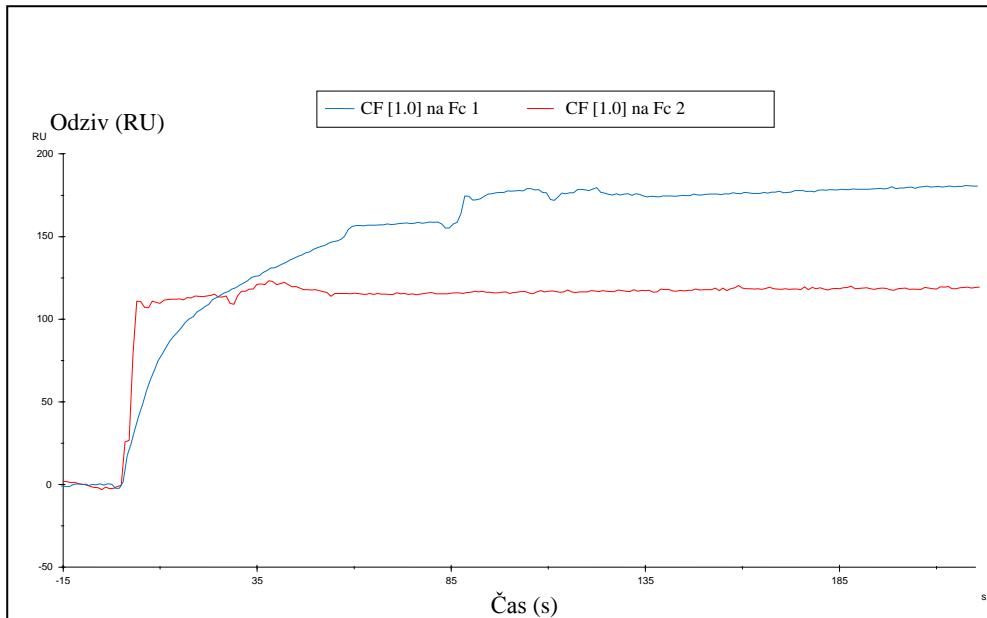
PRILOGA B 1

Slike vezave C_{60} (Fu) in $CoFe_2O_4$ (CF) na obe pretočni celici.



Slika B1-a: Vezava nanodelcev C_{60} (Fu) na pretočni celici Fc1 (modro) in Fc2 (zeleno).

Fc1 je oznaka za prvo pretočno celico, kamor liposomov nismo nanesli, podlaga za vezavo nanodelcev je le izvorni dekstranski matriks. Fc2 pa označuje drugo pretočno celico, kamor smo predhodno nanesli vezikle.

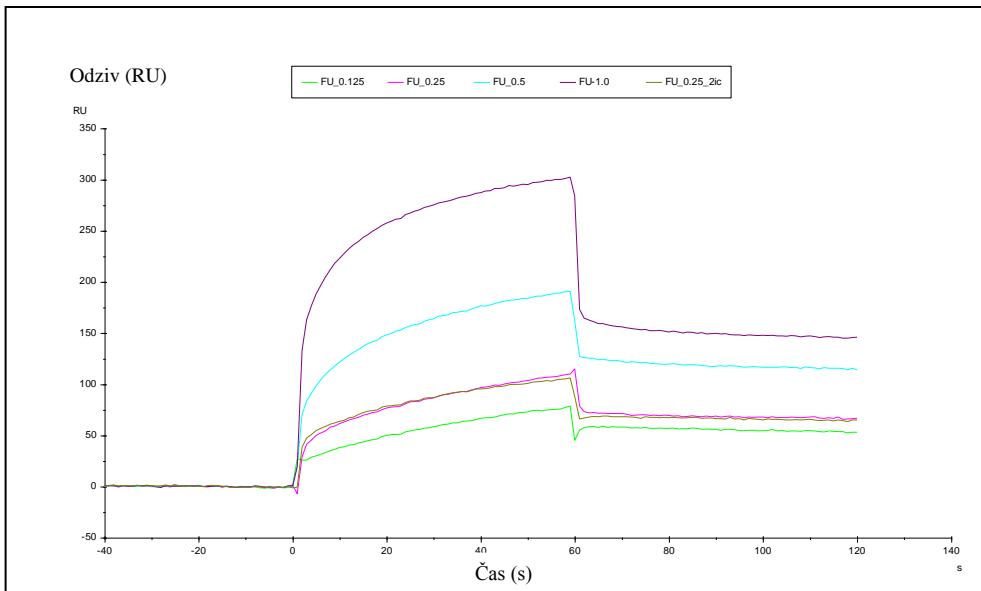


Slika B1-b: Vezava nanodelcev CoFe_2O_4 (CF) na pretočni celici Fc1(modro) in Fc2 (rdeče).

Fc1 je oznaka za prvo pretočno celico, kamor liposomov nismo nanesli, podlaga za vezavo nanodelcev je le izvorni dekstranski matriks. Fc2 pa označuje drugo pretočno celico, kamor smo predhodno nanesli vezikle.

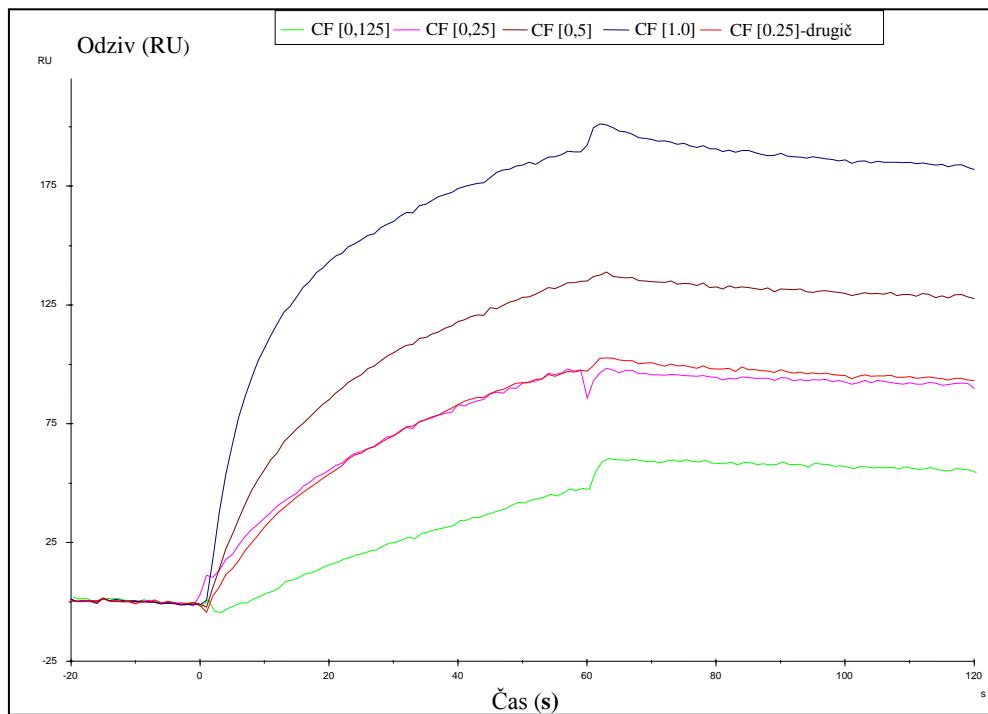
PRILOGA B 2

Slike nespecifične vezave C60 in CoFe₂O₄ na dekstranski matriks.



Slika B2-a: Nespecifična vezava fulerenov (Fu) na dekstranski matriks senzorskega čipa.

Vezava fulrenov naraščajoče koncentracije 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL in 1000 µg/mL na osnovo čipa BIAcore L1 – desktranski matriks. Koncentracijo 250 µg/mL smo nanesli dvakrat.



Slika B2-b: Nespecifična vezava nanodelcev (CF) na dekstranski matriks senzorskega čipa.

Vezava CF naraščajoče koncentracije 125 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ in 1000 $\mu\text{g/mL}$ na osnovo čipa BIACore L1 – desktranski matriks. Koncentracijo 250 $\mu\text{g/mL}$ smo nanesli dvakrat.