UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Veno KONONENKO

PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA S KVASOVKAMI Saccharomyces cerevisiae IN IZOPODI Porcellio scaber ZA TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Veno KONONENKO

PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA S KVASOVKAMI Saccharomyces cerevisiae IN IZOPODI Porcellio scaber ZA TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV

DIPLOMSKO DELO Univerzitetni študij

THE ADAPTATION OF COMET ASSAY WITH YEAST Saccharomyces cerevisiae AND ISOPOD Porcellio scaber FOR TESTING GENOTOXICITY OF NANOPARTICLES

GRADUATION THESIS University studies

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo je nastalo v okviru univerzitetnega študija biotehnologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen na Katedri za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija za študij 1. in 2. stopnje je na seji dne 20.06.2012 za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Romano Marinšek Logar in za recenzentko diplomskega dela prof. dr. Damjano Drobne.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica:	prof. dr. Branka JAVORNIK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
Članica:	prof. dr. Damjana DROBNE Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
Članica:	prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora:

Izjavljam, da je naloga rezultat lastnega raziskovalnega dela.

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

Veno KONONENKO

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 60(043.2)=163.6
- KG biotehnologija/kvasovke/*Saccharomyces cerevisiae*/izopodi/*Porcellio scaber*/kometni test/nanodelci/genotoksičnost/titanov dioksid/bakrov oksid
- KK AGRIS /
- AV KONONENKO, Veno
- SA MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2012
- IN PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA S KVASOVKAMI Saccharomyces cerevisiae IN IZOPODI Porcellio scaber ZA TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XV, 80 str., 27 pregl., 38 sl., 10 pril., 97 vir.
- IJ
- JI sl/en

sl

AI V zadnjem destetletju smo priča hitremu razvoju nanotehnologij ter porastu izdelave in uporabe nanodelcev za različne aplikacije. Sočasno z naraščanjem proizvodnje nanodelcev se povečuje tudi potreba po razvoju ustreznih metodologij za vrednotenje potencialnih negativnih vplivov njihove uporabe na žive organizme, saj so informacije o njihovi toksičnosti zaenkrat pomanjkljive. V okviru diplomske naloge smo prilagodili kometni test z uporabo kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875, s katerim smo testirali genotoksične učinke nanodelcev TiO₂ in CuO, prilagodili pa smo tudi kometni test z uporabo kopenskih rakov enakonožcev Porcellio scaber, s katerim smo testirali genotoksične učinke nanodelcev TiO₂. S spremljenjem rasti kvasovk in uporabo ATP-luciferaznega testa smo ugotovili, da nanodelci TiO₂ vplivajo na rast in energetsko stanje kvasovk. S kometnim testom na kvasovkah S. cerevisiae smo ugotovili, da TiO₂ lahko povzroči od koncentracije in velikosti delcev odvisne poškodbe DNA. Tudi s kometnim testom na izopodih P. scaber smo zaznali, da TiO₂ povzroča poškodbe DNA. Iz dobljenih rezultatov ni možno zaključiti, da nanodelci povzročijo poškodbe DNA in vivo, saj obstaja verjetnost, da so poškodbe DNA nastale med izvedbo kometnega testa preko neposrednih interakcij nanodelcev z genomsko DNA, ki zaradi lize celic ni več zaščitena s celično membrano in jedrnim ovojem.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 60(043.2)=163.6
CX	biotechnology/yeast/Saccharomyces cerevisiae/isopod/Porcellio
	scaber/comet assay/nanoparticles/genotoxicity/titanium dioxide/copper
	oxide
CC	AGRIS /
AU	KONONENKO, Veno
AA	MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme
	in Biotechnology
PY	2012
TI	THE ADAPTATION OF COMET ASSAY WITH YEAST Saccharomyces
	cerevisiae AND ISOPOD Porcellio scaber FOR TESTING
	GENOTOXICITY OF NANOPARTICLES
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XV, 80 p., 27 tab., 38 fig., 10 ann., 97 ref.
LA	sl
AL	sl/en

AB In the last decade we are witnessing the fast development of nanotechnology and the increasing manufacturing and usage of nanoparticles for many aplications. Simultaneously with increasing production of nanoparticles, because of the lack of information about their toxicity, the need is also increasing for development of metodologies for evaluating potencial negative efects of nanoparticles on living organisms. In this thesis, we have adapted the comet assay with yeast Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 for testing genotoxicity of TiO₂ and CuO nanoparticles. We have also adapted comet assay with terrestrial isopods Porcellio scaber in order to test genotoxicity of TiO₂ nanoparticles. By measurig the growth of the yeast and with ATP-luciferase test, we found that TiO₂ nanoparticles influence the yeast growth and its energetic condition. With comet assay on S. cerevisiae, which were exposed to TiO₂ nanoparticles, we detected the increase of DNA damages related to the particle size and concentration. We have determined the DNA damaging efect of TiO₂ nanoparticles also with the comet assay on P. scaber. From obtained results we can not conclude that nanoparticles induce DNA damages in vivo, due to possibillity that nanoparticles are interacting with genomic DNA during different steps of the comet assay protocol.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	IV
Kazalo preglednic	IX
Kazalo slik	XI
Kazalo prilog	XIV
Okrajšave in simboli	XV

1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	2
1.2 HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NANODELCI	3
2.1.1 Nanodelci titanovega dioksida (TiO2)	3
2.1.2 Nanodelci bakrovega (II) oksida (CuO)	5
2.2 GENOTOKSIČNOST NANODELCEV	6
2.2.1 Mehanizmi genotoksičnosti nanodelcev	6
2.2.2 Testiranje genotoksičnosti nanodelcev	7
2.3 KOMETNI TEST	8
2.4 ATP-LUCIFERAZNI TEST	11
2.5 POSKUSNI ORGANIZMI	12
2.5.1 Kvasovka Saccharomyces cerevisiae	12
2.5.2 Izopodni raki Porcellio scaber	14
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 POSKUSNI ORGANIZMI	16
3.1.1 Kvasovka Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875	16
3.1.2 Izopodi Porcellio scaber	16
3.2 PRIPRAVA SUSPENZIJ DELCEV TiO2 in CuO	16
3.3 RASTNA KRIVULJA KVASOVKE Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875	17

3.4 VPLIV NANODELCEV TiO ₂ NA RAST KVASOVK Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875	19
3.5 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA S KVASOVKAMI	
Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875	19
3.5.1 Prilagajanje kometnega testa s kvasovkami <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 1875	20
3.5.2 Postopek prilagojenega kometnega testa s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM1875	21
3.5.2.1 Priprava kemikalij	21
3.5.2.2 Protoplastiranje in spiranje kvasovk	23
3.5.2.3 Postopek kometnega testa s kvasovkami	23
3.5.2.4 Ocenjevanje poškodb jedrne DNA	23
3.5.3 Preverjanje ustreznosti prilagojenega postopka kometnega testa s kvasovkami <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 1875	24
3.6 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV TiO2 IN CuO S	
KVASOVKAMI Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875	24
3.6.1 Izpostavitev kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 1875 delcem TiO ₂ in CuO	24
3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 1875	26
 3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 s tripanskim modrilom 	26
 3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 s tripanskim modrilom 3.6.4 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 	26 28 28
 3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 s tripanskim modrilom 3.6.4 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.7 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber 	26 28 28 29
 3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 s tripanskim modrilom 3.6.4 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.7 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber 3.7.1 Izolacija celic iz hepatopankreasa Porcellio scaber 	26 28 28 29 29
 3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 s tripanskim modrilom 3.6.4 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.7 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber 3.7.1 Izolacija celic iz hepatopankreasa Porcellio scaber 3.7.1.1 Razbijanje tkiva s paličnim sonikatorjem 	26 28 29 29 30
 3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 s tripanskim modrilom 3.6.4 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.7 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber 3.7.1 Izolacija celic iz hepatopankreasa Porcellio scaber 3.7.1.1 Razbijanje tkiva s paličnim sonikatorjem 3.7.1.2 Soniciranje v ultrazvočni kopeli 	26 28 29 29 30 30
 3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 s tripanskim modrilom 3.6.4 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.7 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber 3.7.1 Izolacija celic iz hepatopankreasa Porcellio scaber 3.7.1.1 Razbijanje tkiva s paličnim sonikatorjem 3.7.1.2 Soniciranje v ultrazvočni kopeli 3.7.1.3 Razbijanje tkiva v terilnici 	26 28 29 29 30 30 30
 3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 s tripanskim modrilom 3.6.4 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.7 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber 3.7.1 Izolacija celic iz hepatopankreasa Porcellio scaber 3.7.1.1 Razbijanje tkiva s paličnim sonikatorjem 3.7.1.2 Soniciranje v ultrazvočni kopeli 3.7.1.3 Razbijanje tkiva v terilnici 3.7.1.4 Disociacija tkiva z uporabo encimov in EDTA 	26 28 29 30 30 30 30
 3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 s tripanskim modrilom 3.6.4 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.7 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber 3.7.1 Izolacija celic iz hepatopankreasa Porcellio scaber 3.7.1.1 Razbijanje tkiva s paličnim sonikatorjem 3.7.1.2 Soniciranje v ultrazvočni kopeli 3.7.1.3 Razbijanje tkiva v terilnici 3.7.1.4 Disociacija tkiva z uporabo encimov in EDTA 3.7.1.5 Razbijanje tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo 	26 28 29 30 30 30 30 30 30 32
 3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 s tripanskim modrilom 3.6.4 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.7 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber 3.7.1 Izolacija celic iz hepatopankreasa Porcellio scaber 3.7.1.1 Razbijanje tkiva s paličnim sonikatorjem 3.7.1.2 Soniciranje v ultrazvočni kopeli 3.7.1.3 Razbijanje tkiva v terilnici 3.7.1.4 Disociacija tkiva z uporabo encimov in EDTA 3.7.1.5 Razbijanje tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo 3.7.2 Preverjanje vpliva postopka izolacije celic oziroma jeder na poškodbe DNA s kometnim testom 	26 28 29 30 30 30 30 32 32
 3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 s tripanskim modrilom 3.6.4 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 3.7 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber 3.7.1 Izolacija celic iz hepatopankreasa Porcellio scaber 3.7.1.1 Razbijanje tkiva s paličnim sonikatorjem 3.7.1.2 Soniciranje v ultrazvočni kopeli 3.7.1.3 Razbijanje tkiva v terilnici 3.7.1.4 Disociacija tkiva z uporabo encimov in EDTA 3.7.2 Preverjanje tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo 3.7.2 Preverjanje vpliva postopka izolacije celic oziroma jeder na poškodbe DNA s kometnim testom 3.7.3 Preverjanje občutljivosti in ponovljivosti prilagojenega postopka kometnega testa z izopodi Porcellio scaber 	26 28 29 30 30 30 30 32 32 32 33

3.8.1 Izpostavitev izopodov Porcellio scaber	33
3.8.1.1 Prehranjevalni poskus z nanodelci TiO ₂	33
3.8.1.2 Peroralna aplikacija suspenzije nanodelcev TiO ₂ neposredno pred izvedbo kometnega testa	34
3.8.1.3 Nanos suspenzije nanodelcev TiO ₂ na minigel	34
3.8.2 Razbijanje tkiva	34
3.8.3 Postopek kometnega testa	34
3.8.4 Ocenjevanje poškodb DNA	35
3.9 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV KOMETNEGA TESTA	35
4 REZULTATI	36
4.1 VPLIV NANODELCEV TiO ₂ NA RAST KVASOVK Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875	36
4.1.1 Rastna krivulja kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875	36
4.1.2 Inhibicija rasti kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 1875 ob	
izpostavitvi nanodelcem TiO ₂	37
4.2 REZULTATI TESTIRANJA USTREZNOSTI PRILAGOJENEGA	
POSTOPKA KOMETNEGA TESTA S KVASOVKAMI Saccharomyces	
cerevisiae ZIM 1875	38
4.3 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV TiO ₂ IN CuO S	
KVASOVKAMI Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875	41
4.3.1 ATP-luciferazni test s kvasovkami <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 1875	41
4.3.2 Viabilnost kvasovk <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ZIM 1875, določena s tripanskim modrilom	42
4.3.3 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875	44
4.3.3.1 Genotoksičnost TiO ₂	44
4.3.3.2 Genotoksičnost CuO	47
4.4 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber	49
4.4.1 Izolacija celic iz hepatopankreasa Porcellio scaber	49
4.4.1.1 Razbijanje tkiva hepatopankreasa s paličnim sonikatorjem	49
4.4.1.2 Soniciranje v ultrazvočni kopeli	50
4.4.1.3 Razbijanje tkiva hepatopankreasa v terilnici	50
4.4.1.4 Disociacija tkiva hepatopankreasa z uporabo encimov in EDTA	50
4.4.1.5 Razbijanje tkiva hepatopankreasa z aspiracijo skozi injekcijsko iglo	52

442 Preverianie voliva postopka izolacije celic oziroma jeder
hepatopankreasa na poškodbe DNA s kometnim testom
4.4.2.1 Kometni test s celicami iz poskusov 2, 5, 10, 12, 15, 16, 17 in 1852
4.4.3 Občutljivost in ponovljivost prilagojenega postopka kometnega testa z izopodi <i>Porcellio scaber</i> 57
4.5 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV TiO ₂ S KOMETNIM TESTOM NA IZOPODIH <i>Porcellio scaber</i>
4.5.1 Rezultati kometnega testa z izopodi <i>Porcellio scaber</i> po prehranjevalnem poskusu z nanodelci TiO ₂ 59
4.5.2 Rezultati kometnega testa s <i>Porcellio scaber</i> po peroralni aplikaciji suspenzije nanodelcev TiO ₂ in z nanosom suspenzije nanodelcev TiO ₂ na minigel
4.5.3 Primerjava rezultatov kometnega testa z izopodi Porcellio scaber62
5 RAZPRAVA IN SKLEPI
5.1 RAZPRAVA
5.2 SKLEPI
6 POVZETEK
7 VIRI
ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava gojišča YPD	16
Preglednica 2: Uporabljeni nanodelci in makrodelci TiO ₂ in CuO	17
Preglednica 3: Koncentracije založnih suspenzij nanodelcev in makrodelcev TiO_2 in	
CuO ter njihova uporaba	17
Preglednica 4: Priprava založnih raztopin za izvedbo kometnega testa	22
Preglednica 5: Priprava delovnih raztopin za kometni test	22
Preglednica 6: Priprava agaroze za minigele	22
Preglednica 7: Podatki o uporabljenih suspenzijah delcev TiO ₂ in CuO, s katerimi	
smo tretirali kvasovke pred izvedbo ATP-luciferaznega testa in kometnega testa	25
Preglednica 8: Sestava fiziološke raztopine za Porcellio scaber	29
Preglednica 9: Jakost amplitude pri posameznih poskusih	30
Preglednica 10: Potek poskusov disociacije tkiva z uporabo encimov in EDTA	31
Preglednica 11: Statistični parametri rezultatov testiranja ustreznosti prilagojenega	
postopka kometnega testa s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875	40
Preglednica 12: Statistični parametri rezultatov testiranja genotoksičnosti TiO ₂ s	
kometnim testom na kvasovkah Saccharomyces cerevisiae ZIM 187	45
Preglednica 13: Statistična analiza podatkov kometnega testa s kvasovkami	
Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875, izpostvljenimi različnim koncentracijam TiO2	46
Preglednica 14: Statistični parametri rezultatov testiranja genotoksičnosti CuO s	
kometnim testom s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875	47
Preglednica 15: Statistična analiza podatkov kometnega testa s kvasovkami	
Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875, izpostvljenimi različnim koncentracijam CuO	48
Preglednica 16: Rezultati razbijanje tkiva s paličnim sonikatorjem	49
Preglednica 17: Rezultati poskusov disociacije tkiva z uporabo encimov in EDTA	50
Preglednica 18: Statistična analiza rezultatov kometnega testa s celicami	
hepatopankreasa, ki smo jih pridobili s pomočjo disociacije tkiva z uporabo	
kolagenaze in EDTA (poskus 17)	54
Preglednica 19: Statistični parametri rezultatov ocenjevanja poškodb DNA pri	
kometnem testu s celicami hepatopankreasa, ki smo jih pridobili s pomočjo	
disociacije tkiva z uporabo kolagenaze in EDTA (poskus 17)	55

Preglednica 20: Statistična analiza rezultatov kometnega testa s celicami
hepatopankreasa, pridobljenimi z razbijanjem tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo
(poskus 18)
Preglednica 21: Statistični parametri rezultatov ocenjevanja poškodb DNA pri
kometnem testu s celicami hepatopankreasa, pridobljenimi z razbijanjem tkiva z
aspiracijo skozi injekcijsko iglo (poskus 18)57
Preglednica 22: Statistična analiza rezultatov kometnega testa s celicami
hepatopankreasa, tretiranimi z različnimi koncentracijami H ₂ O ₂ 58
Preglednica 23: Statistični parametri rezultatov ocenjevanja DNA poškodb pri
kometnem testu s celicami hepatopankreasa, tretiranimi z različnimi koncentracijami
H ₂ O ₂
Preglednica 24: Statistična analiza rezultatov kometnega testa s Porcellio scaber po
prehranjevalnem poskusu z nanodelci TiO ₂ 60
Preglednica 25: Statistični parametri rezultatov kometnega testa s Porcellio scaber po
prehranjevalnem poskusu z nanodelci TiO ₂ 61
Preglednica 26: Statistični parametri rezultatov kometnega testa s Porcellio scaber po
peroralni aplikaciji suspenzije nanodelcev Ti O_2 in z nanosom suspenzije nanodelcev
TiO ₂ na minigel62
Preglednica 27: Statistična analiza rezultatov kometnega testa s Porcellio scaber

KAZALO SLIK

S	tr.
Slika 1: Slika agregiranih nanodelcev TiO ₂	.4
Slika 2: Slika aglomeriranih nanodelcev CuO	.5
Slika 3: Prikaz kometa z označenimi predeli1	10
Slika 4: Prikaz reakcije oksidacije luciferina v oksiluciferin	12
Slika 5:Slika kvasovke Saccharomyces cerevisiae1	13
Slika 6: Navadni prašiček (Porcellio scaber)1	14
Slika 7: Skica testnega organizma Porcellio scaber (A) in skica prebavnega sistema iz	
štirih cevk prebavnih žlez (hepatopankreas) in črevesa (B)	15
Slika 8: Prikaz Neubaurjeve števne komore za štetje celic z mikroskopom1	18
Slika 9: Brstenje kvasovk	20
Slika 10: Napačna avtomatska ocenitev repa (A) in ročni popravek (B)	24
Slika 11: Shematski prikaz priprave kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 za	
ATP-luciferazni test in kometni test	26
Slika 12: Rastna krivulja kvasovke Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875, izrisana na	
podlagi dveh meritev OD ₆₅₄	36
Slika 13: Rastna krivulja Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875, izrisana na podlagi	
štetja celic z uporabo Neubauerjeve komore	37
Slika 14: Koncentracija celic Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 med kultivacijo ob	
izpostavitvi nanodelcem TiO ₂	38
Slika 15: Porazdelitev vrednosti OTM pri negativni kontroli	39
Slika 16: Porazdelitev vrednosti OTM pri pozitivni kontroli	39
Slika 17: Porazdelitev vrednosti OTM pri negativni in pozitivni kontroli	40
Slika 18: Grafični prikaz koncentracije ATP v kulturi kvasovk Saccharomyces	
cerevisiae ZIM 1875 po 16-urni izpostavitvi različnim koncentracijam TiO ₂	41
Slika 19: Grafični prikaz koncentracije ATP v kulturi kvasovk Saccharomyces	
cerevisiae ZIM 1875 po 16-urni izpostavitvi različnim koncentracijam CuO	12
Slika 20: Viabilnost celic kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 po 16-urni	
izpostavitvi različnim koncentracijam TiO ₂	13
Slika 21: Viabilnost celic kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 po 16-urni	
izpostavitvi različnim koncentracijam CuO	13

Slika 22: Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk različnim
koncentracijam TiO ₂ 45
Slika 23: Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk različnim
koncentracijam CuO47
Slika 24: Slike kometov kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 187549
Slika 25: Slika vzorca razbitega tkiva hepatopankreasa, pridobljenega pri poskusu 12,
barvanega po Giemsi
Slika 26: Slika vzorca razbitega tkiva hepatopankreasa, pridobljenega pri poskusu 16,
barvanega po Giemsi
Slika 27: Slika minigela pri kometnem testu s hepatopankreasom razbitim s paličnim
sonikatorjem (poskus 2)
Slika 28: Slike kometov celic hepatopankreasa pri mehanskem razbijanju tkiva v
terilnici (poskus 5)
Slika 29: Slike kometov celic hepatopankreasa, ki so bile pridobljene z disociacijo
tkiva s kolagenazo (poskus 16)53
Slika 30: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri kometnem testu s celicami
hepatopankreasa, ki smo jih pridobili s pomočjo disociacije tkiva z uporabo
kolagenaze in EDTA (poskus 17)
Slika 31: Slike kometov celic hepatopankreasa, ki smo jih pridobili s pomočjo
disociacije tkiva z uporabo kolagenaze in EDTA (poskus 17) pri 100× povečavi55
Slika 32: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri kometnem testu s celicami
hepatopankreasa, pridobljenimi z razbijanjem tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo
(poskus 18)
Slika 33: Slike kometov celic hepatopankreasa, pridobljenimi z razbijanjem tkiva z
aspiracijo skozi injekcijsko iglo (poskus 18) pri 100× povečavi
Slika 34: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri tretiranju celic hepatopankreasa z
različnimi koncentracijami H ₂ O ₂
Slika 35: Povprečne vrednosti Tail DNA [%] različnih skupin živali
Slika 36: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri prehranjevalnem poskusu z
nanodelci TiO ₂

Slika 37: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri kometnem testu s Porcellio scaber	
po peroralni aplikaciji suspenzije nanodelcev TiO ₂ in po nanosu suspenzije nanodelcev	
TiO ₂ na minigel	61
Slika 38: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri kometnem testu s Porcellio scaber	
ob različnih tretiranjih	62

KAZALO PRILOG

Priloga A: Podatki za izris rastne krivulje Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Priloga B: Podatki o koncentracijah celic Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 ob izpostavitvi nanodelcem TiO_2

Priloga C: Statistična analiza rezultatov testiranja ustreznosti prilagojenega postopka kometnega testa s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875

Priloga D: Podatki o koncentracijah ATP v kulturi kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 po 16-urni izpostavitvi nanodelcem TiO₂ in CuO

Priloga E: Podatki o viabilnosti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* po 16-urni izpostavitvi TiO₂ in CuO, določeni z barvanjem celic s tripanskim modrilom

Priloga F: Grafični prikaz rezultatov ocenjevanja poškodb DNA pri posameznih minigelih pri tretiranju kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* s TiO₂

Priloga G: Grafični prikaz rezultatov ocenjevanja poškodb DNA pri posameznih minigelih pri tretiranju kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* s CuO

Priloga H: Grafični prikaz rezultatov ocenjevanja poškodb DNA pri posameznih minigelih pri testiranju občutljivosti in ponovljivosti prilagojenega postopka kometnega testa z izopodi *Porcellio scaber*

Priloga I: Grafični prikaz rezultatov ocenjevanja poškodb DNA pri posameznih minigelih po prehranjevalnem poskusu z nanodelci TiO₂

Priloga J: Grafični prikaz rezultatov ocenjevanja poškodb DNA pri posameznih minigelih pri testiranju vpliva prisotnosti nanodelcev TiO₂ med izvedbo kometnega testa

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	Adenozin-5'-trifosfat		
DNA	Deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribonucleic acid)		
DTT	Ditiotreitol		
EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina (angl. ethylenediaminetetraacetic		
	acid)		
EtBr	Etidijev bromid		
IARC	Mednarodna agencija za raziskovanje raka (angl. International		
	Agency for Research on Cancer)		
LMP agaroza	Agaroza z nizko temperaturo tališča (angl. Low Melting Point		
	agarose)		
NMP agaroza	Agaroza z običajno temperaturo tališča (angl. Normal Melting Point		
	agarose)		
OD ₆₅₄	Optična gostota merjena pri valovni dolžini svetlobe λ =654 nm		
	(angl. Optical Density)		
ORF	Odprt čitalni okvir (angl. Open Reading Frame)		
OTM	Repni moment po Olivu (angl. Olive Tail Moment)		
RCF	Relativna centrifugalna sila (angl. Relative Centrifugal Force)		
RLU	Relativne svetlobne enote (angl. Relative Luminescence Unit)		
RNS	Reaktivne dušikove zvrsti (angl. Reactive Nitrogen Species)		
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti (angl. Reactive Oxygen Species)		
SCGE	Gelska elektroforeza posameznih celic (angl. Single Cell Gel		
	Electrophoresis)		
SEM	Vrstični elektronski mikroskop (angl. scanning electron		
	microscope)		
Tail DNA [%]	Delež DNA v kometnem repu, izražen v %		
TEM	Presevni elektronski mikroskop (angl. Transmission electron		
	microscope)		
UV/Vis svetloba	Ultravijolična/vidna svetloba (angl. Ultra Violet/Visible light)		
ZIM	Zbirka Industrijskih Mikroorganizmov		

1 UVOD

Z razvojem in uspehi nanotehnologije se povečuje proizvodnja in uporaba nanodelcev, ki se uporabljajo za različne aplikacije. Že dandanes se nanodelci proizvajajo v tonskih količinah, v prihodnosti pa je predviden nadaljnji porast njihove proizvodnje in proizvodnja novih vrst nanodelcev (Oberdörster in sod., 2005). Sočasno s povečevanjem proizvodnje in uporabe nanodelcev se povečuje tudi potreba po toksikološki oceni o potencialnih negativnih vplivih njihove uporabe na žive organizme in okolje, saj je poznavanje vplivov nanodelcev na biološke sisteme ključnega pomena za njihovo varno proizvodnjo, uporabo in odstranjevanje iz obtoka.

Čeprav je bilo do sedaj izvedenih že več toksikoloških raziskav nanodelcev, so podatki o njihovih toksičnih vplivih in mehanizmih genotoksičnosti trenutno pomanjkljivi (Yang in sod., 2009; Landsiedel in sod., 2009.; Pfaller in sod., 2010). Številne nanotoksikološke raziskave so se osredotočile na preučevanje citotoksičnosti, ki pa pogosto nastopi pri visokih koncentracijah nanodelcev, pri nižjih koncentracijah pa pride do učinkov, ki ne vodijo nujno do celične smrti. Med pomembnejše take učinke sodijo poškodbe DNA; povečana genetska nestabilnost je namreč pogosto povezana z razvojem raka (Karlsson, 2010).

S kometnim testom lahko hitro in relativno enostavno ocenimo vpliv različnih kemikalij in drugih dejavnikov na poškodbe DNA. Kometni test predstavlja občutljivo in fleksibilno metodo, s katero lahko vrednotimo genotoksične učinke na ravni posameznih celic. Večina dosedanjih raziskav genotoksičnosti nanodelcev je bila izvedena *in vitro* na celičnih kulturah (Trouiller in sod., 2009; Karlsson, 2010), pri čemer nam pridobljeni rezultati nudijo le omejene informacije, ki ne odražajo nujno dejanskega stanja v pogojih *in vivo*. Za ocenjevanje poškodb DNA s kometnim testom potrebujemo suspenzijo posameznih celic, kar otežuje njegovo uporabo pri testiranjih genotoksičnosti *in vivo* s celicami kompaktnih tkiv, saj je pri tem potreben postopek izolacije celic, ki ne povzroči poškodb jedrne DNA.

1.1 NAMEN DELA

Ker je bila do sedaj genotoksičnost nanodelcev največkrat testirana *in vitro* na celičnih kulturah (Trouiller in sod., 2009; Karlsson, 2010), smo želeli optimizirati kometni test za testiranja genotoksičnosti nanodelcev *in vivo*.

Namen dela diplomske naloge je bil prilagoditi kometni test s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* za testiranje genotoksičnih vplivov nanodelcev TiO₂ in CuO. S spremljanjem dinamike rasti in z ATP-luciferaznim testom smo najprej želeli preveriti vpliv nanodelcev na rast in metabolizem kvasovk, nato pa smo s kometnim testom želeli testirati njihove genotoksične učinke. Za testiranje genotoksičnih vplivov s kometnim testom smo se odločili zaradi ključnih prednosti kometnega testa, kot so enostavnost in visoka občutljivost metode ter možnost uporabe različnih tipov celic. Dejstvo, da so kvasovke *S. cerevisiae* eden izmed najbolje preučenih evkariontskih organizmov, in visoka občutljivost kometnega testa nakazujeta, da je kometni test s kvasovkami ustrezna in uporabna metoda za preučevanje poškodb DNA. Celice kvasovk so se v primerjavi s celicami sesalcev izkazale kot izredno občutljive za genotoksične vplive (Miloshev in sod., 2002).

Želeli smo tudi prilagoditi kometni test s celicami hepatopankreasa izopodov *Porcellio scaber*, s čimer bi ocenili genotoksične učinke nanodelcev TiO_2 na celice hepatopankreasa po peroralni aplikaciji.

1.2 HIPOTEZE

Predvidevamo, da nanodelci TiO_2 in CuO vplivajo na vsebnost ATP v kulturi kvasovk Saccharomyces cerevisiae.

Predvidevamo, da bomo uspeli prilagoditi kometni test s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* in izopodi *Porcellio scaber*, s čimer bomo pridobili možnost testiranja genotoksičnih učinkov nanodelcev *in vivo*.

Predvidevamo, da lahko nanodelci TiO_2 in CuO povzročijo poškodbe DNA pri kvasovkah *S. cerevisiae* in da lahko nanodelci TiO_2 povzročijo poškodbe DNA pri celicah hepatopankreasa *P. scaber*.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANODELCI

Nanodelci so vsi delci, pri katerih je vsaj ena dimenzija manjša od 100 nm (Rengasamy in sod., 2008). Nanodelci v naravi nastajajo spontano ob naravnih procesih (vulkanski izbruhi, erozije...), v okolje pa se sproščajo tudi s človeško dejavnostjo (v motorjih z notranjim izgorevanjem, kot stranski produkt industrijskih procesov...). Z razvojem nanotehnologije pa se povečuje izdelava in uporaba načrtno proizvedenih – inženirskih nanodelcev, ki jih lahko s pridom uporabljamo za različne aplikacije, s tem pa se povečuje tudi možnost njihovega uhajanja v okolje in izpostavljenost živih organizmov nanodelcem (Remškar, 2009).

Z manjšanjem velikosti delcev se povečuje razmerje med površino in maso delcev, s čimer se delcem spremenijo fizikalne, kemijske, mehanske, optične in tudi magnetne lastnosti. Zaradi specifičnih lastnosti nanodelcev je njihovo področje uporabe zelo široko. Uporabljajo se v elektroniki, medicini, kozmetični in tekstilni industriji, preučujejo pa se tudi nova področja uporabe (Wise in sod., 2010).

Uporaba nanodelcev v industriji lahko prinese veliko prednosti, pri tem pa se je potrebno zavedati, da lahko snovi, ki jih običajno smatramo kot biološko inertne, postanejo v nanodimenzijah toksične, zaradi njihove povečane reaktivnosti in lažje penetracije v organizem in celice (Reeves in sod., 2008; Donaldson in sod., 2010). Zaenkrat še ni povsem znano, kako spremenjene lastnosti delcev v nanodimenzijah vplivajo na varnost produktov (Wise in sod., 2010).

2.1.1 Nanodelci titanovega dioksida (TiO₂)

Nanodelci TiO₂ so slabo topni delci, ki se proizvajajo v velikih količinah po celem svetu. Uporabljajo se za različne aplikacije v kozmetični, farmacevtski industiji ter industriji barvil (Trouiller in sod., 2009; Wnag in sod., 2007), v nanomedicini pa se preučujejo možnosti njihove uporabe kot nosilcev zdravil (Vandghanooni in Eskandani, 2011). Nanodelci TiO₂ se uporabljajo kot UV zaščitno sredstvo v sončnih kremah, za fotokatalitično čiščenje vode, v prihodnosti pa se predvideva njihova uporaba pri izdelavi nove generacije solarnih celic (Aruoja in sod., 2009).

Čeprav je TiO₂ kemijsko inerten, lahko njegovi nanodelci negativno učinkujejo na zdravje (Trouiller in sod., 2009). Novejše raziskave na modelnih živalih (podgane, miši) so pokazale, da lahko nanodelci TiO₂ povzročijo vnetnostni odziv, fibrozo in pljučni tumor ter poškodbe DNA pri celičnih kulturah (na celicah CHO – angl. *Chinese hamster ovary cells*,

celicah SHE – angl. *Syrian hamster embryo fibroblasts*, ter na celicah HLB – angl. *human lymphoblastoid cells*) (Xu in sod. 2009). Tako je bil TiO₂ pred kratkim s strani mednarodne agencije za raziskovanje raka IARC (angl. *International Agency for Research on Cancer*) reklasificiran v skupino karcinogenov 2B (potencialni karcinogeni za ljudi) (Trouiller in sod., 2009).

Molekularni mehanizem genotoksičnosti TiO₂ je slabo preučen (Xu in sod., 2009; Trouiller in sod., 2009), iz raziskav pa je razvidno, da lahko nanodelci TiO₂ v celicah sprožijo nastanek oksidativnega stresa ali pa vnetnostni odziv (Trouiller in sod., 2009), možne so pa tudi direktne interakcije nanodelcev TiO₂ z DNA (Li in sod., 2008; Zhu in sod., 2007). Opravljenih je bilo že več raziskav genotoksičnosti TiO₂ (Vandghanooni in Eskandani, 2011), pri čemer je pri približno polovici raziskav prišlo do pozitivnega rezultata (Trouiller in sod., 2009). Vzrok za variabilnost rezultatov je verjetno uporaba različnih celičnih tipov, različnih koncentracij oz. doz in velikosti nanodelcev TiO₂ (Trouiller in sod., 2009). Rezultati več raziskav nakazujejo povečano genotoksičnost nanodelcev TiO₂ ob izpostavitvi UV/Vis svetlobi (Nakagawa in sod., 1997).



Slika 1: Slika agregiranih nanodelcev TiO_2 (Avtor fotografije: Peter Dušak) Prikaz nanodelcev TiO_2 , s katero smo tretirali kvasovke pri ATP-luciferaznem testu in kometnem testu. Slika je posneta s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM). Na sliki A so vidni agregati nanodelcev TiO_2 , veliki več 100 nm. Na sliki B so vidni nanodelci TiO_2 , združeni v agregat.

2.1.2 Nanodelci bakrovega (II) oksida (CuO)

Nanodelci bakrovega oksida (CuO) se zaradi svojih specifičnih lastnosti uporabljajo v številnih aplikacijah. Zaradi učinkovite termične in električne prevodnosti se uporabljajo za izdelavo elektronskih vezij, baterij, plinskih senzorjev in tekočin za prenos toplote. Ker delujejo tudi antibiotično, se uporabljajo tudi v različnih protimikrobnih pripravkih (Aruja in sod., 2009; Gomes in sod., 2012)

Uporaba nanodelcev CuO se v številnih industrijskih in komercialnih aplikacijah povečuje, kar zbuja skrb, saj je njihova toksičnost, v primerjavi z ostalimi nanodelci kovinskih oksidov, slabo preučena. Toksičnost nanodelcev CuO se pogosto pripisuje disociaciji Cu²⁺ ionov od delcev, vendar kljub temu velik obseg učinkov izhaja iz specifičnih lastnosti delcev (Gomes in sod., 2012).

Nanodelci CuO nimajo le antibiotičnih učinkov, ampak imajo lahko tudi citotoksične in genotoksične učinke. Baker iz bakrovih delcev lahko kot redoks kovina sodeluje pri Fentonovi in Haber-Weissovi reakciji, kar vodi v produkcijo ROS in oksidativni stres. (Moriwaki in sod., 2008; Gomes in sod., 2012).



Slika 2: Slika aglomeriranih nanodelcev CuO (Avtor fotografije: Peter Dušak)

Prikaz nanodelcev CuO, s katero smo tretirali kvasovke pri ATP-luciferaznem tesu in kometnem testu. Slika je posneta s presevnim elektronskim mikroskopom (TEM). Na slikah A in B so vidni šibko aglomerirani nanodelci CuO, velikosti od nekaj 10 do 250 nm.

2.2 GENOTOKSIČNOST NANODELCEV

Čeprav je bilo izvedenih že več toksikoloških raziskav nanodelcev, je trenutno malo znanega o njihovih genotoksičnih učinkih (Landsiedel in sod., 2009.; Pfaller in sod., 2010). Genotoksičnost delcev je odvisna tako od njihove kemijske sestave, kot tudi od njihove velikosti in oblike (Yang in sod., 2009), pri tem pa ni povsem znano, kakšen vpliv ima posamezna lastnost na biološke učinke. Na splošno velja, da se z manjšanjem velikosti delcev povečuje njihov biološki učinek (Monosson, 2010).

Genotoksični vplivi lahko nastanejo že pri znatno nižjih koncentracijah nanodelcev od tistih, ki izzovejo direktno citotoksičnost (Pfaller in sod., 2010).

2.2.1 Mehanizmi genotoksičnosti nanodelcev

Poznanih je več možnih mehanizmov, preko katerih lahko nanodelci povzročijo nastanek poškodb DNA. Nanodelci lahko izzovejo poškodbe genetskega materiala preko primarnega (direktnega ali indirektnega) ali preko sekundarnega vpliva (Donaldson in sod., 2010).

Direktni primarni vpliv nastane, ko nanodelci vstopijo v celično jedro. V celično jedro lahko prodrejo zlasti tisti nanodelci, ki so namensko dizajnirani za prodor v rakave celice, nanodelci za vnos zdravil ter nanodelci, ki se uporabljajo za diagnostično vizualizacijo (Tkachenko in sod., 2003; Nativo in sod., 2008; Chen in von Mikecz, 2005). Če nanodelci preidejo jedrno membrano in vstopijo v celično jedro, lahko pridejo v direkten stik z genomsko DNA ali s proteini, povezanimi z DNA, kar lahko povzroči poškodbe dednega materiala (Vandghanooni in Eskandani, 2011). Potencialno možnost za prodor nanodelcev v jedro predstavlja prosta difuzija nanodelcev znotraj celice (Geiser s sod., 2005). Direkten vpliv nanodelcev je možen tudi med mitotično delitvijo, ko jedrna membrana razpade, pri čemer lahko nanodelci ovirajo ločevanje kromosomov, kar privede do nastanka mikrojedr (Asharani in sod., 2009; Gonzalez in sod., 2008).

Večji delci in agregati nanodelcev pa običajno ne morejo prodreti v jedro, saj je premer jedrnih por manjši od 8 nm (Terry in sod., 2007), kljub temu pa lahko sprožijo nastanek poškodb DNA (Donaldson in sod., 2010). Indirektna genotoksičnost nanodelcev je običajno posledica oksidativnega stresa, ki je definiran kot porušeno ravnotežje med tvorbo prostih radikalov in intracelularno vsebnostjo antioksidantov (Betteridge, 2000). Pri oksidativnem stresu pride do povečane intracelularne produkcije reaktivnih kisikovih spojin (ROS – angl. *Reactive Oxygen Species*) ali dušikovih spojin (RNS – angl. *Reactive Nitrogen Species*), kar lahko vodi do oksidativnih poškodb proteinov, lipidov in DNA (Pfaller in sod., 2010; Yang in sod., 2009).

Nanodelci lahko sprožijo povečano produkcijo ROS preko interakcij z mitohondriji ali membransko vezane NADPH oksidaze (Donaldson in sod., 2010). Obstajajo pa tudi dokazi, da nanodelci lahko vplivajo na zmanjšano vsebnost antioksidantov v celici (npr. glutationa), s čimer se poveča verjetnost nastanka oksidativnih poškodb DNA, povzročenih s prostimi radikali (Park in sod., 2008; Li in sod., 2009; Wang in sod., 2009).

Indirektni genotoksični vplivi z nanodelci lahko nastanejo tudi preko inhibicije proteinov, ki sodelujejo pri popravljalnih mehanizmih DNA (Beyersmann in Hartwig, 2008). Nanodelci in intracelularni kovinski ioni, ki se sprostijo iz delcev, lahko povečajo permeabilnost membrane lizosomov, kar lahko privede do sprostitve DNaz v citoplazmo in le-te bi lahko prišle v jedro in v kontakt z genomsko DNA (Banasik in sod., 2005).

Sekundarna genotoksičnost nanodelcev je posledica sekundarnega odziva, ki se sproži preko aktivacije molekularnih poti (Pfaller in sod., 2010). Sekundarno genotoksičnost vodijo vnetnostne celice, ki na mestu odlaganja nanodelcev sproščajo reaktivne spojine, ki lahko poškodujejo DNA. Sekundarna genotoksičnost je torej posledica oksidativnega stresa, a v tem primeru predstavljajo levkociti vir oksidantov (Donaldson in sod., 2010).

Trenutno še ni povsem jasno, kateri nanodelci lahko sprožijo poškodbe DNA (Donaldson in sod., 2010).

2.2.2 Testiranje genotoksičnosti nanodelcev

Genotoksične učinke nanodelcev lahko testiramo z uporabo različnih metod na različnih celicah *in vivo* ali *in vitro* (Landsiedel in sod., 2009). Do sedaj je bilo največ raziskav genotoksičnosti nanodelcev narejenih s kometnim testom (Vandghanooni in Eskandani, 2011; Landsiedel in sod., 2009; Karlsson, 2010), ki se je izkazal kot ena izmed najbolj občutljivih metod testiranja genotoksičnosti (Lah in sod., 2005). Upoštevajoč visoko občutljivost kometnega testa in reaktivnost številnih nanodelcev, ni presenetljivo, da so do sedaj pri večini testiranih nanodelcev s kometnim testom zaznali oksidativne poškodbe in prelome DNA. Potrebno pa se je zavedati, da lahko prisotnost nanodelcev ob celicah tekom izvedbe kometnega testa privede do lažnih pozitivnih rezultatov (Karlsson, 2010).

Poleg kometnega testa sta bila do sedaj za testiranje genotoksičnih vplivov nanodelcev pogosto uporabljena tudi mikronukleusni test, ki se je izkazal kot visoko občutljiva metoda, in bakterijski test Ames, ki pa je bil skoraj vedno negativen, saj bakterijska celična stena verjetno onemogoča vdor nanodelcem (Landsiedel in sod., 2009).

Pri testiranju genotoksičnih vplivov nanodelcev je potrebno vedeti, da so nanodelci v suspenzijah zaradi privlačnih sil nagnjeni k aglomeraciji v skupke večje od 100 nm, s

čimer se lahko zmanjša njihov biološki učinek. Vendar so ti aglomerati verjetno nestabilni, tako da v telesnih tekočinah in tkivih lahko disociirajo (Trouiller in sod., 2009). Biodostopnost lahko povečamo z deaglomeracijo skupkov v suspenzijah nanodelcev, za kar se običajno uporablja soniciranje (Handy in sod., 2008; Vippola in sod., 2009), pri tem pa se je potrebno zavedati, da med soniciranjem kovinskih nanodelcev lahko pride do sproščanja ionov (Lee in sod., 2008).

Raziskave genotoksičnosti so pogosto težavne zaradi velike raznolikosti nanodelcev. Na dobljeni rezultat poleg same kemijske sestave delcev vplivajo tudi številni drugi dejavniki, kot so način izpostavitve, eksperimentalni pogoji, uporabljena koncentracija oz. doza, velikost in oblika delcev ter potencialni premazi delcev, njihov naboj in stabilnost. Na potencialne interakcije nanodelcev z biološkimi sistemi vpliva tudi okolje, v katerem se nanodelci nahajajo, in stopnja agregacije oz. aglomeracije delcev (Pfaller in sod., 2010). Nekatere raziskave so celo pokazale, da lahko organske snovi, ki se uporabljajo pri sintezi nanodelcev, same povzročijo toksične učinke (Kovochich in sod., 2009). Zaradi vseh naštetih dejavnikov je primerjava rezultatov različnih raziskav genotoksičnosti nanodelcev pogosto težavna, hkrati pa primerjavo otežuje tudi uporaba različnih bioloških modelov, različnih testnih postopkov in različna obdelava dobljenih podatkov (Xu in sod., 2009). Tako ne preseneča dejstvo, da na to temo v literaturi najdemo veliko nasprotujočih si podatkov (Pfaller in sod., 2010).

2.3 KOMETNI TEST

Kometni test, imenovan tudi elektroforeza posameznih celic (SCGE – angl. *Single Cell Gel Electrophoresis*), je hitra in občutljiva metoda za dokazovanje poškodb in popravil DNA pri posameznih celicah (Buschini in sod., 2001)

Kometni test sta leta 1984 razvila Östling in Johanson (Östling in Johanson, 1984), ker pa sta elektroforezo izpeljala pri nevtralnih pogojih, sta lahko zaznala le dvoverižne prelome DNA (Fairbairn in sod., 1995). Kasneje, leta 1988, so Singh in sodelavci predstavili alkalno verzijo kometnega testa, pri kateri je elektroforeza potekala pri alkalnih pogojih (pH vrednost nad 13) (Singh in sod., 1988). Z alkalno verzijo kometnega testa je možno zaznati tudi enoverižne prelome DNA in alkalno labilna mesta (Yang in sod., 2009). Ker večina genotoksičnih snovi povzroči večje število enoverižnih prelomov in alkalno labilnih mest kot dvoverižnih zlomov, je alkalna različica kometnega testa bolj občutljiva za identifikacijo genotoksičnih vplivov (Tice in sod., 2000). Leta 1990 je Olive s sod. predstavil novo različico alkalne metode, pri kateri je DNA izpostavljena elektroforezi pri pH=12,3 (Olive in sod., 1990).

Na splošno velja, da se DNA odvije in denaturira pri pH vrednosti nad 12,0 zaradi prekinitve vodikovih vezi v dvojni vijačnici DNA. Alkalno labilna mesta se pretvorijo v

prelom pri pH vrednosti nad 12,6. Pri pH vrednosti nad 13 pa se ekspresija alkalno labilnih mest kot tudi enoverižnih prelomov maksimizira (Tice in sod., 2000).

Kometni test ima v primerjavi z ostalimi testi genotoksičnosti več prednosti, kot so možnost vrednotenja poškodb DNA na ravni posameznih celic, visoka občutljivost za zaznavo nizkih stopenj poškodb DNA, potreba po nizkem številu celic na vzorec, fleksibilnost metode za različne potrebe eksperimetov, nizka cena ter enostavna in hitra izvedba testa (Vandghanooni in Eskandani, 2011). Z uporabo za poškodbe specifičnih endonukleaz, ki jih dodamo za kratek čas po celični lizi, lahko zaznamo nekatere specifične vrste poškodb DNA (Speit in Hartmann, 1999). Kometni test nam omogoča zaznavo poškodb DNA v kratkem času po poškodbi, pred popravilom poškodovane DNA (Buschini in sod., 2001) in brez potrebe po nastopu mitoze (Cotelle in Férard, 1999). Tako nam kometni test omogoča preučevanje širokega spektra vprašanj v biologiji, medicini in toksikologiji (Fairbairn in sod., 1995).

Pomembna omejitev komenega testa je, da za ocenjevanje poškodb DNA potrebujemo suspenzijo posameznih celic (Cotelle in Férard, 1999). Slabost kometnega testa predstavlja tudi nezmožnost razlikovanja med poškodbami DNA, ki nastanejo zaradi genotoksičnih vplivov preučevane snovi, in tistimi, ki so posledica odmrtja celic oz. apoptoze (Wnag in sod., 2007). Zato je potrebno pred pripravo celic za kometni test preveriti stopnjo njihove viabilnosti, ki mora biti vsaj 80 % (Vandghanooni in Eskandani, 2011), da se izognemo lažnim pozitivnim rezultatom zaradi citotoksičnosti (Henderson in sod., 1998).

Za kometni test je celice potrebno pripravit na način, ki ne sproži dodatnih poškodb DNA, hkrati pa ne omogoči popravila poškodb (Vandghanooni in Eskandani, 2011). Da se izognemo dodatnim poškodbam DNA, je potrebno vse postopke s celicami izvajati v temnem prostoru (Speit in Hartmann, 1999) in pri nizki temperaturi (4 °C) (Henderson in sod., 1998). Celice, obdane z agarozo, nanesemo na mikroskopsko stekelce, čemur sledi celična liza z detergenti in tretiranje s soljo. Po celični lizi izvedemo elektroforezo sproščenega kromatina, pri čemer električni tok omogoči premik negativno nabite poškodovane DNA proti anodi, kar vodi v nastanek strukture, podobne kometu (slika 3). Po elektroforezi minigele pobarvamo s fluorescentnim barvilom, s čimer omogočimo vizualizacijo DNA s fluorescentno mikroskopijo. Tako dobimo sliko glave kometa, ki vsebuje intaktno DNA, in sliko repa, ki vsebuje poškodovane ali zlomljene fragmente DNA (Vandghanooni in Eskandani, 2011). Sledi ocenjevanje poškodb DNA ustrezno velikega števila naključnih celic (Vandghanooni in Eskandani, 2011). Ocenjevanje lahko poteka vizualno, pri čemer ocenjujemo poškodbe DNA na podlagi slik kometov s prostim očesom (Collins in sod., 1997) ali pa s pomočjo analize slike z ustreznim programskim paketom (Collins, 2004).

Stopnjo poškodb DNA lahko ocenimo na osnovi različnih parametrov, kot so dolžina repa, delež DNA v repu in repni moment. Dolžina repa (Tail length) se povečuje le pri relativno majhni stopnji poškodovanosti DNA, pri večjih poškodbah pa se ne spreminja, povečuje pa se intenziteta obarvanosti repa (Tail DNA [%]) (Collins, 2004). Repni moment (TM) pa vključuje tako velikosti migrirane DNA (kar se izrazi v dolžini repa) kot tudi število prelomov (predstavljeno z deležem DNA v repu) (Fairbairn in sod., 1995). Repni moment po Olivu (OTM – angl. *Olive Tail Moment*) (Olive in sod., 1990). Repni moment po Olivu se izračuna po naslednji enačbi:

OTM = razdalja med težiščem glave in težiščem repa × Tail DNA [%] × 0,01 ... (1)

Tail DNA [%]... delež DNA v repu kometa



Slika 3: Prikaz kometa z označenimi predeli (Avtor slike: Veno Kononenko)

2.4 ATP-LUCIFERAZNI TEST

Metabolni procesi v celicah so povezani s prenosom energije z molekulo adenozin trifosfat (ATP) (Boyer, 2005). ATP je univerzalen prenašalec energije pri metabolnih reakcijah v vseh živih celicah in ob celični smrti hitro propade (Stanley, 1986). Ker je vsebnost ATP v metabolno aktivnih celicah relativno konstantna (Jeršek, 2009), lahko z merjenjem celičnega ATP ocenimo število živih celic v danem vzorcu (Lundin, 2000). Ob izpostavitvi celic škodljivim vplivom se z večanjem toksičnega vpliva zmanjšuje koncentracija živih celic, kar zaznamo z zmanjšanjem koncentracije ATP (Dazell in Christofi, 2002). Potrebno pa se je zavedati, da imajo mikrobne celice v stacionarni fazi rasti ter celice v stresu nižje vsebnosti ATP (Jeršek, 2009).

Bioluminescenčni ATP-luciferazni test je hitra, občutljiva, natančna in ponovljiva metoda za merjenje znotrajcelične vsebnosti ATP (Fajdiga in sod., 2002; Chen in Cushion, 1994). ATP-luciferazni test je bil razvit z namenom testiranja viabilnosti celic (Lundin in sod.,1986). Poleg testiranja viabilnosti različnih vrst celic lahko ATP-luciferazni test uporabljamo tudi za odkrivanje in ugotavljanje števila mikroorganizmov v kliničnih vzorcih (Chen in Cushion, 1994; Selan in sod., 1992). Z ATP-luciferaznim testom lahko merimo vpliv različnih snovi na proliferacijo celic, poleg tega pa nam test posreduje tudi informacijo o subletalnih celičnih poškodbah, saj se produkcija ATP pri številnih oblikah celičnega stresa začasno zmanjša. Tako je možno oceniti začasno toksičnost, in pregledati tako od doze kot od časa odvisen odziv (Cree in Andreotti, 1977). Variacija rezultatov znotraj posameznega poskusa in med poskusi je običajno manjša od 10% (Andreotti in sod., 1995).

Vsebnost ATP zaznamo preko substratno encimskega sistema luciferin-luciferaza iz kresničke *Photinus pyralis* (Stanley, 1986). Pri reakciji (slika 4), ki zahteva prisotnost ATP, nastaja svetloba, katere količina je premo sorazmerna s količino ATP v vzorcu (Patterson in sod., 1970). Oddano svetlobo pri reakciji izmerimo z luminometrom pri valovni dolžini 562 nm, ki nam poda rezultat v relativnih svetlobnih enotah (RLU – angl. *Relative Lumunescent Unit*) (Jeršek, 2009). Ker je merjenje odvisno od encimske reakcije, ki je odvisna od razmer v okolju, moramo paziti na ustreznost okoljskih pogojev ob merjenju (Jeršek, 2009).



Slika 4: Prikaz reakcije oksidacije luciferina v oksiluciferin Za optimalno delovanje luciferaze je potreben pH=7,75 in temperatura 25 °C (Chen in Cushion, 1994).

2.5 POSKUSNI ORGANIZMI

2.5.1 Kvasovka Saccharomyces cerevisiae

Kvasovke predstavljajo netaksonomsko kategorijo gliv, definirano z ozirom na morfološke in fiziološke značilnosti (Raspor, 1996). Kvasovko Saccharomyces cerevisiae, poznano tudi kot pekovsko in pivsko kvasovko, ljudje izkoriščamo za pripravo kruha in alkoholnih pijač že več kot 5000 let (Goddard in sod., 2010), v novejšem obdobju pa jo uporabljamo tudi kot modelni enocelični evkariontski organizem (Sherman, 2002). Študije kvasovk so pomembno prispevale k razumevanju osnovnih celičnih procesov pri evkariontih (Hilt in Byrne, 2004)

Kvasovke vrste *S. cerevisiae* so kemoorganotrofni, fakultativno anaerobni organizmi, ki jih uvrščamo v deblo *Ascomycota*, kamor prištevamo preko 64.000 različnih vrst gliv (Kirk in sod., 2008). *S. cerevisiae* so enocelični evkariontski organizmi s celično steno, ki se lahko razmnožujejo spolno z askosporami ali vegetativno z brstenjem (Raspor, 1996). Velikost in oblika celic se spreminja med fazami rasti in variira med različnimi sevi. Diploidne celice so običajno elipsoidne oblike velikosti $5 \times 6 \mu$ m, haploidne celice pa so kroglaste s premerom 4 μ m (Sherman, 2002).



Slika 5:Slika kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* (Walther, 2008) Na sliki, posneti z vrstičnim elektronski mikroskopom (SEM), so vidne brazgotine, ki nastanejo ob brstenju.

Kvasovka *S. cerevisiae* združuje lastnosti enostavnih prokariontskih organizmov, kot so hitra rast v enostavnih in cenovno ugodnih gojiščih ter enostavne genetske manipulacije, z lastnostmi višjih evkariontov (Sherman, 2002; Parsons in sod., 2003; Štagoj in Podobnik, 2006). *S. cerevisiae* ima status GRAS (angl. *Generally Regarded As Safe*) ter za večino genskih manipulacij ni etično sporna. Ker ima dobro poznane molekularne in biokemijske lastnosti ter dostopne genetske metode in orodija, je s *S. cerevisiae* omogočen hiter razvoj bioloških testov (Kroll in sod., 1996; Štagoj in Podobnik, 2006).

S. cerevisiae je prvi evkariontski organizem, ki so mu v celoti sekvencirali genom (Goffeau in sod., 1996). Velikost genoma znaša 12 Mb in vsebuje 6200 ORF (odprt čitalni okvir, angl. *Open Reading Frame*). Genom haploidnih kvasovk *S. cerevisiae* sestoji iz 16 dobro preučenih kromosomov velikih od 200 do 2200 kb. Za razliko od večceličnih organizmov vsebuje genom kvasovk velik delež kodirajočih regij (72%) (Sherman, 2002).

Ker so se skozi evolucijo osnovne celične strukture in funkcije ohranjale, potekajo številni celični procesi, metabolne poti in regulatorni mehanizmi pri kvasovkah podobno kot pri višjih organizmih (Parsons in sod., 2003; Miloshev in sod., 2002). Zato so kvasovke postale ustrezno orodje za preučevanje evkariontske celice in se tudi uporabljajo kot testni organizem za oceno mutagenega potenciala različnih kemikalij (Miloshev in sod., 2002).

Primerjava genoma *S. cerevisiae* s človeškim genomom je razkrila, da ima okoli 3000 proteinov kvasovke homologe v vsaj enem izmed znanih človeških proteinov (Parsons in sod., 2003; Baetz in sod., 2004; Ploger in sod., 2000).

2.5.2 Izopodni raki Porcellio scaber

Kopenski raki enakonožci (izopodni raki) naseljujejo področja z zmerno visoko zračno vlago. V naravi jih najdemo v trohnelem lesu, med lubjem, pod debli in kamenjem ter v človekovem okolju. Prehranjujejo se z odmrlim organskim materialom (zlasti rastlinskega izvora), z algami, glivami, mahom, lubjem in iztrebki (Ruppert in Barnes, 1994). Izopodni raki imajo pomembno vlogo pri nastajanju humusa, zlasti zaradi drobljenja rastlinskih materialov, s čimer se poveča površina delcev za dostop bakterij in gliv, ki razgrajujejo organske snovi. Izopodni raki ne prebavljajo celuloze in lignina (Mršić, 1997; Paoletti in Hassall, 1999).



Slika 6: Navadni prašiček (Porcellio scaber) (Avtor slike: Veno Kononenko)

Izopodni raki so občutljivi na pesticide, tolerirajo pa nekatere težke kovine, ki jih amumulirajo v veziklih hepatopankreasa. Tako so uporabni za spremljanje bioakumulacije takšnih onesnaževal in lahko služijo kot bioindikator onesnaženja s težkimi kovinami (Paoletti in Hassall, 1999).

Kopenski raki enakonožci se pogosto uporabljajo kot testni organizmi za preučevanje toksičnih vplivov kemikalij, saj imajo več zaželjenih lastnosti, kot so splošna razširjenost, njihova identifikacija je enostavna, so ustrezne velikosti in so preprosti za gojenje v laboratoriju (Drobne, 1997; Paoletti in Hassall, 1999). Navadni prašiček oz. *Porcellio scaber* je eden izmed najbolje preučenih organizmov v kopenski ekotoksikologiji (Hopkin in sod., 1986; Drobne, 1997).

Prebavilo izopodnih rakov je sestavljeno iz prebavne cevi in hepatopankreasa (prebavne žleze) (Zimmer, 2002). Hepatopankreas je sestavljen iz štirih slepo zaprtih tubulov iz enoslojnega epitelija. Slepi konci vsebujejo zlasti nediferencirane celice, ki se distalno mitotično delijo. Glavna funkcija hepatopankreasa je sekrecija encimov, absorpcija hranil, shranjevanje lipidov ter skladiščenje kovin (Brečko, 1992; Štrus in sod., 1995). Epitelij hepatopankreasa tvorita dva tipa celic. Velike celice skladiščijo glikogen in lipide ter imajo vlogo sekrecije prebavnih encimov in skladiščenja hrane (Zimmer, 2002). Funkcija malih celic je predvsem sekrecija. V njih so različne znotrajcelične granule, kjer se kopičijo različne kovine, kot so železo, baker, cink in svinec (Prosi in Dallinger, 1988).



Slika 7: Skica testnega organizma *Porcellio scaber* (A) in skica prebavnega sistema iz štirih cevk prebavnih žlez (hepatopankreas) in črevesa (B) (prirejeno po Drobne in Kralj-Iglič, 2009)

3 MATERIALI IN METODE

3.1 POSKUSNI ORGANIZMI

3.1.1 Kvasovka Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Kot testni organizem smo uporabili kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov (Biotehniška fakulteta, Ljubljana). Kvasovke, ki so bile shranjene pri –80 °C, smo revitalizirali pri sobni temperaturi do popolne odmrznitve. 1 mL revitalizirane kulture smo inokulirali v 100 mL tekočega gojišča YPD (sestava gojišča je podana v preglednici 1) v 300 mL erlenmajerjevo posodo in gojili preko noči pri temperaturi 30 °C in stresanju pri 150 rpm. Naslednji dan smo 100 μ L prekonočne kulture prenesli na 10 mL trdnega gojišča YPD na poševniku, kar nam je služilo kot zaloga kvasovk. Vsake tri tedne smo kulturo precepili na nove poševnike.

Preglednica 1: Sestava gojišča YPD (Peycheva in sod., 2009)

Pepton	20g
D-glukoza	20g
Kvasni ekstrakt	10g
Voda Milli Q	do 1000 mL

* Gojišču smo z uporabo 1 M raztopine HCl umerili vrednost pH na 5,5. Trdno gojišče YPD za poševnike vsebuje dodatek 2 % (w/v) agarja. Gojišče smo po pripravi sterilizirali z avtoklaviranjem pri temperaturi 121°C in tlaku 1,2 bara (15min).

3.1.2 Izopodi Porcellio scaber

Poskusne živali, izopodne rake *Porcellio scaber*, smo pridobili iz neonesnaženega okolja na obrobju Ljubljane v Draveljski gmajni. Živali smo prestavili v gojitvene posode, napolnjene z zemljo iz njihovega naravnega okolja in s suhimi listi leske *Corylus avellana*, s katerimi se živali prehranjujejo. Gojitvene posode z živalmi smo več tednov hranili v kontroliranih pogojih pri temperaturi 20 ± 2 °C in naravnem svetlobnem ciklu (16 ur svetlobe in 8 ur teme). Živalim smo po potrebi dodajali leskove liste in gojitvene posode vlažili z destilirano vodo.

3.2 PRIPRAVA SUSPENZIJ DELCEV TiO2 in CuO

Pred pričetkom dela smo pripravili založne suspenzije nanodelcev TiO_2 in CuO, pripravili pa smo tudi suspenzije z delci enake kemijske sestave večjih velikosti (makrodelci). S primerjavo vplivov nanodelcev in makrodelcev smo želeli preučiti vpliv velikosti delcev na merjene učinke. V preglednici 2 so podani podatki o uporabljenih delcih.

Delci	Proizvajalec (podjetje)	Sestava in opis
Nanodelci TiO ₂	Sigma-Aldrich	Anatazni Titanov (IV) oksid, velikosti < 25 nm
Makrodelci TiO ₂	Merck	Titanov (IV) oksid, za analize
Nanodelci CuO	Sigma-Aldrich	Bakrov (II) oksid, velikosti < 50 nm
Makrodelci CuO	Merck	Bakrov (II) oksid, granule

Preglednica 2: Uporabljeni nanodelci in makrodelci TiO₂ in CuO

Makrodelce CuO v obliki granul smo pred pripravo suspenzij zdrobili v terilnici. Ostali delci so že bili primerni za pripravo suspenzij. Pripravili smo založne suspenzije nanodelcev in makrodelcev TiO_2 in CuO različnih koncentracij. V preglednici 3 so prikazani podatki o koncentracijah pripravljenih založnih suspenzij, ki smo jih uporabljali pri posameznih poskusih.

Preglednica 3: Koncentracije založnih suspenzij nanodelcev in makrodelcev TiO₂ in CuO ter njihova uporaba

Delci	Koncentracija	Uporaba
Nanodelci TiO ₂	1,1 μg/mL, 110 μg/mL,	Spremljanje rasti kvasovk ob izpostavitvi
	1100 μg/mL	nanodelcem TiO ₂ .
Nanodelci TiO ₂	0,2 μg/mL, 20 μg/mL, 200	Merjenje vsebnosti ATP v kulturi kvasovk,
	μg/mL	tretirani z nanodelci TiO ₂ , ter za kometni test s
		kvasovkami.
Makrodelci TiO ₂	0,2 μg/mL, 20 μg/mL, 200	Merjenje vsebnosti ATP v kulturi kvasovk,
	µg/mL	tretirani z makrodelci TiO ₂ , ter za kometni test
		s kvasovkami.
Nanodelci CuO	0,01 μg/mL, 1 μg/mL, 100	Merjenje vsebnosti ATP v kulturi kvasovk,
	µg/mL	tretirani z nanodelci CuO, ter za kometni test s
		kvasovkami.
Makrodelci CuO	0,01 μg/mL, 1 μg/mL, 100	Merjenje vsebnosti ATP v kulturi kvasovk,
	μg/mL	tretirani z makrodelci CuO, ter za kometni test
		s kvasovkami.
Nanodelci TiO ₂	2000 µg/mL	Tretiranje izopodnih rakov Porcellio scaber z
		nanodelci TiO ₂ pred izvedbo kometnega testa

* Vse založne suspenzije smo pripravili v vodi MilliQ. Založne suspenzije smo sterilizirali z avtoklaviranjem pri temperaturi 121°C in tlaku 1,2 bara (15min). Neposredno pred uporabo smo vse suspenzije sonicirali v ultrazvočni vodni kopeli za 30 min.

3.3 RASTNA KRIVULJA KVASOVKE Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Za pripravo rastne krivulje smo spremljali rast kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 z merjenjem optične gostote (OD_{654}) in s štetjem celic s svetlobnim mikroskopom z uporabo Neubauerjeve števne komore (slika 8).

Kvasovke *S. cerevisiae* ZIM 1875 smo s pomočjo eze iz poševnika aseptično inokulirali v 100 mL tekočega gojišča YPD v Erlenmajerjevi posodi in jih preko noči namnožili na stresalniku pri 30 °C in 150 rpm.

V 100 mL svežega gojišča YPD v Erlenmajerjevi posodi smo inokulirali 1 mL prekonočne kulture kvasovk. Kultivacija je potekala pri 30 °C in stresanju pri 150 rpm. Vzorce za meritve OD_{654} in štetje s svetlobnim mikroskopom smo jemali na eno uro. Za pripravo rastne krivulje smo izvedli dve ponovitvi.

Optično gostoto smo merili s spektrofotometrom (NovaSpec II, Visible Spectrophotometer) pri valovni dolžini 654 nm. Pred vsako meritvijo OD₆₅₄ smo spektrofotometer umerili s svežim tekočim gojiščem YPD brez kvasovk.

Pri štetju z uporabo Neubauerjeve števne komore smo prešteli celice v 10 kvadratkih velikosti 0,25 mm \times 0,25 mm in globine 0,1 mm. Ob visokih koncentracijah celic smo kulturo pred štetjem ustrezno razredčili. Pri izračunu koncentracije celic smo upoštevali volumen kvadratkov in stopnjo redčitve kulture. Za izračun koncentracije celic smo uporabili naslednjo enačbo:

$$\check{S}tevilo \ celic/mL = N \times R \times 160.000 \qquad ...(2)$$

N... povprečno število celic v kvadratku R... faktor redčitve



Slika 8: Prikaz Neubaurjeve števne komore za štetje celic z mikroskopom (Heidcamp, 1995)

3.4 VPLIV NANODELCEV TiO₂ NA RAST KVASOVK Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Da bi preverili vpliv nanodelcev na dinamiko rasti kvasovk, smo spremljali rast kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875, ki so bile izpostavljene različnim koncentracijam nanodelcev TiO₂. Kvasovke smo izpostavili trem različnim koncentracijam nanodelcev TiO₂ (0,1 μ g/mL, 10 μ g/mL in 100 μ g/mL).

Za pripravo gojišča YPD s TiO_2 smo uporabili založne suspenzije nanodelcev TiO_2 koncentracij 1,1 µg/mL, 110 µg/mL in 1100 µg/mL, ki smo jih predhodno 30 min sonicirali v ultrazvočni vodni kopeli. V 100 mL gojišča YPD smo dodali 10 mL založne suspenzije nanodelcev TiO_2 , tako da so bile kvasovke izpostavljene 0,1 µg/mL, 10 µg/mL in 100 µg/mL nanodelcem TiO_2 . Za negativno kontrolo smo gojišču namesto suspenzije nanodelcev dodali 10 mL avtoklavirane vode MilliQ.

Kultivacija je potekala v 300 mL erlenmajerjevih posodah. V 100 mL gojišča YPD z 10 mL založne suspenzije nanodelcev TiO₂ (oz. z 10 mL vode MiliQ) smo inokulirali 1 mL prekonočne kulture *S. cerevisiae* ZIM 1875, in kulturo inkubirali pri temperaturi 30 °C in stresanju pri 150 rpm. Rast kvasovk smo spremljali ob časih kultivacije 2, 4, 6 in 24 ur, s sprotnim vzorčenjem 1 mL kulture in štetjem s svetlobnim mikroskopom z uporabo Neubauerjeve komore (merjenje optične gostote ovira prisotnost nanodelcev v kulturi). Za vsako testno koncentracijo nanodelcev TiO₂ smo izvedli dve ponovitvi.

S primerjavo rasti tretiranih in netretiranih kvasovk smo želeli ugotoviti, ali prisotnost nanodelcev TiO_2 vpliva na dinamiko rasti kvasovk.

3.5 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA S KVASOVKAMI Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Kometni test s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* je bil že večkrat uporabljen za ugotavljanje genotoksičnosti (Azevedo in sod., 2011; Miloshev in sod., 2002; Peycheva in sod., 2009; Lah in sod., 2004), a še nikoli s sevom *S. cerevisiae* ZIM 1875. Postopek kometnega testa s kvasovkmi, ki so ga razvili Miloshev in sod. (2002), smo modificirali na nivoju priprave celic, inkubacijskega časa v raztopini za alkalno lizo, poteka elektroforeze in koncentracije EtBr za vizualizacijo kometov.

3.5.1 Prilagajanje kometnega testa s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Postopek kometnega testa smo želeli prilagoditi tako, da bi nam omogočil dokazati signifikantne razlike med negativno in pozitivno kontrolo. Za pozitivno kontrolo smo pred lizo celic na minigele z imobiliziranimi kvasovkami za 20 min nanašali raztopino 50 mM H₂O₂. Pri postopkih optimizacije kometnega testa smo uporabljali prekonočno kulturo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875.

Najprej smo izvedli kometni test po postopku, ki je opisan v Miloshev in sod. (2002). Pri tem smo za razgradnjo celične stene kvasovk namesto encima Zimolaza 20 T uporabili encim litikaza iz *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich). Poškodbe DNA smo ocenili z vizualnim pregledom minigelov z epifluorescentim mikroskopom, pri čemer nas je zanimala zlasti razlika v poškodovanosti DNA med pozitivno in negativno kontrolo. Ker pri nobeni celici nismo uspeli zaznati poškodb DNA, smo se lotili optimizacije postopka.

Naredili smo več poskusov, pri katerih smo izvedli različne modifikacije postopka kometnega testa po Miloshevu in sod. (2002):

- Podaljšanje časa alkalne lize iz 60 min na 2 uri ter preko noči
- Podaljšanje časa elektroforeze iz 20 min na 30 min
- Povečanje koncentracije nanešenega H₂O₂ pri pozitivni kontroli na 500 mM
- Povečanje koncentracijo uporabljene litikaze iz začetne koncentracije 0,2 mg litikaze/mL agaroze na 2 mg litikaze/mL agaroze.
- Podaljšanje časa delovanja litikaze iz 20 min na 30 min
- Uporaba treh različnih raztopin za lizo celic in treh različnih pufrov za elektroforezo, kot je opisano v Azevedo in sod. (2011), Peycheva in sod. (2009) ter Lah in sod., (2004).

Med pregledovanjem minigelov z epifluorescentnim mikroskopom smo pri številnih celicah opazili brstenje (slika 9). Pri vseh zgoraj opisanih modifikacijah kometnega testa nismo zaznali poškodb DNA pri izpostavitvi pozitivni kontroli.



Slika 9: Brstenje kvasovk (Avtor fotografije: Veno Kononenko)

Prisotnost brstov kvasovk lahko ovira ocenjevanje poškodb DNA, ob neizostreni sliki in pri majhnih brstih pa je možno tudi napačno ocenjevanje
V nadaljevanju prilagajanja postopka smo se odločili, da celice kvasovk tretiramo z litikazo, preden jih vključimo v gel. Kvasovke iz prekonočne kulture smo skoncentrirali s centrifugiranjem ter jih resuspendirali v S-pufru (sestava je podana v preglednici 5) z 1,5 mg litikaze/mL. Po 90 minutni inkubaciji pri sobni temperaturi smo kvasovke ponovno centrifugirali, supernatant odlili in usedlino s celicami resuspendirali v S-pufru. S tako pridobljenimi kvasovkami smo nato izvedli kometni test po Miloshevu in sod. (2002). Pri vizualnem pregledu kometov z epifluorescentnim mikroskopom smo pri pozitivni kontroli opazili poškodbe DNA le pri približno 10 % celic.

Zato smo naslednji poskus izvedli s prekonočnim protoplastiranjem kvasovk v S-pufru z različnimi koncentracijami litikaze (0,8 mg/mL, 0,08 mg/mL in 0,01 mg/mL). Protoplastiranje je potekalo 19 ur pri 25 °C. Naslednji dan smo kvasovke centrifugirali, supernatant odlili in jih resuspendirali v S-pufru. Kvasovke, izpostavljene najvišji koncentraciji litikaze (0,8 mg/mL), se ob centrifugiranju niso posedle. Predvidevali smo, da so bile celice v celoti protoplastirane in so se tekom centrifugiranja razbile. S kvasovkami, ki so bile izpostavljene litikazi pri 0,08 mg/mL ter 0,01 mg/mL, smo izvedli kometni test po Miloshevu in sod. (2002). Pri nižji koncentraciji litikaze poškodb DNA nismo zaznali. Pri koncentraciji litikaze 0,08 mg/mL pa smo pri pozitivni kontroli zaznali večje poškodbe DNA, vendar so bile poškodbe vidne tudi pri negativni kontroli.

Z optimizacijo koncentracije in časa delovanja litikaze ter časov lize celic in elektroforeze smo pridobili metodo (predstavljeno v poglavju 3.5.2), s katero smo pridobili signifikantne razlike med pozitivno in negativno kontrolo.

3.5.2 Postopek prilagojenega kometnega testa s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* ZIM1875

Kometni test smo prilagodili na podlagi več poskusov (poglavje 3.5.1).

3.5.2.1 Priprava kemikalij

Za izvedbo kometnega testa smo pripravili založne raztopine kemikalij, ki smo jih hranili v hladilniku in so nam služile za pripravo delovnih raztopin. Pri delu smo uporabljali sveže pripravljene delovne raztopine. Sestava založnih in delovnih raztopin je prikazana v preglednicah 4 in 5. V preglednici 6 je predstavljena priprava uporabljene agaroze za minigele.

ZALOŽNA	PRIPRAVA		
RAZTOPINA			
10 M NaOH	Natehtamo 400 g NaOH in dolijemo vodo MilliQ do 1L.		
1 M Tris-HCl	Natehtamo 121,1 g trisa in dolijemo vodo MilliQ do 1L. Vrednost pH umerimo		
	na 7,5 z uporabo koncentrirane raztopine HCl.		
1 M EDTA	Natehtamo 372,2 g EDTA in dolijemo vodo MilliQ do 1L. Vrednost pH		
	umerimo na 8,0 z uporabo NaOH.		
Fosfatni pufer	Natehtamo 14,4 g Na2HPO4×2H2O in do 1L dolijemo vodo MilliQ. Vrednost		
	pH umerimo na 7,3.		

Preglednica 4: Priprava založnih raztopin za izvedbo kometnega testa

Preglednica 5: Priprava delovnih raztopin za kometni test

DELOVNA RAZTOPINA	PRIPRAVA
Delovna raztopina fosfatnega	Zmešamo 100 mL založne raztopine fosfatnega pufra in 900 mL vode
pufra	MilliQ.
Raztopina za alkalno lizo	Zmešamo 1,5 mL založne raztopine 10 M NaOH in 25 mL založne
	raztopine 1 M EDTA ter dodamo 29,22 g NaCl in 0,50 g N-
	laurilsarkozinata. Do 500 mL dolijemo vodo MilliQ in dobro
	premešamo. Tako dobimo raztopino 30 mM NaOH, 1M NaCl, 50 mM
	EDTA in 0,1 % N-laurilsarkozinata. Vrednost pH uporabljene raztopine
	za alkalno lizo znaša 12,3.
Pufer za elektroforezo	Zmešamo 9 mL založne raztopine 10 M NaOH in 30 mL 1 M EDTA
	ter do 3L dolijemo vodo MilliQ. Tako dobimo raztopino 30 mM NaOH
	in 10 mM EDTA. Vrednost pH uporabljenega pufra za elektroforezo
	znaša 12,4.
Delovna raztopina Tris-HCl	Zmešamo 200 mL založne raztopine 1 M Tris-HCl in 300 mL vode
	MilliQ, da dobimo 400 mM raztopino Tris-HCl.
S-pufer	Natehtamo 91,1g sorbitola, 1,701g KH ₂ PO ₄ ter dolijemo vodo MilliQ
	do 500 mL. Vrednost pH umerimo na 6,5.

* Opisane količine zadostujejo za izvedbo kometnega testa s 16 minigeli. Uporabljali smo delovne raztopine, ohlajene na 6 °C.

Preglednica 6: Priprava agaroze za minigele

SLOJ MINIGELOV	PRIPRAVA
1. sloj: 0,5 % NMP agaroza	0,05 g NMP agaroze + 10 mL delovnega fosfatnega pufra
2. sloj: 1,6 % LMP agaroza	0,16 g LMP agaroze + 10 mL delovnega fosfatnega pufra
3. sloj: 1,0 % LMP agaroza	0,10 g LMP agaroze + 10 mL delovnega fosfatnega pufra

Za protoplastiranje kvasovk smo uporabili encim litikaza iz *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich). 7,4 mg litikaze smo raztopili v 1 mL S-pufra in raztopino shranili pri -20 °C.

Za vizualizacijo kometov smo uporabili raztopino 10 μ g/mL etidijevega bromida (EtBr). 1 μ L EtBr (Merck, 10mg/mL) smo raztopili v 999 μ L delovne raztopine Tris-HCl.

3.5.2.2 Protoplastiranje in spiranje kvasovk

Kvasovke smo protoplastirali v 1 mL S-pufra, kateremu smo dodali 5 μ L litikaze, pripravljene v S-pufru. Kvasovke z litikazo smo protoplastirali 16 ur pri 25 °C.

Po protoplastiranju smo kvasovke centrifugirali 7 min pri 115 RCF in 4 °C. Supernatant smo odlili in usedlino s kvasovkami resuspendirali v 5 mL S-pufra. Sledilo je ponovno centrifugiranje (7 min, 115 RCF, 4 °C). Supernatant smo zavrgli, kvasovke pa resuspendirali v 1,5 mL S-pufra. Kvasovke smo do uporabe hranili na ledu.

3.5.2.3 Postopek kometnega testa s kvasovkami

Vse postopke smo izvajali v temnem prostoru, da bi preprečili poškodbe DNA.

Kot 1. sloj smo smo na peskano stran objektnega stekelca nanesli 300 μ L 0,5 % NMP agaroze. Stekelca z nanešenim 1. slojem smo čez noč sušili na zraku. Ko se je 1. sloj posušil, smo stekelca prestavili na led. 2. sloj smo pripravili tako, da smo zmešali 1 mL 1,6 % LMP agaroze z 100 μ L protoplastiranih kvasovk v S-pufru in nanesli 400 μ L te mešanice na vsako stekelce od dveh tehničnih ponovitev. Po strditvi 2. sloja smo nanj nanesli 300 μ L 3. sloja (1,0 % LMP agaroza). Ko se je 3. sloj strdil, smo na minigele za 20 min nanesli 900 μ L 50 mM raztopine H₂O₂ (za pozitivno kontrolo) oziroma 900 μ L delovne raztopine fosfatnega pufra (za negativno kontrolo in vse ostale). Po 20 minutah smo minigele sprali v delovni raztopini fosfatnega pufra (2 × 5 min). Po spiranju je sledila alkalna liza (40 min) in namakanje minigelov v ohlajenem pufru za elektroforezo (30 min), nato je sledila elektroforeza v enakem pufru. Elektroforeza je potekala 10 min pri 25 V, 155 mA in 4 W. Po elektroforezi smo minigele potopili v delovno raztopino Tris-HCl za 10 min. Po namakanju je sledilo ocenjevanje kometov.

3.5.2.4 Ocenjevanje poškodb jedrne DNA

Minigele smo pobarvali z direktnim nanosom 15 μ L EtBr (c= 10 μ g/mL), čemur je sledilo ocenjevanje poškodb DNA.

Vizualizacija slike je potekala z epifluorescentnim mikroskopom (Olympus BX50) pri 400× povečavi. Za prenos slike na računalnik smo uporabljali digitalno kamero (Hamatsu Orca 2). Poškodbe DNA smo ocenjevali z uporabo računalniškega programa Komet 50. Program nam omogoča avtomatsko ali ročno določitev regij kometa (glave in repa). Komete smo ocenjevali avtomatsko, razen v primerih, ko je računalniški program napačno ocenil lokacijo glave in repa kometa (slika 10). Pri posameznem minigelu smo ocenili 60

kometov.



Slika 10: Napačna avtomatska ocenitev repa (A) in ročni popravek (B) (Avtor fotografije: Veno Kononenko)

3.5.3 Preverjanje ustreznosti prilagojenega postopka kometnega testa s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Za ugotovitev uspešnosti in ponovljivosti prilagojenega postopka kometnega testa s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 smo prekonočno kulturo kvasovk nanesli na 16 minigelov, pri čemer smo 8 minigelov tretirali s 50 mM H_2O_2 (pozitivna kontrola), 8 pa z delovno raztopino fosfatnega pufra (negativna kontrola).

3.6 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV TiO₂ IN CuO S KVASOVKAMI Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Genotoksične učinke nanodelcev TiO_2 in CuO smo testirali s prilagojenim postopkom kometnega testa. Pred izvedbo kometnega testa smo z ATP-luciferaznim testom in barvanjem s tripanskim modrilom preverili vpliv nanodelcev TiO_2 in CuO na energetsko stanje kvasovk ter viabilnost celic.

3.6.1 Izpostavitev kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 delcem TiO2 in CuO

Kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 smo aseptično inokulirali v 100 mL tekočega gojišča YPD in jih preko noči namnožili v inkubacijskem stresalniku pri 30 °C in 150 rpm. Naslednji dan smo precepili 1 mL prekonočne kulture v Erlenmajerjevo posodo s 100 mL tekočega gojišča YPD. Precepljeno kulturo smo gojili v inkubacijskem stresalniku pri 30 °C in 150 rpm do zgodnje logaritemske faze rasti (OD₆₅₄=0,200), nato smo aseptično prestavili 1,5 mL kulture kvasovk v avtoklavirano stekleno epruveto in ji dodali

1,5 mL predhodno sonicirane suspenzije testne snovi. Testne snovi so bile delci CuO in TiO₂ nanometrskih velikosti (nanodelci) ter delci enake kemijske sestave večjih velikosti (makrodelci), pri negativni kontroli pa smo dodali 1,5 mL vode MilliQ. V preglednici 7 so podani podatki o uporabljenih založnih suspenzijah nanodelcev in makrodelcev. Testne snovi smo skupaj s kvasovkami inkubirali v epruvetah 16 ur pri temperaturi 25 °C in stresanju pri 200 rpm. Po 16-urni izpostavitvi smo z izpostavljenimi kvasovkami izvedli ATP-luciferazni test in barvanje s tripanskim modrilom oz. smo jih uporabili za kometni test. Postopek priprave kvasovk in izpostavitve je predstavljen na sliki 11.

Delci	Koncentracije založnih	Končna koncentracija
	suspenzij	(testna koncentracija)
Nanodelci TiO ₂	0,2 μg/mL,	0,1 μg/mL,
	20 μg/mL, 200 μg/mL	10 μg/mL,
		100 μg/mL
Makrodelci TiO ₂	0,2 μg/mL,	0,1 μg/mL,
	20 μg/mL, 200 μg/mL	10 μg/mL,
		100 μg/mL
Nanodelci CuO	0,01 μg/mL,	0,005 μg/mL,
	1 μg/mL,	0,5 μg/mL,
	100 μg/mL	50 μg/mL
Makrodelci CuO	0,01 μg/mL,	0,005 μg/mL,
	1 μg/mL,	0,5 μg/mL,
	100 μg/mL	50 μg/mL
Negativna kontrola	Avtoklavirana voda	/
(brez delcev)	MilliQ	

Preglednica 7: Podatki o uporabljenih suspenzijah delcev TiO₂ in CuO, s katerimi smo tretirali kvasovke pred izvedbo ATP-luciferaznega testa in kometnega testa



Slika 11: Shematski prikaz priprave kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 za ATP-luciferazni test in kometni test Celoten postopek smo izvajali aseptično, da smo se izognili nezaželjenim kontaminacijam.

3.6.2 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Pred izvedbo kometnega testa smo z ATP-luciferaznim testom želeli izmeriti metabolno aktivnost izpostavljenih kvasovk. Preverili smo vpliv različnih koncentracij nanodelcev TiO₂ in CuO na vsebnost ATP v kulturi kvasovk. Predvidevali smo, da nanodelci TiO₂ in CuO vplivajo na zmanjšano vsebnost ATP v kulturi. Želeli smo tudi preveriti vpliv velikosti delcev, zato smo izvedli ATP-luciferazni test tudi s kvasovkami, izpostavljenimi delcem enake kemijske sestave večjih velikosti (makrodelcem).

Koncentracijo ATP v vzorcih smo merili posredno, s pomočjo luminescentne reakcije oksidacije luciferina (slika 4).

Vsebnost ATP v kulturi kvasovk smo merili s komercialnim kitom ATP Bioluminescent Assay Kit (Sigma-Aldrich), ki je sestavljen iz sledečih reagentov:

- FL-AAM (*ATP Assay Mix*), ki vsebuje encim luciferazo, luciferin, MgSO₄, DTT, EDTA, goveji serumski albumin in tricinske puferske soli

- FL-AAB (*ATP Assay Mix Dilution Buffer*) pufer za redčenje FL-AAM, ki vsebuje MgSO4, DTT, EDTA, goveji serumski albumin in tricinske puferske soli
- FL-AAS (ATP standard) standard, ki vsebuje znano koncentracijo ATP

Reagente smo do uporabe hranili pri -20 °C. Neposredno pred uporabo smo pripravili mešanico $40 \times$ redčenega FL-AAM v FL-AAB in redčitveno vrsto FL-AAS od 2×10^{-7} do 2×10^{-12} mol ATP/L. FL-AAS smo redčili z avtoklavirano vodo MilliQ. Redčitveno vrsto FL-AAS smo do uporabe hranili na ledu v temnem prostoru. Za vsako serijo meritev smo izdelali sveže redčitve vseh reagentov in izdelali novo umeritveno krivuljo.

Da lahko izmerimo vsebnost ATP v kulturi, je potrebno ATP ekstrahirati iz celic. Pri tem pazimo, da s postopkom ekstrakcije uničimo čim manjši delež molekul ATP. Ekstrakcijo ATP smo izvedli z raztopino 0,1 M Tris-HCl in 2 mM EDTA. pH vrednost ekstrakcijske raztopine smo z uporabo 1 M raztopine HCl umerili na 7,8. V mikrocentrifugirke smo odpipetirali 900 μ L ekstrakcijskega pufra, ki smo ga segreli na 100 °C. V segret ekstrakcijski pufer smo dodali 100 μ L kulture kvasovk, ki je bila 16 ur izpostavljena testnim snovem (priprava in tretiranje kvasovk je predstavljeno na sliki 11; testne snovi so podane v preglednici 7), in mešanico premešali z uporabo vibracijskega stresalnika (Vorteks). Po premešanju smo mešanico inkubirali 3 minute pri 100 °C. Po končani inkubaciji smo mikrocentrifugirke z ekstrahiranim ATP prestavili na led, kjer smo jih hranili do merjenja.

V kiveto smo odpipetirali 100 μ L na sobno temperaturo segretega reagenta (40× redečeni FL-AAM v FL-AAB) in 100 μ L ekstrakta ATP oz. ustrezne redčitve standarda FL-AAS. Sproščeno svetlobo smo izmerili z luminometrom Junior LB 9509 (Berthold technologies GmbH & Co. KG, Nemčija), ki nam poda rezultat v enotah RLU (angl. *Relative Lumunescent Unit*). Meritve smo izvedli v roku 20 sekund po zmešanju vzorca z reagentom, saj s časom reakcije luminescentni signal slabi. Od dobljenih vrednosti RLU smo odšteli vrednost RLU prazne kivete.

Za izris umeritvene krivulje smo izmerili luminescenco standardnih raztopin ATP s koncentracijami 2 x 10^{-7} do 2 x 10^{-12} mol/L. S pomočjo merjenja različnih redčitev standardnih raztopin ATP z znano koncentracijo smo izrisali umeritveno krivuljo, ki nam je omogočila pretvorbo enot RLU v dejansko koncentracijo ATP.

Za vsako koncentracijo posamezne testne snovi ter za negativno kontrolo smo izvedli meritve pri treh bioloških ponovitvah.

3.6.3 Določanje viabilnosti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 s tripanskim modrilom

Kulturo kvasovk smo po 16-urni kultivaciji z izbranimi testnimi snovmi barvali s tripanskim modrilom (priprava in tretiranje kvasovk je predstavljeno na sliki 11; testne snovi so podane v preglednici 7). Ker tripansko modrilo vstopa le v celice s poškodovano celično membrano, se intaktne (žive) celice ne obarvajo, mrtve celice pa se obarvajo modro.

S pipeto smo nanesli 20 μ L kulture kvasovk na Neubauerjevo števno komoro, celice pobarvali z 0,4 % raztopino tripanskega modrila, počakali 5 min, da je barvilo prodrlo do celic, ter nato prešteli število obarvanih in neobarvanih celic. V vsakem posameznem vzorcu smo pregledali vsaj 50 celic.

Odstotek živih celic smo izračunali z naslednjo enačbo:

Odstotek živih c. [%] = št. neobarvanih c./(št. vseh preštetih c.)
$$\times$$
 100 ...(3)

Za vsako koncentracijo posamezne testne snovi ter za negativno kontrolo smo pregledali kvasovke pri treh bioloških ponovitvah.

3.6.4 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Po 16-urni izpostavitvi izbranim testnim snovem (priprava in tretiranje kvasovk sta predstavljena na sliki 11; testne snovi so podane v preglednici 7) smo kulturo kvasovk centrifugirali 5 min pri 525 RCF in 4 °C. Supernatant smo zavrgli, usedlino, v kateri so kvasovke, pa resuspendirali v 3 mL S-pufra in ponovno centrifugirali (5 min, 525 RCF, 4 °C). Supernatant smo ponovno zavrgli, usedlino pa resuspendirali v 1 mL S pufra, kateremu smo dodali 5 μ L litikaze (priprava litikaze je predstavljena v poglavju 3.5.2.1). Kvasovke z litikazo smo protoplastirali 16 ur pri 25 °C.

Po protoplastiranju smo kvasovke centrifugirali 7 min pri 115 RCF in 4 °C. Supernatant smo odlili in usedlino s kvasovkami resuspendirali v 5 mL S-pufra. Sledilo je ponovno centrifugiranje (7 min, 115 RCF, 4 °C). Supernatant smo zavrgli, kvasovke pa resuspendirali v 1,5 mL S-pufra. Kvasovke smo do uporabe hranili na ledu.

Nadaljnji postopki kometnega testa so predstavljeni v poglavjih 3.5.2.3 ter 3.5.2.4.

Ker smo za vsako koncentracijo testne snovi izvedli tri biološke in dve tehnični ponovitvi, smo ocenili 360 kometov pri posamezni skupini izpostavljenih kvasovk. Da bi preverili

ustreznost izvedbe postopkov, smo ob vsaki izvedbi kometnega testa izvedli tudi negativno in pozitivno kontrolo.

3.7 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber

Kometni test z izopodi *Porcellio scaber* smo želeli izvesti s celicami hepatopankreasa, pri čemer smo najprej potrebovali ustrezen postopek za izolacijo celic iz tkiva, nato pa še ustrezen postopek za izvedbo kometnega testa, saj kometni test s celicami hepatopankreasa izopodov *P. scaber* ni bil izveden še nikoli.

3.7.1 Izolacija celic iz hepatopankreasa Porcellio scaber

Za izvedbo kometnega testa s celicami hepatopankreasa smo potrebovali postopek, ki bi nam omogočil pridobiti zadostno število celic in hkrati ne bi povzročil dodatnih poškodb jedrne DNA.

Pri poskusih izolacije celic smo uporabljali živali iz gojitvene posode. Neposredno pred izvedbo posameznega poskusa smo izvedli sekcijo živali, pri čemer smo izolirali hepatopankreas. Izoliran hepatopankreas smo sprali v fiziološki raztopini za *P. scaber* (preglednica 8).

SNOV	KONCENTRACIJA
NaCl	248 mmol/L
KCl	8 mmol/L
MgCl2	10 mmol/L
Glukoza	5 mmol/L
Tris	10 mmol/L

Preglednica 8: Sestava fiziološke raztopine za Porcellio scaber (Hagedorn in Ziegler, 2002)

* Vrednost pH fiziološke raztopine umerimo na 7,4.

Izolacije celic iz hepatopankreasa smo se lotili na različne načine:

- Razbijanje tkiva s paličnim sonikatorjem (poskusi 1-3)
- Soniciranje v ultrazvočni kopeli (poskus 4)
- Razbijanje tkiva v terilnici (poskus 5)
- Disociacija tkiva z uporabo encimov in EDTA (poskusi 6-17)
- Razbijanje tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo (poskus 18)

Pri poskusih, pri katerih nam je uspelo razbiti tkivo, smo dobljeno suspenzijo pregledali s svetlobnim mikroskopom. Za boljšo vizualizacijo celic smo vzorce (suspenzije razbitega tkiva) barvali z vodno raztopino 0,5 % barvila nevtralno rdeče (angl. neutral red). Nekatere

vzorce smo barvali po Giemsi (Kobe M. 1979). Pri poskusih, pri katerih je mikroskopski pregled pokazal, da vsebujejo velik delež nepoškodovanih celic oziroma jeder, smo izvedli tudi kometni test, s katerim smo želeli preveriti, ali je pri razbijanju tkiva prišlo do poškodb DNA.

3.7.1.1 Razbijanje tkiva s paličnim sonikatorjem

Po sekciji smo hepatopankreas prestavili v 1,5 mL mikrocentrifugirko, napolnjeno s fiziološko raztopino za *P. scaber*, in vzorec sonicirali s paličnim sonikatorjem (Soniprep 150, MSE). Soniciranje je potekalo v 3 ciklih po 5 sekund z vmesnimi 5-sekundnimi pavzami. Hepatopankreas smo sonicirali pri različnih amplitudah (prikazano v preglednici 9). Pri posameznem poskusu smo uporabili hepatopankreas ene živali.

Oznaka poskusa	Jakost amplitude
Poskus 1	Amplituda 3
Poskus 2	Amplituda 4
Poskus 3	Amplituda 5

Preglednica 9: Jakost amplitude pri posameznih poskusih

3.7.1.2 Soniciranje v ultrazvočni kopeli

Pri poskusu 4 smo hepatopankreas ene živali prestavili v fiziološko raztopino za *P. scaber* v centrifugirki. Soniciranje v ultrazvočni vodni kopeli (Sonis 4, Iskra) je potekalo 30 min.

3.7.1.3 Razbijanje tkiva v terilnici

Pri poskusu 5 smo v keramično terilnico odpipetirali 1 mL fiziološke raztopine za *P. scaber* in dodali izoliran hepatopankreas ene živali. Tkivo smo razbili z mehanično silo pestila.

3.7.1.4 Disociacija tkiva z uporabo encimov in EDTA

Za izolacijo celic iz hepatopankreasa smo tkivo tretirali z disociacijskimi encimi (tripsin, kolagenaza) in EDTA.

Z uporabo fiziološke raztopine za *P. scaber* smo pripravili sledeče raztopine:

- 0,25 % pankreasni tripsin (tip II; Sigma-Aldrich).
- 0,2 % kolagenaza iz *Clostridium histolyticum* (tip IA; Sigma-Aldrich)
- 1 M EDTA, pH=8,0
- 0,1 M EDTA, pH=7,1

Za posamezen poskus smo uporabili ¼ hepatopankreasa (eno cevko) *P. scaber*. Po sekciji smo tkivo prestavili v mikrocentrifugirko z raztopino za disociacijo tkiva, kjer je potekala inkubacija. Po inkubaciji smo tkivo razbili s pomočjo pipetiranja ali vorteksiranja. Potek posameznih poskusov je predstavljen v preglednici 10.

Oznaka	Uporabljena raztopina za	Čas	Temperatura	Opombe
poskusa	disociacijo tkiva	inkubacije	inkubacije	
Poskus 6	400 μL 0,25% tripsina	3 min	37 °C	Inkubacija je potekala brez mešanja. Po inkubaciji smo skušali tkivo razbiti z intenzivnim pipetiranjem.
Poskus 7	400 μL 0,25% tripsina	15 min	37 °C	Inkubacija je potekala brez mešanja. Po inkubaciji smo skušali tkivo razbiti s pipetiranjem.
Poskus 8	400 µL 0,25% tripsina	30 min	Sobna T	Med inkubacijo smo vzorec večkrat premešali.
Poskus 9	400 μL 0,25% tripsina + 400 μL destilirane vode	20 min	Sobna T	Inkubacija je potekala brez mešanja. Po inkubaciji smo skušali razbiti tkivo z intenzivnim pipetiranjem.
Poskus 10	400 μL 0,25% tripsina + 40 μL 1M EDTA	20 min	Sobna T	Inkubacija je potekala brez mešanja. Po inkubaciji smo tkivo razbili s pipetiranjem.
Poskus 11	200 μL 0,25% tripsina + 10 uL 1M EDTA + 500 μL fiziološke raztopine	30 min	Sobna T	Inkubacija je potekala brez mešanja. Tkivo smo po inkubaciji razbili z nežnim pipetiranjem.
Poskus 12	200 µL 0,1 M EDTA + 200 uL fiziološke raztopine	60 min	Sobna T	Inkubacija je potekala brez mešanja. Po inkubaciji smo skušali tkivo razbiti s pipetiranjem.
Poskus 13	400 μL 0,1 M EDTA	25 min	Sobna T	Inkubacija je potekala brez mešanja. Po inkubaciji smo skušali tkivo razbiti s pipetiranjem.
Poskus 14	400 μL 0,1 M EDTA	90 min	Sobna T	Inkubacija je potekala brez mešanja. Po inkubaciji smo skušali tkivo razbiti s pipetiranjem.
Poskus 15	200 μL 0,2 % kolagenaze	45 min	Sobna T	Inkubacija je potekala brez mešanja. Po 30 min smo s pipetiranjem premešali vzorec. Po celotni inkubaciji smo s pipetiranjem razbili tkivo.
Poskus 16	100 μL 0,2 % kolagenaze + 100 μL fiziološke raztopine	70 min	Sobna T	Inkubacija je potekala brez mešanja. Po 60 min smo z rahlim pipetiranjem premešali vzorec. Sledila je še 10 min inkubacija. Po celotni inkubaciji smo s pipetiranjem razbili tkivo.
Poskus 17	Raztopina 1: 50 μL 0,2 % kolagenaze + 50 μL fiziološke raztopine; Raztopina 2: 100 μL 0,1M EDTA	40 min + 40 min	Sobna T	Inkubacija je potekala brez mešanja. Po 40 min inkubacije v raztopini 1 smo tkivo prestavili v raztopino 2. Po 40 min inkubacije v raztopini 2 smo tkivo razbili z vorteksiranjem.

Preglednica 10: Potek poskusov disociacije tkiva z uporabo encimov in EDTA

3.7.1.5 Razbijanje tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo

Pri poskusu 18 smo po sekciji živali, izoliran hepatopankreas potopili v 70 μ L ohlajene raztopine 0,1 M EDTA (pH=7,1) in ga inkubirali 10 min na ledu. Po inkubaciji smo tkivo v 0,1 M raztopini EDTA razbili z aspiracijo skozi injekcijsko iglo. Tkivo smo najprej aspirirali skozi debelejšo iglo (0,6 × 25 mm; Icogamma plus), s čimer smo pridobili manjše koščke tkiva. Nato smo izvedli aspiracijo še skozi tanjšo iglo (0,36 × 13 mm; Kendall Healthcare), s čimer smo tkivo v celoti disociirali.

3.7.2 Preverjanje vpliva postopka izolacije celic oziroma jeder na poškodbe DNA s kometnim testom

Da bi preverili vpliv postopkov razbijanja tkiva na poškodbe DNA, smo izvedli kometni test. Kometni test smo izvedli z vzorci, pri katerih je mikroskopski pregled pokazal, da vsebujejo zadovoljiv delež nepoškodovanih jeder (vzorci, pripravljeni pri poskusih 2, 5, 10, 12, 15, 16, 17 in 18).

Uporabili smo enak postopek in enake kemikalije kot pri kometnem testu s kvasovkami (postopek je predstavljen v poglavju 3.5.2) z manjšimi modifikacijami:

- kot 2. sloj minigelov smo nanašali 370 μL 1,6 % LMP agaroze z dodano suspenzijo razbitega tkiva,
- namakanje minigelov v raztopini za alkalno lizo je potekalo 55 min, namakanje v pufru za elektroforezo pa 40 min,
- elektroforeza je potekala 15 min pri 25 V, 130 mA in 3 W.

Ostalih postopkov nismo spreminjali.

Celice iz vsakega vzorca smo uporabili za pripravo dveh minigelov: na enega smo za 20 min nanesli raztopino 50 mM H_2O_2 (pozitivna kontrola), na drugega pa delovno raztopino fosfatnega pufra (negativna kontrola). Poškodbe DNA smo ocenili z vizualnim pregledom minigelov, pri čemer nas je zanimala zlasti poškodovansot DNA pri negativni kontroli in razlika v poškodovanosti DNA med pozitivno in negativno kontrolo.

Pri vzorcih, pri katerih je bila poškodovanost DNA pri negativni kontroli nizka (vzorca, pripravljena pri poskusih 17 in 18), smo kometni test trikrat ponovili, da bi preverili ponovljivost.

Izkazalo se je, da s postopkom razbijanja tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo dobimo dobro ponovljivost rezultatov, zato smo to metodo uporabljali v nadaljevanju.

3.7.3 Preverjanje občutljivosti in ponovljivosti prilagojenega postopka kometnega testa z izopodi *Porcellio scaber*

Da bi preverili občutljivost in ponovljivost uvedene metode kometnega testa z izopodi *Porcellio scaber*, smo izvedli kometni test, pri katerem smo pred alkalno lizo celic nanesli na minigele raztopine H₂O₂ različnih koncentracij (5 mM, 10 mM in 20 mM).

Kometni test smo izvedli po postopku, opisanem v poglavju 3.7.2, pri čemer smo hepatopankreas razbili z aspiracijo skozi injekcijsko iglo (poglavje 3.7.1.5). Za vsako koncentracijo H_2O_2 smo uporabil 8 živali. Ker smo suspenzijo celic hepatopankreasa posamezne živali nanesli na dva minigela in na posamezen minigel ocenili 60 kometov, smo za posamezno koncentracijo H_2O_2 ocenili skupno 960 kometov.

3.8 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV TiO₂ S KOMETNIM TESTOM NA IZOPODIH *Porcellio scaber*

3.8.1 Izpostavitev izopodov Porcellio scaber

S kometnim testom na celicah hepatopankreasa izopodov *Porcellio scaber* smo testirali genotoksičnost nanodelcev TiO_2 . Genotoksičnost nanodelcev TiO_2 s celicami hepatopankreasa smo testirali s tremi načini izpostavitve:

1. Prehranjevanje živali z listi, prevlečenimi z nanodelci TiO₂ (prehranjevalni poskus)

- 2. Peroralna aplikacija nanodelcev TiO2 neposredno pred izvedbo kometnega testa
- 3. Nanos TiO₂ na minigele med izvedbo kometnega testa

3.8.1.1 Prehranjevalni poskus z nanodelci TiO₂

V plastične petrijevke smo položili suhe leskine liste, ki smo jih predhodno stehtali. V petrijevke smo vnašali liste težke od 85 do 115 mg. Na stehtane leskine liste smo nanesli predhodno sonicirano suspenzijo nanodelcev TiO₂ (c=2000 μ g/mL), za kontrolno skupino živali pa destilirano vodo. Na liste smo nanesli toliko suspenzije nanodelcev TiO₂, da smo dobili liste s koncentracijo 2000 μ g TiO₂ na 1 g suhega lista. Ko so se listi posušili, smo v petrijevke vnesli živali (v eno petrijevko smo vnesli eno žival). Pokrov petrijevk smo navlažili z destilirano vodo in zaprte petrijevke z živalmi položili v stekleno posodo, ki je imela na dnu navlaženo papirnato brisačo. Da smo znotraj steklene posode vzdrževali konstantno vlažnost, smo jo pokrili s plastično folijo. V času prehranjevalnega poskusa so

se poskusne živali nahajale v prostoru s kontroliranimi pogoji (T= 20 ± 2 °C, tema). Med poskusom smo pokrov petrijevk večkrat navlažili.

Prehranjevalni poskus smo izvedli s tremi skupinami živali. V prvi skupini so bile živali, ki so bile izpostavljene nanodelcem TiO_2 7 dni. V drugi skupini so bile živali, ki smo jih po 7-dnevni izpostavitvi nanodelcem TiO_2 za 24 ur prestavili v novo petrijevko s svežim listom brez TiO_2 (pričakovali smo, da se bo med tem časom lumen hepatopankreasa očistil nanodelcev). V tretji skupini pa so bile kontrolne živali, ki so se 7 dni prehranjevale z leskovim listom brez TiO_2 . V vsaki skupini je bilo 9 živali.

Po končanem prehranjevalnem poskusu smo živali secirali in izvedli kometni test.

3.8.1.2 Peroralna aplikacija suspenzije nanodelcev TiO_2 neposredno pred izvedbo kometnega testa

Za poskus smo uporabili 8 živali iz gojitvene posode. Živali smo najprej stehtali in jim s pomočjo pipete na usta nanesli kapljico predhodno sonicirane suspenzije nanodelcev TiO_2 (c=2000 µg/mL). Vsaki živali smo nanesli posamezno kapljico 3×, med nanosi pa smo počakali 10 min, da so živali kapljico zaužile. Volumen kapljic, ki smo jih nanašali, je bil prilagojen masi živali (0,1 µL suspenzije nanodelcev TiO_2 na 1 mg mase živali). Potem ko so živali zaužile zadnjo kapljico, smo jih secirali in izvedli kometni test.

3.8.1.3 Nanos suspenzije nanodelcev TiO₂ na minigel

Za poskus smo uporabili 8 živali iz gojitvene posode. Živali smo secirali in izvedli kometni test, pri čemer smo po nanosu 3. sloja, na gel za 20 min nanesli 900 μ L predhodno sonicirane suspenzije nanodelcev TiO₂ (c=2000 μ g/mL).

3.8.2 Razbijanje tkiva

Postopek je predstavljen v poglavju 3.7.1.5.

3.8.3 Postopek kometnega testa

Za testiranje genotoksičnosti nanodelcev TiO_2 s kometnim testom na celicah hepatopankreasa *P. scaber* smo uporabili postopek, ki je opisan v poglavju 3.7.2.

Suspenzijo razbitega tkiva hepatopankreasa posamezne živali, zmešano z 1,6 % LMP agarozo, smo nanesli na dva stekelca (dve tehnični ponovitvi).

3.8.4 Ocenjevanje poškodb DNA

Postopek ocenjevanja je opisan v poglavju 3.5.2.4.

Pri posameznem minigelu smo ocenili 60 kometov. Ker smo celice hepatopankreasa ene živali nanesli na dva minigela, smo ocenili 120 kometov pri posamezni živali.

3.9 STATISTIČNA ANALIZA REZULTATOV KOMETNEGA TESTA

Rezultate ocenjevanja poškodb DNA s kometnim testom smo statistično analizirali. Pri kometnem testu s kvasovkami *S. cerevisiae* ZIM 1875 smo kot parameter stopnje poškodovanosti DNA uporabili repni moment po Olivu (OTM), pri kometnem testu z izopodi *P. scaber* pa delež DNA v repu (Tail DNA [%]).

Z računalniškim programom Microsoft Office Excel 2007 smo za posamezne vzorce izračunali povprečno vrednost izbranega parametra (aritmetično sredino), srednjo vrednost (mediano) ter standardni odklon.

Rezultate kometnega testa smo grafično prikazali z okvirji z ročaji (angl. *box plots*), ki smo jih izrisali s programom R 2.15.0.

Z računalniškega programa GraphPad Prism 5 Demo smo naredili Dunnovo statistiko in Kruskall-Wallisov test pri stopnji zaupanja α =0,05, s čimer smo želeli preveriti, ali se posamezne skupine rezultatov statistično značilno razlikujejo. Ko smo primerjali samo dve skupini rezultatov, smo uporabili Mann-Whitneyev test pri stopnji zaupanja α =0,05.

4 REZULTATI

4.1 VPLIV NANODELCEV TiO₂ NA RAST KVASOVK Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

4.1.1 Rastna krivulja kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Rastno krivuljo kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 smo izrisali na podlagi spremljanja rasti dveh kultur.

Optična gostota kulture je sorazmerna s koncentracijo celic v njej. Na sliki 12 je prikazana rastna krivulja kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 1875, izrisana na podlagi merjenja optične gostote (OD_{654}). Iz slike 12 je razvidno, da se intenzivna rast celic prične med štirimi in petimi urami od začetka kultivacije in traja do približno desete ure.



Slika 12: Rastna krivulja kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875, izrisana na podlagi dveh meritev OD₆₅₄

Na sliki 13 je prikazana rastna krivulja kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 1875, izrisana na podlagi štetja celic z mikroskopom z uporabo Neubauerjeve števne komore.



Slika 13: Rastna krivulja *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875, izrisana na podlagi štetja celic z uporabo Neubauerjeve komore

Rastni krivulji, prikazani na slikah 12 in 13, prikazujeta dinamiko rasti kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 1875 v gojišču YPD pri temperaturi 30 °C in stresanju pri 150 rpm. V prilogi A so podani podatki za izris rastnih krivulj, prikazanih na sliki 12 in 13.

4.1.2 Inhibicija rasti kvasov
k $Saccharomyces\ cerevisiae\ ZIM\ 1875\ ob\ izpostavitvi$ nanodelcem
 TiO2

Iz grafičnega prikaza je razvidno, da prisotnost nanodelcev TiO_2 v kulturi kvasovk zmanjša hitrost rasti kvasovk. Inhibicija rasti ni premo sorazmezna s koncentracijo nanodelcev TiO_2 .

Slika 14 prikazuje koncentracijo celic *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 pri izpostavitvi nanodelcem TiO₂, pri različnih časih kultivacije. Ker smo za vsako testno koncentracijo TiO₂ prešteli celice pri dveh bioloških ponovitvah, so grafično prikazane povprečne vrednosti koncentracije celic ter izračunani standardni odkloni. V prilogi B so podani podatki za izris slike 14.



Slika 14: Koncentracija celic *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 med kultivacijo ob izpostavitvi nanodelcem TiO₂

4.2 REZULTATI TESTIRANJA USTREZNOSTI PRILAGOJENEGA POSTOPKA KOMETNEGA TESTA S KVASOVKAMI *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875

S postopkom prilagojenega kometnega testa (postopek je opisan v poglavju 3.5.2) smo dokazali statistično značilne razlike v poškodbah jedrne DNA med negativno in pozitivno kontrolo. Poškodbe DNA smo ocenjevali z repnim momentom po Olivu (OTM).

Na slikah 15 in 16 so grafično prikazane porazdelitve vrednosti OTM pri posameznih poskusih. Slika 15 prikazuje rezultate poskusov z negativno kontrolo, slika 16 pa rezultate poskusov s pozitivno kontrolo.



Slika 15: Porazdelitev vrednosti OTM pri negativni kontroli

Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Poškodbe jedrne DNA so podane z OTM (repni moment po Olivu).



Slika 16: Porazdelitev vrednosti OTM pri pozitivni kontroli

Za pozitivno kontrolo smo na minigele za 20 min nanesli 50 mM raztopino H_2O_2 . Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Poškodbe jedrne DNA so podane z OTM (repni moment po Olivu)

Z Dunnovo statistiko in Kruskall-Wallisov testom pri stopnji zaupanja α =0,05 smo ugotovili, da med rezultati OTM posameznih ponovitev negativne oz. pozitivne kontrole ni statistično značilnih razlik (priloga C). Tako smo podatke posameznih ponovitev znotraj skupine združili in grafično prikazali na sliki 17.





Za pozitivno kontrolo smo na minigele za 20 min nanesli 50 mM raztopino H_2O_2 . Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 480 kometov (osmih minigelov). Z krogci so označeni osamelci. Poškodbe jedrne DNA so podane z OTM (repni moment po Olivu)

Preglednica 11: Statistični parametri rezultatov testiranja ustreznosti prilagojenega postopka kometnega testa s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875

			Standardni
		Mediana	odklon
Vzorec	Povprečje OTM	OTM	ОТМ
Pozitivna kontrola	23,16	23,90	13,75
Negativna kontrola	8,41	4,03	9,00

* Statistični parametri so izračunani na podlagi 480 meritev OTM pri posameznem vzorcu.

Z Mann-Whitneyevim testom smo ugotovili, da se združeni podatki vseh 480 meritev OTM za negativno in pozitivno kontrolo statistično značilno razlikujejo (P < 0,0001).

4.3 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV TiO₂ IN CuO S KVASOVKAMI Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

4.3.1 ATP-luciferazni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Iz grafičnega prikaza je razvidno, da prisotnost nanodelcev in makrodelcev TiO_2 in CuO zmanjša vsebnost ATP v kulturi kvasovk. Delci nanometerskih velikosti so povzročili večje zmanjšanje ATP v kulturi kvasovk kot delci večjih velikosti enake kemijske sestave.

Na slikah 18 in 19 je grafično prikazana povprečna vrednost vsebosti ATP v kulturi kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 treh bioloških ponovitev in pripadajoči standardni odklon. Podatki za izris grafov, prikazanih na sliki 18 in 19, so podani v prilogi D.

Slika 18 prikazuje vsebnost ATP v kulturi kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 1875 po 16-urni izpostavitvi TiO₂. Iz grafičnega prikaza je razvidno, da prisotnost TiO₂ v gojišču vpliva na vsebost ATP v kulturi. Razviden je tudi premosorazmeren vpliv koncentracije na zmanjšanje vsebnost ATP. Delci TiO₂ nanometrskih velikosti imajo večji vpliv na zmanjšanje vsebosti ATP v kulturi kot makrodelci.



Slika 18: Grafični prikaz koncentracije ATP v kulturi kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 po 16-urni izpostavitvi različnim koncentracijam TiO₂

Z oznako Nano so označena tretiranja z nanodelci TiO₂, z oznako Bulk pa tretiranja z makrodelci TiO₂.

Slika 19 prikazuje vsebnost ATP v kulturi kvasovk *S. cerevisiae* ZIM 1875 po 16-urni izpostavitvi CuO. Iz grafičnega prikaza je razvidno, da prisotnost CuO v gojišču vpliva na

vsebost ATP v kulturi. Razviden je premo sorazmeren vpliv koncentracije makrodelcev CuO na zmanjšanje vsebnost ATP. Vpliv koncentracije nanodelcev CuO ni premo sorazmeren z zmanjšanjem vsebnost ATP. Nanodelci CuO imajo večji vpliv na zmanjšanje vsebosti ATP v kulturi kot makrodelci.



Slika 19: Grafični prikaz koncentracije ATP v kulturi kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 po 16-urni izpostavitvi različnim koncentracijam CuO

Z oznako Nano so označena tretiranja z nanodelci CuO, z oznako Bulk pa tretiranja z makrodelci CuO.

4.3.2 Viabilnost kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875, določena s tripanskim modrilom

Iz rezultatov barvanja kvasovk s tripanskim modrilom je razvidno manjše zmanjšanje viabilnosti kvasovk, izpostavljenih TiO_2 in CuO, v primerjavi s kontrolo. Viabilnost tretiranih kvasovk je bila sprejemljiva za izvedbo kometnega testa.

Rezultati barvanja celic s tripanskim modrilom po 16-urni izpostavitvi TiO_2 in CuO so grafično prikazani na slikah 20 in 21. Podatki za izris grafov na slikah 20 in 21 so podani v prilogi E.



Slika 20: Viabilnost celic kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 po 16-urni izpostavitvi različnim koncentracijam TiO₂

Z oznako Nano so označena tretiranja z nanodelci TiO₂, z oznako Bulk pa tretiranja z makrodelci TiO₂.



Slika 21: Viabilnost celic kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 po 16-urni izpostavitvi različnim koncentracijam CuO

Z oznako Nano so označena tretiranja z nanodelci CuO, z oznako Bulk pa tretiranja z makrodelci CuO.

4.3.3 Kometni test s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Dobljene rezultate kometnega testa s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 smo statistično obdelali z Dunnovo statistiko in Kruskall-Wallisovim testom pri stopnji zaupanja α =0,05. Ugotovili smo, da se rezultati poškodovanosti DNA tehničnih in bioloških ponovitev znotraj posamezne skupine ne razlikujejo statistično značilno. V prilogi F so grafično prikazani rezultati ocenjevanja OTM posameznih minigelov pri tretiranju s TiO₂, v prilogi G pa rezultati pri tretiranju s CuO. Tako smo podatke vseh bioloških in tehničnih ponovitev znotraj posamezne skupine združili.

4.3.3.1 Genotoksičnost TiO₂

Rezultati ocenjevanja OTM so pokazali signifikantne razlike med negativno in pozitivno kontrolo (preglednica 13). Iz grafičnega prikaza rezultatov je razvidna povečana stopnja poškodb DNA pri kvasovkah izpostavljenim TiO₂. Stopnja poškodovanosti DNA je odvisna tako od koncentracije kot tudi od velikosti delcev.

Slika 22 grafično prikazuje porazdelitev vrednosti OTM pri kvasovkah, tretiranih z nanodelci in makrodelci TiO₂. Izračunani statistični parametri za posamezno testno skupino so podani v preglednici 12. V preglednici 13 so podani rezultati statistične analize podatkov.



Slika 22: Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk različnim koncentracijam TiO₂ Z oznako Nano so označena tretiranja z nanodelci TiO₂, z oznako Bulk pa tretiranja z makrodelci TiO₂. Za oznako je podana koncentracija v μ g/mL. Za pozitivno kontrolo smo na minigele za 20 min nanesli 50 mM raztopino H₂O₂. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 360 kometov (šestih minigelov). Z krogci so označeni osamelci. Poškodbe jedrne DNA so podane z OTM (repni moment po Olivu).

			Standardni
	Povprečje	Mediana	odklon
Vzorec	ОТМ	ОТМ	ОТМ
Negativna	9,07	4,04	11,02
Pozitivna	24,62	26,03	14,89
Bulk 0,1	11,76	7,53	12,44
Bulk 10	12,07	7,57	12,71
Bulk 100	14,36	12,27	13,18
Nano 0,1	17,05	15,36	13,97
Nano 10	20,80	21,30	14,16
Nano 100	17,32	18,04	13,34

Preglednica 12: Statistični parametri rezultatov testiranja genotoksičnosti TiO2 s kometnim teston	n na
kvasovkah Saccharomyces cerevisiae ZIM 187	

* Statistični parametri so izračunani na podlagi 360 meritev OTM pri posameznem vzorcu. Z oznako Nano so označena tretiranja z nanodelci TiO₂, z oznako Bulk pa tretiranja z makrodelci TiO₂.

Preglednica 13: Statistična analiza podatkov kometnega testa s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875, izpostvljenimi različnim koncentracijam TiO₂. Z oznako Nano so označena tretiranja z nanodelci TiO₂, z oznako Bulk pa tretiranja z makrodelci TiO₂. Za oznako je podana koncentracija TiO₂ v μ g/mL.

	Statistično	
	značilna	
Dunnov test primerjave	razlika	Povzetek
Negativna kontrola vs Pozitivna kontrola	Da	***
Negativna kontrola vs Bulk 0,1	Ne	ns
Negativna kontrola vs Bulk 10	Da	*
Negativna kontrola vs Bulk 100	Da	***
Negativna kontrola vs Nano 0,1	Da	***
Negativna kontrola vs Nano 10	Da	***
Negativna kontrola vs Nano 100	Da	***
Pozitivna kontrola vs Bulk 0,1	Da	***
Pozitivna kontrola vs Bulk 10	Da	***
Pozitivna kontrola vs Bulk 100	Da	***
Pozitivna kontrola vs Nano 0,1	Da	***
Pozitivna kontrola vs Nano 10	Ne	ns
Pozitivna kontrola vs Nano 100	Da	***
Bulk 0,1 vs Bulk 10	Ne	ns
Bulk 0,1 vs Bulk 100	Ne	ns
Bulk 0,1 vs Nano 0,1	Da	***
Bulk 0,1 vs Nano 10	Da	***
Bulk 0,1 vs Nano 100	Da	***
Bulk 10 vs Bulk 100	Ne	ns
Bulk 10 vs Nano 0,1	Da	***
Bulk 10 vs Nano 10	Da	***
Bulk 10 vs Nano 100	Da	***
Bulk 100 vs Nano 0,1	Ne	ns
Bulk 100 vs Nano 10	Da	***
Bulk 100 vs Nano 100	Da	*
Nano 0,1 vs Nano 10	Da	*
Nano 0,1 vs Nano 100	Ne	ns
Nano 10 vs Nano 100	Ne	ns

Legenda:

ns – statistično neznačilna razlika (P>0,05)

* - statistično značilna razlika (P<0,05)

*** - statistično značilna razlika (P<0,001)

4.3.3.2 Genotoksičnost CuO

Rezultati ocenjevanja OTM so pokazali signifikantne razlike med negativno in pozitivno kontrolo (preglednica 15). Iz grafičnega prikaza rezultatov je razvidna povečana stopnja poškodb DNA pri kvasovkah izpostavljenim nanodelcem CuO.

Slika 23 grafično prikazuje porazdelitev vrednosti OTM pri kvasovkah, tretiranih z nanodelci in makrodelci CuO. Izračunani statistični parametri za testne skupine so podani v preglednici 14. V preglednici 15 so podani rezultati statistične analize podatkov.



Slika 23: Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk različnim koncentracijam CuO Z oznako Nano so označena tretiranja z nanodelci CuO, z oznako Bulk pa tretiranja z makrodelci CuO. Za oznako je podana koncentracija v μ g/mL. Za pozitivno kontrolo smo na minigele za 20 min nanesli 50 mM raztopino H₂O₂. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 360 kometov (šestih minigelov). Z krogci so označeni osamelci. Poškodbe DNA so podane z OTM (repni moment po Olivu).

Vzorec	Povprečje OTM	Mediana OTM	Standardni odklon OTM
Negativna kontrola	9,13	5,09	10,20
Pozitivna kontrola	24,87	25,45	13,74
Bulk 0,005	9,28	5,58	9,91
Bulk 0,5	9,88	6,44	10,21
Bulk 50	12,64	10,65	10,46
Nano 0,005	11,41	9,44	10,13
Nano 0,5	16,05	15,19	11,99
Nano 50	13,43	11,75	10,74

Preglednica 14: Statistični parametri rezultatov testiranja genotoksičnosti CuO s kometnim testom s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875

*Statistični parametri so izračunani na podlagi 360 meritev OTM pri posameznem vzorcu. Z oznako Nano so označena tretiranja z nanodelci CuO, z oznako Bulk pa tretiranja z makrodelci CuO. Za oznako je podana koncentracija CuO v μg/mL.

Preglednica 15: Statistična analiza podatkov kometnega testa s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* **ZIM 1875, izpostvljenimi različnim koncentracijam CuO.** Z oznako Nano so označena tretiranja z nanodelci CuO, z oznako Bulk pa tretiranja z makrodelci CuO. Za oznako je podana koncentracija CuO v μg/mL.

	Statistično	
Dunnov test primerjave	razlika	Povzetek
Negativna kontrola vs Pozitivna kontrola	Da	***
Negativna kontrola vs Bulk 0,005	Ne	ns
Negativna kontrola vs Bulk 0,5	Ne	ns
Negativna kontrola vs Bulk 50	Da	***
Negativna kontrola vs Nano 0,005	Da	*
Negativna kontrola vs Nano 0,5	Da	***
Negativna kontrola vs Nano 50	Da	***
Pozitivna kontrola vs Bulk 0,005	Da	***
Pozitivna kontrola vs Bulk 0,5	Da	***
Pozitivna kontrola vs Bulk 50	Da	***
Pozitivna kontrola vs Nano 0,005	Da	***
Pozitivna kontrola vs Nano 0,5	Da	***
Pozitivna kontrola vs Nano 50	Da	***
Bulk 0,005 vs Bulk 0,5	Ne	ns
Bulk 0,005 vs Bulk 50	Da	***
Bulk 0,005 vs Nano 0,005	Ne	ns
Bulk 0,005 vs Nano 0,5	Da	***
Bulk 0,005 vs Nano 50	Da	***
Bulk 0,5 vs Bulk 50	Da	**
Bulk 0,5 vs Nano 0,005	Ne	ns
Bulk 0,5 vs Nano 0,5	Da	***
Bulk 0,5 vs Nano 50	Da	***
Bulk 50 vs Nano 0,005	Ne	ns
Bulk 50 vs Nano 0,5	Da	*
Bulk 50 vs Nano 50	Ne	ns
Nano 0,005 vs Nano 0,5	Da	***
Nano 0,005 vs Nano 50	Ne	ns
Nano 0,5 vs Nano 50	Ne	ns

Legenda:

ns - statistično neznačilna razlika (P>0,05)

* - statistično značilna razlika (0,01<P<0,05)

** -statistično značilna razlika (0,001<P<0,01)

*** - statistično značilna razlika (P<0,001)



Slika 24: Slike kometov kvasovk Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 (Avtor slike: Veno Kononenko) Sliko so bile posnete z epifluorecentnim mikroskopom pri 400 × povečavi. Slika A – negativna kontrola, B – pozitivna kontrola, C – makrodelci TiO₂ 10 μ g/mL, D – nanodelci TiO₂ 10 μ g/mL, E – makrodelci CuO 0,5 μ g/mL, F – nanodelci CuO 0,5 μ g/mL

4.4 PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA Z IZOPODI Porcellio scaber

4.4.1 Izolacija celic iz hepatopankreasa Porcellio scaber

4.4.1.1 Razbijanje tkiva hepatopankreasa s paličnim sonikatorjem

Metoda razbijanja tkiva s paličnim sonikatorjem se je izkazala kot pregroba metoda izolacije celic, s katero se poleg tkiva poškoduje tudi večina celic. Suspenzije z razbitim tkivom smo pregledali s svetlobnim mikroskopom. Opažanja so podana v preglednici 16.

Oznaka vzorca	Jakost amplitude	Rezultat
Poskus 1	Amplituda 3	Tkivo se ne razbije
Poskus 2	Amplituda 4	Tkivo in večina celic se razbije
Poskus 3	Amplituda 5	Tkivo in celice se popolnoma
		razbijejo

4.4.1.2 Soniciranje v ultrazvočni kopeli

Metoda izolacije celic s soniciranjem v ultrazvočni kopeli se je izkazala kot neprimerna. Glede na vizualno oceno je tkivo po soniciranju ostalo nepoškodovano.

4.4.1.3 Razbijanje tkiva hepatopankreasa v terilnici

Ob pregledu razbitega tkiva s svetlobnim mikroskopom smo opazili, da se je tkivo učinkovito razbilo. V suspenziji smo poleg huje poškodovanih celic opazili tudi lažje poškodovane celice in posamezna jedra.

4.4.1.4 Disociacija tkiva hepatopankreasa z uporabo encimov in EDTA

Po disociaciji tkiva z uporabo encimov in EDTA smo pregledali suspenzije razbitega tkiva s svetlobnim mikroskopom. V preglednici 17 so podana naša opažanja.

Oznaka	Rezultat
poskusa	
Poskus 6	Tkivo je po pipetiranju ostalo celo. Od tkiva se je sprostilo izredno malo celic, ki so bile
	razbite (jedra tudi).
Poskus 7	Tkivo je po pipetiranju ostalo celo. V suspenziji so bili vidni koščki razbitih celic. V
	suspenziji ni bilo vidnih celih jeder.
Poskus 8	Po inkubaciji je s pomočjo pipetiranja tkivo razpadlo. Pod mikroskopom so bili vidni večji
	skupki celic, razpadle celice in vezikli sproščeni iz celic. Celičnih jeder nismo opazili.
Poskus 9	Tkivo se po inkubaciji kljub intenzivnemu pipetiranju ni razbilo. Pod mikroskopom so bili
	vidni ostanki razbitih celic.
Poskus 10	Tkivo se je s pipetiranjem razbilo. V suspenziji so bile vidne razbite celice ter nekaj
	resuspendiranih celice. Videli smo tudi več skupkov celic.
Poskus 11	Tkivo se je s pipetiranjem v celoti razbilo. Celice so bile popolnoma razbite.
Poskus 12	Tkivo se je s pipetiranjem delno razbilo. Pod mikroskopom so bili vidni razbiti delci celic,
	vezikli, celična jedra ter manjše število celih celic. Vzorec smo pobarvali tudi po Giemsi
	(slika 25).
Poskus 13	Po inkubaciji se tkivo ni razbilo popolnoma niti z agresivnim pipetiranjem. Pod
	mikroskopom so bili vidni ostanki razbitih celic in vezikli.
Poskus 14	Po inkubaciji se tkivo kljub agresivnemu pipetiranju ni razbilo.
Poskus 15	Po inkubaciji se je tkivo razbilo s pipetiranjem. Pod mikroskopom so bile vidne razbite in
	cele celice.
Poskus 16	Po inkubaciji se je s pipetiranjem tkivo razbilo. Pod mikroskopom je bilo vidnih veliko
	celih celic, nekaj pa tudi razbitih. Vzorec smo tudi pobarvali po Giemsi (slika 26).
Poskus 17	Po vorteksiranju so bile v suspenziji vidne cele celice, nekaj poškodovanih celic, prisotni
	pa so bili tudi skupki celic.

Preglednica 17: Rezultati poskusov disociacije tkiva z uporabo encimov in EDTA



Slika 25: Slika vzorca razbitega tkiva hepatopankreasa, pridobljenega pri poskusu 12, barvanega po Giemsi (Avtor slike: Veno Kononenko)

Hepatopankreas smo po 60 min inkubaciji v 200 μ L 0,1 M EDTA z 200 uL fiziološke raztopine delno razbili s pipetiranjem in vzorec razbitega tkiva pobarvali po Giemsi. Slika A je bila posneta pri 200× povečavi, slika B pa pri 400× povečavi. V vzorcu so bila vidna celična jedra (veliko je bilo celih, nekaj je tudi razmazanih), ki so bila večinoma samostojna. Nekaj jeder je bilo obdanih s preostankom celice (večinoma poškodovane celice).



Slika 26: Slika vzorca razbitega tkiva hepatopankreasa, pridobljenega pri poskusu 16, barvanega po Giemsi (Avtor slike: Veno Kononenko)

Hepatopankreas smo po 70 min inkubaciji v 100 μ L 0,2 % kolagenaze z 100 μ L fiziološke raztopine razbili s pipetiranjem in vzorec razbitega tkiva pobarvali po Giemsi. Slika A je bila posneta pri 200× povečavi, slika B pa pri 400× povečavi. V vzorcu so bila vidna večinoma samostojna celična jedra. Približno polovica jeder je bilo celih, polovica pa poškodovanih (razmazanih). Nekaj jeder je bilo obdanih s preostankom celice (večinoma poškodovane celice).

4.4.1.5 Razbijanje tkiva hepatopankreasa z aspiracijo skozi injekcijsko iglo

Hepatopankreas smo s pomočjo aspiracije skozi injekcijsko iglo uspešno razbili. Pod mikroskopom so bila vidna posamezna celična jedra in celice s poškodovano celično membrano. Videli smo tudi manjše število celičnih skupkov.

4.4.2 Preverjanje vpliva postopka izolacije celic oziroma jeder hepatopankreasa na poškodbe DNA s kometnim testom

4.4.2.1 Kometni test s celicami iz poskusov 2, 5, 10, 12, 15, 16, 17 in 18

Poškodbe DNA smo ocenili z vizualnim pregledom minigelov, pri čemer nas je zanimala zlasti poškodovanost DNA pri negativni kontroli in razlika v poškodovanosti DNA med negativno in pozitivno kontrolo.

Pri razbijanju tkiva s soniciranjem (poskus 2) smo razbili tudi večino celic in jeder. Slika minigelov pri kometnem testu je bila homogena, z vidnimi svetlejšimi področji, kjer se je verjetno EtBr vezal na skupke razbite DNA (slika 27).



Slika 27: Slika minigela pri kometnem testu s hepatopankreasom razbitim s paličnim sonikatorjem (poskus 2) (Avtor slike: Veno Kononenko)

Tkivo hepatopankreasa smo razbili s paličnim sonikatorjem pri amplitudi 4. Slika je posneta pod $100\times$ povečavo.

Pri kometnem testu s hepatopankreasom, ki smo ga mehansko razbili v terilnici (poskus 5), smo pri ocenjevanju minigelov opazili veliko jeder, v katerih pa je bila DNA večinoma močno poškodovana (slika 28 A in B). Pri zelo redkih kometih smo opazili manjše poškodbe DNA (slika 28 C). Razlik med pozitivno in negativno kontrolo nismo opazili.



Slika 28: Slike kometov celic hepatopankreasa pri mehanskem razbijanju tkiva v terilnici (poskus 5) (Avtor slike: Veno Kononenko)

Sliki A in B sta posneti pri 100× povečavi, slika C pa pri 200× povečavi. Pri sliki A dolžina in jakost osvetljenosti kometnega repa nakazujeta večje pokodbe jedrne DNA. Pri sliki B je vidna skoraj popolna migracija DNA v rep kometa. Na sliki C so vidne manjše poškodbe DNA.

Pri kometnem testu s celicami hepatopankreasa, ki smo jih disociirali z uporabo encimov in EDTA (poskusi 10, 12, 15 in 16), smo opazili manjše razlike med pozitivno in negativno kontrolo. Tudi pri negativni kontroli smo zaznali poškodbe DNA. Pri negativnih kontrolah je bila zelo velika variabilnost v poškodovanosti DNA med posameznimi celicami.



Slika 29: Slike kometov celic hepatopankreasa, ki so bile pridobljene z disociacijo tkiva s kolagenazo (poskus 16) (Avtor slike: Veno Kononenko)

A – negativna kontrola; B – pozitivna kontrola. Celice hepatopankreasa so bile pridobljene z 70 minutno inkubacijo tkiva v 100 μ L 0,2 % kolagenaze in 100 μ L fiziološke raztopine. Sliki sta posneti pri 100× povečavi.

Pri kometnem testu s celicami hepatopankreasa, ki smo jih pridobili s pomočjo disociacije tkiva z uporabo kolagenaze in EDTA (poskus 17), ter z razbijanjem tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo (poskus 18), je bila poškodovanost DNA pri negativni kontroli relativno

nizka. Da bi preverili ponovljivost rezultatov, smo kometni test trikrat ponovili, pri čemer smo poškodbe DNA ocenjevali z deležem DNA v repu kometa (Tail DNA [%]).

Ponovljivost kometnega testa s celicami hepatopankreasa, ki smo jih pridobili s pomočjo disociacije tkiva z uporabo kolagenaze in EDTA (poskus 17), je bila slaba (slika 30), saj se je poškodovanost DNA pri različnih ponovitvah statistično značilno razlikovala (preglednica 18).



Slika 30: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri kometnem testu s celicami hepatopankreasa, ki smo jih pridobili s pomočjo disociacije tkiva z uporabo kolagenaze in EDTA (poskus 17)

Z oznako Negativna 1, 2 in 3 so prikazani rezultati ocenjevanja negativne kontrole, z oznako Pozitivna 1, 2 in 3 pa rezultati ocenjevanja pozitivne kontrole. Za pozitivno kontrolo smo na minigele za 20 min nanesli 50 mM raztopino H_2O_2 . Posamezen okvir z ročaji prikazuje rezultate ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Poškodbe jedrne DNA so podane z Tail DNA [%] (delež DNA v repu kometa).

V preglednici 18 so podani rezultati statistične analize rezultatov kometnega testa s celicami hepatopankreasa, pridobljenimi pri poskusu 17. Izračunani statistični parametri pri poskusu 17 so podani v preglednici 19.

Preglednica 18: Statistična analiza rezultatov kometnega testa s celicami hepatopankreasa, ki smo jih pridobili s pomočjo disociacije tkiva z uporabo kolagenaze in EDTA (poskus 17)

	Statistično značilna	
Dunnov test primerjave	razlika	Povzetek
Pozitivna 1 vs Pozitivna 2	Da	***
Pozitivna 1 vs Pozitivna 3	Da	**
Pozitivna 2 vs Pozitivna 3	Da	*
Negativna 1 vs Negativna 2	Da	***
Negativna 1 vs Negativna 3	Da	*
Negativna 2 vs Negativna 3	Ne	ns

Legenda:

ns - statistično neznačilna razlika (P>0,05)

* - statistično značilna razlika (0,01<P<0,05)

** -statistično značilna razlika (0,001<P<0,01)

*** - statistično značilna razlika (P<0,001)

Preglednica 19: Statistični parametri rezultatov ocenjevanja poškodb DNA pri kometnem testu s celicami hepatopankreasa, ki smo jih pridobili s pomočjo disociacije tkiva z uporabo kolagenaze in EDTA (poskus 17)

	Povprečje Tail	Mediana Tail	Standardni odklon Tail
Vzorec	DNA [%]	DNA [%]	DNA [%]
Pozitivna 1	69,93	71,61	11,18
Pozitivna 2	55,40	55,52	14,09
Pozitivna 3	61,60	65,01	15,22
Negativna 1	9,32	7,89	6,05
Negativna 2	20,95	15,88	17,44
Negativna 3	16,46	12,55	16,37

* Statistični parametri so izračunani na podlagi 60 meritev Tail DNA [%] pri posameznem vzorcu.



Slika 31: Slike kometov celic hepatopankreasa, ki smo jih pridobili s pomočjo disociacije tkiva z uporabo kolagenaze in EDTA (poskus 17) pri 100× povečavi (Avtor slike: Veno Kononenko)
A – negativna kontrola pri 1. poskusu; B – pozitivna kontrola pri 1. poskusu; C – negativna kontrola pri 2. poskusu; D – pozitivna kontrola pri 2. poskusu; E – negativna kontrola pri 3. poskusu; F – pozitivna kontrola pri 3. poskusu.

Ponovljivost kometnega testa s celicami hepatopankreasa, pridobljenimi z razbijanjem tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo (poskus 18), je bila dobra (slika 32), saj se poškodovanost DNA pri različnih ponovitvah ni statistično značilno razlikovala (preglednica 20).



Slika 32: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri kometnem testu s celicami hepatopankreasa, pridobljenimi z razbijanjem tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo (poskus 18)

Z oznako Negativna. 1, 2 in 3 so prikazani rezultati ocenjevanja negativne kontrole, z oznako Pozitivna. 1, 2 in 3 pa rezultati ocenjevanja pozitivne kontrole. Za pozitivno kontrolo smo na minigele za 20 min nanesli 50 mM raztopino H_2O_2 . Posamezen okvir z ročaji prikazuje rezultate ocenjevanja 60 kometov. Z krogci so označeni osamelci. Poškodbe jedrne DNA so podane z Tail DNA [%] (delež DNA v repu kometa).

V preglednici 20 so podani rezultati statistične analize rezultatov kometnega testa s celicami hepatopankreasa, pridobljenimi pri poskusu 18. Izračunani statistični parametri pri poskusu 18 so podani v preglednici 21.

	Statistično značilna	
Dunnov test primerjave	razlika	Povzetek
Pozitivna 1 vs Pozitivna 2	Ne	ns
Pozitivna 1 vs Pozitivna 3	Ne	ns
Pozitivna 2 vs Pozitivna 3	Ne	ns
Negativna 1 vs Negativna 2	Ne	ns
Negativna 1 vs Negativna 3	Ne	ns
Negativna 2 vs Negativna 3	Ne	ns

Preglednica 20: Statistična analiza rezultatov kometnega testa s celicami hepatopankreasa, pridobljenimi z razbijanjem tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo (poskus 18)

Legenda:

ns – statistično neznačilna razlika (P>0,05)
Preglednica 21: Statistični parametri rezultatov ocenjevanja poškodb DNA pri kometnem testu s celicami hepatopankreasa, pridobljenimi z razbijanjem tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo (poskus 18)

	Povprečje Tail	Mediana Tail	Standardni odklon	
Vzorec	DNA [%]	DNA [%]	Tail DNA [%]	
Pozitivna 1	55,98	56,19	15,24	
Pozitivna 2	59,13	57,68	13,15	
Pozitivna 3	61,57	62,61	12,60	
Negativna 1	6,73	5,26	6,11	
Negativna 2	8,80	6,06	8,084	
Negativna 3	8,72	8,36	6,74	

* Statistični parametri so izračunani na podlagi 60 meritev Tail DNA [%] pri posameznem vzorcu.



Slika 33: Slike kometov celic hepatopankreasa, pridobljenimi z razbijanjem tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo (poskus 18) pri 100× povečavi (Avtor slike: Veno Kononenko)

A – negativna kontrola pri 1. poskusu; B – pozitivna kontrola pri 1. poskusu; C – negativna kontrola pri 2. poskusu; D – pozitivna kontrola pri 2. poskusu; E – negativna kontrola pri 3. poskusu; F – pozitivna kontrola pri 3. poskusu.

4.4.3 Občutljivost in ponovljivost prilagojenega postopka kometnega testa z izopodi *Porcellio scaber*

S prilagojenim postopkom kometnega testa z izopodi *Porcellio scaber* smo pridobili zadovoljivo občutljivost in ponovljivost kometnega testa, saj se poškodbe DNA statistično značilno povečujejo z naraščujočo koncentracijo H_2O_2 . Rezultate posameznih meritev znotraj posameznih skupin (celice, tretirane z različnimi koncentracijami H_2O_2) smo združili in grafično prikazali (slika 34). Grafični prikaz porazdelitve rezultatov posameznih minigelov je podan v prilogi H.



Slika 34: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri tretiranju celic hepatopankreasa z različnimi koncentracijami H₂O₂

Kometni test smo izvedli po prilagojenem postopku kometnega testa z izopodi *Porcellio scaber* (poglavje 3.7.3). Posamezen okvir z ročaji prikazuje rezultate ocenjevanja 960 kometov. Z krogci so označeni osamelci. Poškodbe jedrne DNA so podane z Tail DNA [%] (delež DNA v repu kometa).

S statistično analizo smo potrdili, da se rezultati merjenja Tail DNA [%] med posameznimi skupinami (5mM H_2O_2 , 10 mM H_2O_2 in 20 mM H_2O_2) statistično značilno razlikujejo (preglednica 22). Izračunani statistični parametri so podani v preglednici 23.

Dunnov test primerjave	Statistično značilna razlika	Povzetek
5mM H202 vs 10mM H2O2	Da	***
5mM H202 vs 20mM H2O2	Da	***
10mM H2O2 vs 20mM H2O2	Da	***

Preglednica 22: Statistična analiza rezultatov kometnega testa s celicami hepatopankreasa, tretiranimi z različnimi koncentracijami H₂O₂

Legenda:

*** - statistično značilna razlika (P<0,001)

Preglednica 23: Statistični parametri rezultatov ocenjevanja DNA poškodb pri kometnem testu s celicami hepatopankreasa, tretiranimi z različnimi koncentracijami H₂O₂

Vzorec	Povprečje Tail DNA [%]	Mediana Tail DNA [%]	Standardni odklon Tail DNA [%]
5 mM H202	19,64	15,82	15,22
10 mM			
H2O2	38,67	38,13	11,34
20 mM			
H2O2	56,13	56,24	10,52

*Statistični parametri so izračunani na podlagi 960 meritev Tail DNA [%] za posamezen vzorec.

4.5 TESTIRANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV TiO₂ S KOMETNIM TESTOM NA IZOPODIH Porcellio scaber

4.5.1 Rezultati kometnega testa z izopodi Porcellio scaber po prehranjevalnem poskusu z nanodelci TiO_2

S kometnim testom smo zaznali povečano poškodovanost DNA pri skupini živali, ki je bila 7 dni izpostavljena nanodelcem TiO₂. Pri živalih, ki so bile po 7-dnevni izpostavitvni nanodelcem TiO₂ prestavljne za 24 ur na čisto hrano, nismo zaznali povečanja poškodb DNA v primerjavi s kontrolnimi živalmi.

Med prehranjevalnim poskusom so nekatere živali poginile, tako da smo kometni test izvedli s 7 živalmi v kontrolni skupini, z 8 živalmi v skupini, ki je bila 7 dni izpostavljena nanodelcem TiO₂ (2000 μ g/g), ter 9 živalmi v skupini, ki je bila po 7-dnevni izpostavitvi nanodelcem TiO₂ (2000 μ g/g) še 24 ur na čisti hrani.

Na sliki 35 so prikazane povprečne vrednosti Tail DNA [%] ocenjevanja posameznih minigelov.



Slika 35: Povprečne vrednosti Tail DNA [%] različnih skupin živali

Posamezna točka predstavlja povprečno vrednost Tail DNA [%] (delež DNA v repu kometa) enega minigela (60 kometov).

Iz slike 35 je razvidna velika variabilnost poškodb DNA pri skupini živali, ki je bila izpostavljena nanodelcem TiO₂7 dni. Kljub razlikam smo po skupinah združili rezultate meritev Tail DNA [%] posameznih minigelov. Združeni rezultati meritev posameznih skupin so grafično prikazani na sliki 36. Grafični prikaz porazdelitve rezultatov posameznih minigelov je podan v prilogi I.



Slika 36: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri prehranjevalnem poskusu z nanodelci TiO₂ Okvir z ročaji kontrolne skupine živali prikazuje rezultate ocenjevanja 840 kometov (7 živali). Okvir z ročaji skupine živali, ki je bila 7 dni izpostavljena nanodelcem TiO₂, prikazuje rezultate ocenjevanja 960 kometov (8 živali). Okvir z ročaji skupine živali, ki je bila po 7-dnevni izpostavitvi nanodelcem TiO₂ za 24 ur prestavljena na čisto hrano, prikazuje rezultate ocenjevanja 1080 kometov (9 živali). Z krogci so označeni osamelci. Poškodbe jedrne DNA so podane z Tail DNA [%] (delež DNA v repu kometa).

S statistično analizo smo potrdili, da se poškodovanost DNA skupine živali, ki je bila 7 dni izpostavljena nanodelcem TiO₂ (2000 μ g/g) statistično značilno razlikujejo od poškodovanosti DNA ostalih dveh skupin (preglednica 24). Izračunani statistični parametri so podani v preglednici 25.

Dunnov test primerjaveStatistično
značilna
razlikaPovzetekKontrola vs TiO2 7dniDa***Kontrola vs TiO2-7dni+24 ur čista hranaNensTiO2 7dni vs TiO2-7dni+24 ur čista hranaDa***

Preglednica 24: Statistična analiza rezultatov kometnega testa s *Porcellio scaber* po prehranjevalnem poskusu z nanodelci TiO₂

Legenda:

ns – statistično neznačilna razlika (P>0,05)

*** - statistično značilna razlika (P<0,001)

Vzorec	Povprečje Tail DNA [%]	Povprečje Mediana Fail DNA Tail DNA [%] [%]	
Kontrola	7,38	5,85	6,46
TiO ₂ -7dni	11,86	8,40	11,80
TiO ₂ -7dni+24 ur čista			
hrana	8,09	5,61	9,00

Preglednica 25: Statistični parametri rezultatov kometnega testa s *Porcellio scaber* po prehranjevalnem poskusu z nanodelci TiO₂

4.5.2 Rezultati kometnega testa s *Porcellio scaber* po peroralni aplikaciji suspenzije nanodelcev TiO₂ in z nanosom suspenzije nanodelcev TiO₂ na minigel

Stopnja poškodovanosti DNA po peroralni aplikaciji suspenzije nanodelcev TiO_2 in z nanosom nanodelcev TiO_2 na minigel se je v primerjavi z negativno kontrolo izrazito povečala.

Rezultati meritev Tail DNA [%] znotraj posamezne skupine so grafično prikazani na sliki 37. Grafični prikaz porazdelitve rezultatov posameznih minigelov je podan v prilogi J.



Slika 37: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri kometnem testu s Porcellio scaber po peroralni aplikaciji suspenzije nanodelcev TiO₂ in po nanosu suspenzije nanodelcev TiO₂ na minigel Posamezen okvir z ročaji prikazuje rezultate ocenjevanja 960 kometov (8 živali). Z krogci so označeni osamelci. Poškodbe jedrne DNA so podane z Tail DNA [%] (delež DNA v repu kometa).

Z Mann-Whitneyevim testom smo potrdili, da se podatki poškodovanosti DNA med obema skupinama statistično značilno razlikujejo (P < 0,0001). Izračunani statistični parametri so podani v preglednici 26.

Preglednica 26: Statistični parametri rezultatov kometnega testa s *Porcellio scaber* po peroralni aplikaciji suspenzije nanodelcev TiO₂ in z nanosom suspenzije nanodelcev TiO₂ na minigel

Vzorec	Povprečje Tail DNA [%]	Mediana Tail DNA [%]	Standardni odklon Tail DNA [%]	
TiO ₂ -kaplica na usta	29,49	25,96	17,61	
TiO ₂ na gel	47,83	48,27	19,63	

4.5.3 Primerjava rezultatov kometnega testa z izopodi Porcellio scaber

Za boljšo ponazoritev rezultatov kometnega testa z izopodi *Porcellio scaber* smo na sliki 38 prikazali porazdelitev rezultatov vseh meritev po skupinah.



Slika 38: Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri kometnem testu s *Porcellio scaber* ob različnih tretiranjih

V preglednici 27 so prikazani rezultati statističnih primerjav Tail DNA [%] posameznih skupin.

Poškodbe jedrne DNA so podane z Tail DNA [%] (delež DNA v repu kometa). Z krogci so označeni osamelci.

	Statistično	
Dunnov test primeriave	znacilna razlika	Povzetek
Kontrola vs TiO ₂ -7dni	Da	***
Kontrola vs TiO ₂ -7dni+24 ur	Ne	ns
Kontrola vs TiO ₂ -kapljica na usta	Da	***
Kontrola vs TiO ₂ na gel	Da	***
Kontrola vs 05mM H202	Da	***
Kontrola vs 10mM H2O2	Da	***
Kontrola vs 20mM H2O2	Da	***
TiO ₂ -7dni vs TiO ₂ -7dni+24 ur	Da	***
TiO ₂ -7dni vs TiO ₂ -kapljica na usta	Da	***
TiO ₂ -7dni vs TiO ₂ na gel	Da	***
TiO ₂ -7dni vs 05mM H202	Da	***
TiO ₂ -7dni vs 10mM H2O2	Da	***
TiO ₂ -7dni vs 20mM H2O2	Da	***
TiO ₂ -7dni+24 ur vs TiO ₂ -kapljica na usta	Da	***
TiO ₂ -7dni+24 ur vs TiO ₂ na gel	Da	***
TiO ₂ -7dni+24 ur vs 05mM H202	Da	***
TiO ₂ -7dni+24 ur vs 10mM H2O2	Da	***
TiO ₂ -7dni+24 ur vs 20mM H2O2	Da	***
TiO ₂ -kapljica na usta vs TiO2 na gel	Da	***
TiO ₂ -kapljica na usta vs 05mM H202	Da	***
TiO ₂ -kapljica na usta vs 10mM H2O2	Da	***
TiO ₂ -kapljica na usta vs 20mM H2O2	Da	***
TiO ₂ na gel vs 05mM H202	Da	***
TiO ₂ na gel vs 10mM H2O2	Da	***
TiO ₂ na gel vs 20mM H2O2	Da	***
05mM H202 vs 10mM H2O2	Da	***
05mM H202 vs 20mM H2O2	Da	***
10mM H2O2 vs 20mM H2O2	Da	***

Preglednica 27: Statistična analiza rezultatov kometnega testa s Porcellio scaber

Legenda:

ns – statistično neznačilna razlika (P>0,05)

*** - statistično značilna razlika (P<0,001)

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Z rastno krivuljo kvasovk smo pridobili informacije o časovnem poteku rastnih faz *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 pri izbranih pogojih gojenja. Pridobili smo informacije o vrednosti optične gostote kulture ob prehodu v eksponentno fazo rasti, ko smo pričeli s tretiranjem kvasovk s TiO_2 in CuO.

S spremljanjem rasti kvasovk ob izpostavitvi nanodelcem TiO_2 smo potrdili delovno hipotezo o vplivu nanodelcev TiO_2 na inhibicijo rasti. Prisotnost nanodelcev TiO_2 v kulturi zmanjša hitrost rasti kvasovk (slika 14). Inhibicija rasti z nanodelci TiO_2 je lahko posledica oksidativnega stresa. Zmanjšana rast kvasovk ni bila premo sorazmezna s koncentracijo nanodelcev TiO_2 , kar lahko razložimo z dejstvom, da se nanodelci v suspenziji pri višjih koncentracijah hitreje aglomerirajo, s čimer se zmanjša njihova specifična površina, poleg tega pa se večji delci v suspenziji hitreje posedejo (Allouni in sod., 2009). Dobljeni rezultati spremljanja rasti kvasovk ob izpostavitvi nanodelcem TiO_2 se razlikujejo od podatkov v literaturi (Kasemets in sod., 2009), kjer navajajo, da nanodelci TiO_2 niso inhibirali rasti kvasovk *S. cerevisiae* S288C. Možen vzrok za različne rezultate je lahko uporaba različnih sevov *S. cerevisiae* in različnih velikost uporabljenih nanodelcev TiO_2 , saj so oni uporabljali delce velikosti 25-70 nm, mi pa velikosti < 25 nm. Adams in sod. (2006) pa so pokazali inhibitoren učinek nanodelcev TiO_2 na rast bakterij. Pri koncentraciji 1000 µg/mL so nanodelci TiO_2 inhibirali rast bakterij *Bacillus subtilis* za 75 % in *Escherichia coli* za 44 %.

Čeprav je bil kometni test s kvasovkami *S. cerevisiae* že večkrat uporabljen (Azevedo in sod., 2011; Miloshev in sod., 2002; Peycheva in sod., 2009; Lah in sod., 2004), nam po postopku, ki so ga razvili Miloshev in sod. (2002), s kvasovkami *S. cerevisiae* ZIM 1875 ni uspelo dokazati razlik med pozitivno in negativno kontrolo, saj pri nobeni celici nismo zaznali poškodb DNA. Poleg uporabe drugačnega seva *S. cerevisiae* je možen razlog za neuspeh tudi uporaba drugačnega encima za razgradnjo celične stene kvasovk. Miloshev in sod. (2002) so uporabili encim Zimolaza 20 T, mi pa encim litikaza iz *Arthrobacter luteus* (Sigma-Aldrich).

S podaljšanjem časa alkalne lize, podaljšanjem časa elektroforeze, povečanjem koncentracije nanešenega H_2O_2 in z ostalimi modifikacijami prvotnega postopka smo želeli olajšati migracijo DNA med elektroforezo. Poškodb DNA nismo dokazali, dokler nismo znatno podaljšali časa delovanja litikaze. Iz tega lahko sklepamo, da je celična stena predstavljala glavno oviro, ki je onemogočala potovanje DNA proti anodi.

Pri predolgem času delovanja in previsoki koncentraciji litikaze nam s centrifugiranjem ni

uspelo skoncentrirati kvasovk. Predvidevali smo, da so bile celice ob centrifugiranju popolnoma protoplastirane, s čimer so postale občutljivejše za mehansko silo in so se med centrifugiranjem razbile. Pri predolgem protoplastiranju kvasovk (19 ur) smo ob ocenjevanju kometov zaznali večje poškodbe DNA tudi pri negativni kontroli. Predvidevali smo, da so se po 19-urnem protoplastiranju v celicah kvasovk že pričeli avtolitični procesi razgradnje DNA, zato smo čas protoplastiranja skrajšali na 16 ur in tako dobili zadovoljive rezultate.

Ko smo na stekelce nanesli zgolj dva sloja agaroze nizke koncentracije, smo ob ocenjevanju kometov večkrat zasledili premikanje celic, kar je onemogočalo ocenjevanje. Zato smo se pri izvedbi kometnega testa odločili povišati koncentracijo agaroze in na stekelce nanesti dodaten sloj, s čimer smo rešli težavo s premikanjem celic.

Tekom dela s kometnim testom smo prišli do spoznanja, da je pri delu potrebno uporabljati sveže pripravljene kemikalije ter agarozo za minigele, saj se s časom lahko kontaminirajo z mikroorganizmi. To lahko otežuje ocenjevanje kometov, saj se v minigelih poleg kometov obarvajo tudi mikroorganizmi.

Postopek kometnega testa s kvasovkmi, ki so ga razvili Miloshev in sod. (2002), smo modificirali na nivoju priprave celic, inkubacijskega časa v raztopini za alkalno lizo, poteka elektroforeze in koncentracije EtBr za vizualizacijo kometov. Po optimizaciji smo pridobili prilagojen postopek kometnega testa s kvasovkami *S. cerevisiae* ZIM 1875, s katerim smo testirali genotoksičnost nanodelcev TiO₂ in CuO. Kljub temu, da smo pri negativni kontroli zaznali manjše poškodbe DNA, smo med negativno in pozitivno kontrolo dobili statistično značilne razlike v poškodovanosti DNA (slika 17). Pri pozitivnih kontrolah smo na minigele nanašali raztopino vodikovega peroksida (H₂O₂), ki preko visoko reaktivnih hidroksilnih radikalov povzroči oksidativne poškodbe in enojne prelome DNA (Horváthová in sod., 1998).

Pred izvedbo kometnega testa s kvasovkami *S. cerevisiae* ZIM 1875 za testiranje genotoksičnosti nanodelcev TiO₂ in CuO smo izmerili energetsko stanje in viabilnost izpostavljenih kvasovk. Z ATP-luciferaznim testom smo po 16-urni izpostavitvi kvasovk nanodelcem in makrodelcem TiO₂ ter CuO zaznali občutno znižanje vsebnosti ATP v kulturi kvasovk. Iz grafičnega prikaza (sliki 18 in 19) je razviden premo sorazmeren vpliv koncentracije TiO₂ (nanodelcev in makrodelcev) na zmanjšanje vsebnost ATP, medtem ko je pri CuO premo sorazmeren vpliv viden le pri makrodelcih. Pri nanodelcih CuO pa koncentracija 0,5 µg/mL bolj vpliva na zmanjšano vsebnost ATP v kulturi kot suspenziji pri višjih koncentracijah hitreje aglomerirajo, s čimer se zmanjša njihova specifična površina, poleg tega pa se večji delci v suspenziji hitreje posedejo (Allouni in sod., 2009). Ni pa povsem jasno, zakaj smo premo sorazmerno korelacijo med

koncentracijo nanodelcev in zmanjšano vsebnostjo ATP v kulturi zaznali pri nanodelcih TiO₂, kar je v nasprotju z rezultati inhibicije rasti kvasovk (slika 14). Potrebno pa se je zavedati, da smo pri spremljanju kvasovk ob izpostavitvi nanodelcem TiO₂ uporabili bolj koncentrirano založno suspenzijo nanodelcev (preglednica 3), kjer so nanodelci podvrženi hitrejši aglomeraciji. Iz grafičnega prikaza koncentracije ATP v kulturi kvasovk je razviden tudi večji vpliv nanodelcev kot makrodelcev na zmanjšanje vsebnosti ATP v kulturi (sliki 18 in 19). Iz rezultatov ATP-luciferaznega testa lahko zaključimo, da TiO₂ in CuO vplivata na energetsko stanje kulture kvasovk, pri čemer pa je potrebno poudariti možnost, da je znižanje vsebnosti ATP v kulturi kvasovk in nižje koncentracije celic. Če bi želeli z ATP-luciferaznim testom preveriti viabilnost celic, bi morali ob izvedbi testa določiti tudi koncentracijo celic, da bi lahko izračunali vsebnost ATP na celico.

Iz praktičnega dela pri ATP-luciferaznem testu smo ugotovili, da je za natančne meritve in verodostojne rezultate bistvenega pomena natančna izvedba testa, saj je test izredno občutljiv. Potrebno je biti pozoren na čas trajanja posameznega koraka in na ustrezne temperature pri posameznih korakih. Vse reagente in vzorce je potrebno zavarovati pred izpostavitvijo svetlobi.

Viabilnost izpostavljenih kvasovk smo določili z barvanjem s tripanskim modrilom. Ugotovili smo, da izbrane koncentracije testnih snovi občutno ne zmanjšajo viabilnosti kvasovk (sliki 20 in 21) in da je viabilnost sprejemljiva za izvedbo kometnega testa.

Pri kometnem testu s kvasovkami *S. cerevisiae* ZIM 1875 se rezultati ocenjevanja kometov (OTM) znotraj posameznih skupin ne razlikujejo statistično značilno, iz česar lahko sklepamo, da smo postopek kometnega testa uspešno prilagodili.

Iz statistične analize rezultatov testiranja genotoksičnosti TiO₂ (preglednica 13) je razvidno, da se pri vseh uporabljenih koncentracijah nanodelcev TiO₂ stopnja poškodb DNA statistično značilno poveča v primerjavi z negativno kontrolo. Največje poškodbe je povzročila koncentracija nanodelcev 10 μ g/mL. Testna koncentracija nanodelcev TiO₂ 100 μ g/mL je povzročila manjše poškodbe DNA kot koncentracija 10 μ g/mL, verjetno zaradi hitrejše aglomeracije delcev, kar pa nismo preverili. Tudi makrodelci TiO₂ so povrzočili povečano stopnjo poškodb DNA, pri čemer se poškodovanost DNA le pri najnižji koncentraciji (0,1 μ g/mL) ne razlikuje statistično značilno od negativne kontrole. Pri makrodelci TiO₂ smo zaznali premo sorazmerno korelacijo med koncentracijo in stopnjo poškodb DNA. Rezultati so pokazali, da nanodelci TiO₂ povzročijo statistično značilno večje poškodbe DNA kot makrodelci TiO₂ enakih koncentracij. Najmanjše razlike v poškodovanosti DNA med nanodelci in makrodelci smo zaznali pri koncentraciji 100 μ g/mL, kar potrjuje domnevo, da se nanodelci pri višjih koncentracijah hitreje aglomerirajo in tvorijo večje skupke.

Tudi pri testiranju genotoksičnosti CuO s kometnim testom s kvasovkami *S. cerevisiae* ZIM 1875 je iz statistične analize rezultatov razvidno, da se pri vseh uporabljenih koncentracijah nanodelcev CuO stopnja poškodb DNA statistično značilno poveča v primerjavi z negativno kontrolo (preglednica 15). Podobno kot pri nanodelcih TiO₂, tudi pri nanodelcih CuO, stopnja poškodb DNA ni premo sorazmerna s koncentracijo, saj smo pri koncentraciji 0,5 µg/mL zaznali večje poškodbe kot pri koncentraciji 50 µg/mL. Tudi tu je možen vzrok hitrejša aglomeracija nanodelcev pri višji koncentraciji. Pri makrodelcih CuO smo dobili statistično značilno povečanje poškodb DNA v primerjavi z negativno kontrolo le pri najvišji uporabljeni koncentraciji (50 µg/mL). Rezultati nakazujejo, da nanodelci CuO povzročijo večje poškodbe DNA kot makrodelci CuO enakih koncentraciji 0,5 µg/mL. Glede na povprečno vrednost OTM so pri makrodelcih CuO poškodbe DNA premo sorazmerne s koncentracijo. Povečano genotoksičnost nanodelcev v primerjavi z makrodelci lahko pojasnimo z dejstvom, da se z manjšanjem delcev povečuje njihova specifična površina in reaktivnost, hkrati pa manjši delci lažje prodirajo v celice.

Pri testiranju genotoksičnosti nanodelcev s kometnim testom s kvasovkami ne moremo ovreči možnosti, da so nanodelci prisotni ob liziranih celicah med izvedbo kometnega testa, s čimer obstaja možnost, da poškodbe DNA nastanejo šele med izvedbo testa. Temu smo se skušali izogniti z večkratnim spiranjem kvasovk po izpostavitvi, a smo pri vsakem ciklu spiranja in koncentriranja celic s centrifugiranjem izgubili večje število kvasovk. Tako smo kvasovke spirali le enkrat.

Prisotnosti nanodelcev med izvedbo kometnega testa smo se želeli izogniti z izvedbo kometnega testa z izopodi *Porcellio scaber*, pri čemer smo pridobili možnost, da po izpostavitvi živali »očistimo« nanodelcev z enodnevno prestavitvijo na čisto hrano.

Prilagoditve kometnega testa z izopodi *P. scaber* smo se lotili z izolacijo celic iz hepatopankreasa. Do sedaj kometni test še ni bil izveden s celicami iz primerljivega tkiva, zato smo se izolacije celic lotili na različne načine. Ker so celice hepatopankreasa zelo občutljive, nam z nobenim postopkom ni uspelo izolirati večjega števila nepoškodovanih celic, pridobili pa smo nepoškodovana celična jedra. S kometnim testom smo preverili, kako vplivajo različni postopki disociacije tkiva na stopnjo poškodovanosti DNA v izoliranih jedrih, saj se ob hujših poškodbah celic lahko pričnejo avtolitični procesi razgradnje DNA. Poleg razbijanja tkiva z aspiracijo skozi injekcijsko iglo smo tudi z uporabo kolagenaze in EDTA (poskus 17) dobili relativno dobre rezultate, ki pa so od poskusa do poskusa variirali (slika 30). Pri disociaciji tkiva z uporabo encimov in EDTA smo imeli probleme zaradi razlik med tkivi različnih živali. Po določenem času inkubacije z encimi in/ali EDTA se je pri nekaterih živalih tkivo uspešno razbilo, pri drugih pa ne. Najmanjše poškodbe DNA smo zaznali pri kometnem testu, pri katerem smo tkivo razbili z aspiracijo skozi injekcijsko iglo (slika 32). Pri tem je potrebno poudariti, da lahko pregroba aspiracija povzroči nastanek poškodb DNA. Pred razbitjem smo tkivo namakali v 0,1 M raztopini EDTA. EDTA smo uporabili, ker deluje kot kelator in veže dvovalentne katione, ki so kofaktorji deoksiribonukleaz (Steward, 2001), poleg tega pa zaplemba dvovalentnih kalcijevih ionov zmanjša integriteto medceličnih povezav – dezmosomov (*macula adherens*) (Sedar in Forte, 1964).

Občutljivost in ponovljivost kometnega testa z izopodi *P. scaber* smo testirali z nanosom raztopin H_2O_2 različnih koncentracij (5 mM, 10 mM in 20 mM) na minigele. Pri ocenjavanju poškodb DNA so bile v nekaterih gelih vidne tudi nečistoče, ki ovirajo natančno ocenjevanje poškodb DNA. Celice oziroma jedra bi bilo potrebno sprati in ločiti od ostankov poškodovanih celic. To nam ni uspelo, saj se ob centrifugiranju celice in jedra dodatno poškodujejo. Kljub temu je postopek izvedbe kometnega testa glede na dobljene rezultate zadovoljiv.

Poškodovanost DNA se je povečevala premo sorazmerno z naraščujočo koncentracijo H_2O_2 (slika 34). Poškodovanost DNA pri različnih koncentracijah H_2O_2 se statistično značilno razlikuje (preglednica 22), kar kaže na ustrezno občutljivost in ponovljivost prilagojenega postopka kometnega testa z izopodi *P. scaber*.

S kometnim testom na celicah hepatopankreasa izopodnih rakov *P. scaber* smo testirali genotoksičnost nanodelcev TiO₂ ob različnih izpostavitvah. Med prehranjevalnim poskusom so nekatere živali poginile, verjetno zaradi stresa ob spremembi okolja. Pri skupini živali, ki je bila 7 dni izpostavljena nanodelcem TiO₂, smo zaznali povečanje poškodb DNA, vendar so se rezultati ocenjevanja poškodb DNA med posameznimi živalmi močno razlikovali (slika 35). Variabilnost rezultatov je lahko posledica biološke raznolikosti odzivov in tudi različne intenzivnosti prehranjevanja živali. Pri živalih, ki so bile po izpostavitvi nanodelcem TiO₂ za 24 ur prestavljene na čisto hrano, nismo zaznali povečanja poškodb DNA v primerjavi s kontrolno skupino živali. Obstaja možnost, da so popravljalni mehanizmi v času 24 ur, ko živali niso bile več izpostavljene nanodelcem TiO₂, že popravili poškodbe DNA, ki so nastale med izpostavitvijo nanodelcem TiO₂. Možno je pa tudi, da so poškodbe DNA, ki smo jih zaznali pri živalih, ki so bile 7 dni izpostavljena nanodelcem TiO₂, nastale šele med izvedbo kometnega testa.

Da bi preverili, kakšen vpliv ima prisotnost nanodelcev TiO_2 med izvedbo kometnega testa, smo izvedli kometni test z izopodi *P. scaber*, ki smo jim neposredno pred izvedbo kometnega testa peroralno aplicirali suspenzijo nanodelcev TiO_2 . Poleg tega smo naredili tudi poskus z direktnim nanosom suspenzije nanodelcev TiO_2 na minigel. Rezultati obeh poskusov so pokazali izrazito povečanje poškodb DNA (slika 37). Pri nanosu suspenzije nanodelcev TiO_2 na gel smo zaznali večje poškodbe DNA kot pri peroralni aplikaciji, kar je razumljivo, saj pri peroralni aplikaciji pride v stik s celicami hepatopankreasa manjša količina nanodelcev, poleg tega pa se suspenzija nanodelcev razredči z vsebino

hepatopankreasa. Iz rezultatov je razvidno, da prisotnost nanodelcev TiO_2 med izvedbo kometnega testa povzroči poškodbe DNA.

5.2 SKLEPI

Potrdili smo, da nanodelci TiO₂ inhibirajo rast kvasovk.

Nanodelci TiO₂ in CuO zmanjšajo vsebnost ATP v kulturi kvasovk.

Viabilnost kvasovk, izpostavljenih TiO_2 in CuO, je bila zadovoljiva za izvedbo kometnega testa.

Postopek kometnega testa s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 smo uspešno prilagodili. Potrdili smo, da nanodelci TiO₂ in CuO lahko povzročijo poškodbe DNA pri kvasovkah *S. cerevisiae* ZIM 1875. Stopnja poškodovanosti DNA je odvisna od koncentracije nanodelcev, pri čemer korelacija med koncentracijo in poškodovanostjo DNA ni sorazmerna. Potrdili smo, da je genotoksičnost odvisna tudi od velikosti delcev, pri čemer lahko manjši delci povzročijo večje pokodbe DNA. Potrebno pa je poudariti, da pri testiranju s kometnim testom ni možno povsem izločiti interakcij med delci in metodo, kar potrebuje nadaljnjo pozornost. Ne moremo ovreči možnosti, da so nanodelci prisotni ob liziranih celicah med izvedbo kometnega testa, s čimer obstaja možnost, da poškodbe DNA nastanejo šele med izvedbo testa.

Uspeli smo prilagoditi kometni test z izopodi *Porcellio scaber* za testiranje genotoksičnosti nanodelcev TiO₂. S kometnim testom z izopodi *P. scaber* smo potrdili, da lahko nanodelci TiO₂ delujejo genotoksično. Vendar ni jasno, ali lahko nanodelci TiO₂ povrzročijo poškodbe DNA tudi *in vivo*, saj smo dokazali, da prisotnost nanodelcev TiO₂ med izvedbo kometnega testa močno poveča pokodovanost DNA.

Nismo odkrili, preko kakšnega mehanizma delci poškodujejo DNA. Tako so potrebne še nadaljnje raziskave na transkriptomskem in proteomskem nivoju. Glede na pridobljene rezultate lahko predlagamo, da je potrebno več pozornosti nameniti bio-varnosti nanodelcev. Raziskava ni obrazložila stanja nanodelcev tekom reakcij s celico (aglomeracija, distribucija, metabolizem).

6 POVZETEK

Z napredkom in uspehi nanotehnologije se povečuje potreba po preučevanju varnosti in potencialnih tveganj uporabe nanodelcev, saj bomo le tako zagotovili varno proizvodnjo, uporabo in odstranjevanje nanodelcev iz obtoka. Do sedaj je bilo opravljenih že več toksikoloških raziskav nanodelcev, a kljub temu so podatki o njihovih toksičnih vplivih in mehanizmih genotoksičnosti trenutno pomanjkljivi. Med pomembnejše možne negativne učinke nanodelcev sodijo poškodbe DNA, ki jih lahko hitro in relativno enostavno ocenimo s pomočjo kometnega testa.

Kometni test, imenovan tudi elektroforeza posameznih celic (SCGE – angl. *Single Cell Gel Electrophoresis*), je hitra in občutljiva metoda, ki nam omogoča zaznavo poškodb in popravil DNA pri posameznih celicah. Ker je bila do sedaj genotoksičnost nanodelcev največkrat testirana *in vitro* na celičnih kulturah, smo v okviru diplomskega dela prilagodili kometni test za testiranja *in vivo* genotoksičnosti nanodelcev s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* in izopodi *Porcellio scaber*.

S spremljanjem dinamike rasti kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* smo ugotovili, da nanodelci TiO_2 upočasnijo rast kvasovk, z ATP-luciferaznim testom pa smo zaznali vpliv nanodelcev TiO_2 in CuO na zmanjšano vsebnost ATP v kulturi kvasovk.

Postopek kometnega testa s kvasovkmi, ki so ga razvili Miloshev in sod. (2002), smo modificirali pri postopkih priprave celic, inkubacijskega časa v raztopini za alkalno lizo, poteka elektroforeze in koncentracije EtBr za vizualizacijo kometov. Tako smo pridobili prilagojen postopek kometnega testa, s katerim smo testirali genotoksičnost nanodelcev TiO₂ in CuO. S kometnim testom na kvasovkah *S. cerevisiae* ZIM 1875 smo potrdili, da delci TiO₂ in CuO lahko povzročijo poškodbe DNA, ki so odvisne od velikosti in koncentracije delcev. Pri tem ni možno povsem izločiti, da je pozitivni rezultat testiranja posledica interakcij med delci in liziranimi celicami med izvedbo kometnega testa.

Genotoksičnost nanodelcev TiO₂ smo želeli testirati tudi s kometnim testom z izopodi *P. scaber*. Ker za ocenjevanje poškodb DNA s kometnim testom potrebujemo suspenzijo posameznih celic, smo najprej prilagodili metodo izolacije celic iz hepatopankreasa, s katero ne povzročimo dodatnih poškodb jedrne DNA. S prilagojenim postopkom kometnega testa z izopodi *P. scaber* smo testirali genotoksičnost nanodelcev TiO₂ pri različnih izpostavitvah živali. Pri živalih, ki so bile 7 dni izpostavljene nanodelcem TiO₂ (c=2000 μ g/g), smo zaznali povečanje poškodb DNA, vendar so se rezultati ocenjevanja poškodb DNA med posameznimi živalmi močno razlikovali. Pri živalih, ki so bile po izpostavitvi nanodelcem TiO₂ za 24 ur prestavljene na čisto hrano, nismo zaznali povečanja poškodb DNA v primerjavi s kontrolno skupino živali. Da bi preverili, kakšen vpliv ima prisotnost nanodelcev TiO₂ med izvedbo kometnega testa, smo izvedli kometni

test z izopodi *P. scaber*, ki smo jim neposredno pred izvedbo kometnega testa peroralno aplicirali suspenzijo nanodelcev TiO_2 , poleg tega pa smo na posamezne minigele nanašali suspenzijo nanodelcev TiO_2 . Iz dobljenih rezultatov je razvidno, da prisotnost nanodelcev TiO_2 med izvedbo kometnega testa povzroči poškodbe DNA.

Mehanizem, preko katerega lahko nanodelci poškodujejo DNA, ostaja slabo raziskan. Tako so potrebne še nadaljnje raziskave na transkriptomskem in proteomskem nivoju. Glede na pridobljene rezultate lahko predlagamo, da je potrebno več pozornosti posvetiti bio-varnosti nanodelcev.

7 VIRI

- Adams K.L., Lyon D.Y., Alvarez P.J.J. 2006. Comparative eco-toxycity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. Water Research, 40, 19: 3527-3532
- Allouni Z.E., Cimpan M.R., Høl P.J., Skodvin T., Gjerdet N.R. 2009. Agglomeration and sedimentation of TiO₂ nanoparticles in cell culture medium. Colloids and surfaces B: Biointerferences, 68, 1: 83-87
- Andreotti P.E., Cree I.A., Kurbacher C.M., Hartmann D.M., Linder D., Harel G., Gleiberman I., Caruso P.A., Ricks S.H., Untch M., Sartori C., Bruckner H.W. 1995. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: Clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcionoma. Cancer Research, 55, 22: 5276-5282
- Aruoja V., Dobourguier H.C., Kasemets K., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. The Science of the Total Environment, 407, 4: 1461-1468
- Asharani P.V., Low Kah M.G., Hande M.P., Valiyaveettil S. 2009. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. ACS Nano, 3, 2: 279–290
- Azevedo F., Marques F., Fokt H., Oliveira R., Johansson B. 2011. Measuring oxidative DNA damage and DNA repair using the yeast comet assay. Yeast, 28, 1: 55-61
- Baetz K., McHardy L., Gable K., Tarling T., Rebérioux D., Bryan J., Andersen R.J., Dunn T., Hieter P., Roberge M. 2004. Yeast genome-wide drug-induced haploinsufficiency screen to determine drug mode of action. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 13: 4525-4530
- Banasik A., Lankoff A., Piskulak A., Adamowska K., Lisowska H., Wojcik A. 2005. Aluminum-induced micronuclei and apoptosis in human peripheral-blood lymphocytes treated during different phases of the cell cycle. Environmental Toxicology, 20, 4: 402–406

Betteridge D.J. 2000. What is oxidative stress? Metabolism, 49, 2: 3-8

Beyersmann D., Hartwig A. 2008. Carcinogenic metal compounds: Recent insight into molecular and cellular mechanisms. Archives of Toxicology, 82, 8: 493–512

Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 634 str.

- Brečko D. 1992. Morfologija prebavila in akumulacija težkih kovin v prebavilu izopodov. Magistrska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 73 str.
- Buschini A., Cassoni F., Anceschi E., Pasini L., Poli P., Rossi C. 2001. Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis test on microorganisms and comet assay. Chemosphere, 44, 8: 1723-1736
- Chen F., Cushion M.T. 1994. Use of ATP Bioluminescent Assay To Evaluate Viability of *Pneumocystis carnii* from Rats. Journal of Clinical Microbiology, 32, 11: 2791-2800
- Chen M, von Mikecz A. 2005. Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. Experimental Cell Research, 305, 1: 51–62
- Collins A.R. 2004. Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. Molecular Biotechnology, 26, 3: 249-261
- Collins A.R., Dobson V.L., Dušinská M., Kennedy G., Štêtina R. 1997. The comet assay: what can it really tell us? Mutation Research, 375, 2: 183-193
- Cotelle S., Férard J.F. 1999. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. Environmental and Molecular Mutagenesis, 34, 4: 246-255
- Cree I.A., Andreotti P.E. 1997. Measurement of Cytotoxicity by ATP-based Luminescence Assay in Primary Cell Cultures and Cell Lines. Toxicology in Vitro, 11, 5: 553-556
- Dazell D.J., Christofi N. 2002. An ATP luminescence method for direct toxicity assessment of pollutants impactig on activated sewage sludge process. Water Research, 36, 6: 1493-1502
- Donaldson K., Poland C.A., Schins R.P.F. 2010. Possible genotoxic mechanisms of nanoparticles: Criteria for improved test strategies. Nanotoxicology, 4, 4: 414-420
- 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., Kralj-Iglič V. 2009. Lipid Membranes as Tools in Nanotoxicity Studies. V: Advences in Planar Lipid Bilayers and Liposomes. Leitmannova Liu A., Iglič A. (eds.). Waltham, Massachusetts, Academic Press: 121-134

- Fairbairn D.W., Olive P.L., O'Neill K.L. 1995. The comet assay: a comprehensive review. Mutation Research, 339, 1: 37-59
- Fajdiga S., Nekrep F.V., Zrimec A., Salobir J., Marinšek-Logar R. 2002. The influence of various fiber supplements on quantity of microbial biomass in digestive tract of piglets determined by ATP-luciferase assay. Zbornik Biotehniške Fakultete Univerze v Ljubljani, 80, 1: 51-59
- Geiser M., Rothen-Rutlshauser B., Kapp N., Schurch S., Kreyling W., Schulz H., Semmler M., Im H.V., Heyder J., Gehr P. 2005. Ultrafine particles cross cellular membranes by non-phagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. Environmental Health Perspectives, 113, 11: 1555-1560
- Goddard M.R., Anfang N., Tang R., Gardner R.C., Jun C. 2010. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. Environmental Microbiology, 12, 1: 63-73
- Goffeau A., Barrell B.G., Bussey H., Davis R.W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J.D., Jacq C., Johnston M., Louis E.J., Mewes H.W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S.G. 1996. Life with 6000 Genes. Science, 274, 5287: 546-567
- Gomes T., Pereira C.G., Cardoso C., Pinheiro J.P., Cancio I., Bebianno M.J. 2012. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. Aquatic Toxicology, 118-119: 72-79
- Gonzalez L., Lison D., Kirsch-Volders M. 2008. Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. Nanotoxicology, 2, 4: 252-273
- 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*. The Journal of Experimental Biology, 205, 13: 1935-1942
- Handy R.D., von der Kammer F., Lead J.R., Hassellöv M., Owen R., Crane M. 2008. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. Ecotoxicology,17, 4: 287-314
- Heidcamp W.H. Improved Neubauer hemacytometer. 1995. Gustavus Adolphus College. http://homepages.gac.edu/~cellab/chpts/chpt1/figure8.html (14. jul. 2012)

- Henderson L., Wolfreys A., Fedyk J., Bourner C., Windebank S. 1998. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. Mutagenesis, 13, 1: 89-94
- Hilt J.Z. Byrne M.E. 2004. Configurational biomimesis in drug delivery: molecular imprinting of biologically significant. Advenced Drug Delivery Reviews, 56, 11: 1599-1620
- Hopkin S.P., Hardisty G.N., Martin M.H. 1986. The woodlouse Porcellio scaber as a 'biological indicator' of zinc, cadmium, lead and copper pollution. Environmental Pollution, 11, 4: 271-290
- Horváthová E., Slamenová D., Hlincíková L., Mandal T.K., Gábelová A., Collins A.R. 1998. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. Mutation Research, 409, 3: 163-171
- Jeršek B. 2009. Higiena živil: Laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane. 2. izdaja. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
- Karlsson H.L. 2010. The comet assay in nanotoxicology research. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 398, 2: 651-666
- Kasemets K., Ivask A., Dubourguier H.C., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO2 to yeast Saccharomyces cerevisiae. Toxycology in Vitro, 23, 6: 1116-1122
- Kirk P.M., Cannon P.F., Minter D.W., Stalpers J.A. 2008. Ainsworth and Bisby's dictionary of the Fungi. 10th ed. Wallingford, CAB International: 771 str.
- Kobe M. 1979. Metode barvanja biološkega materiala. Obzornik zdravstvene nege, 13, 1-2: 75-79
- Kovochich M., Espinasse B., Auffan M., Hotze E.M., Wessel L., Xia T., Nel A.E., Wiesner M.R. 2009. Comparative toxicity of C60 aggregates toward mammalian cells: role of tetrahydrofuran (THF) decomposition. Environmental Science and Technology, 43, 16: 6378-6384
- Kroll E.S., Hyland K.M., Hieter P., Li J.J. 1996. Establishing genetic interactions by a synthetic dosage lethality phenotype. Genetics, 143, 1: 95-102

- Lah B., Gorjanc G., Nekrep F.V., Marinšek-Logar R. 2004. Comet Assay Assessment of Wastewater Genotoxicity Using Yeast Cells. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 72, 3: 607-616
- Lah B., Zinko B., Tišler T., Marinšek-Logar R. 2005. Genotoxicity Detection in Drinking Water by Ames Test, Zimmermann Test and Comet Assay. Acta Chimica Slovenica, 52, 3: 341-348
- Landsiedel R. Kapp M.D., Schulz M., Wiench K., Oesch F. 2009. Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potencial artifacts and limitations-Many questions, some answers. Mutation Research, 681, 2-3: 241-258
- Lee W.M., An Y.J., Yoon H., Kweon H.S. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. Environmental Toxicology and Chemistry, 27, 9: 1915-1921
- Li K.G., Chen J.T., Bai S.S., Wen X., Song S.Y., Yu Q., Li J., Wang Y.Q. 2009. Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots. Toxicology In Vitro, 23, 6: 1007-1013
- Li S., Zhu H., Zhu R., Sun X., Yao S., Wang S. 2008. Impact and mechanism of TiO₂ nanoparticles on DNA synthesis *in vitro*. Science in China Series B: Chemistry, 51, 4: 367-372
- Lundin A. 2000. Use of firefly luciferase in ATP-related assays of biomass, enzymes, and metabolites. Methods in Enzymology, 305: 346-370
- Lundin A., Hasenson M., Persson J., Pousette A. 1986. Estimation of biomass in growing cell lines by adenosine triphosphate assay. Methods in Enzymology, 133: 27-42
- Miloshev G., Mihaylov I., Anachkova B. 2002. Application of the single cell gel electrophoresis on yeast cells. Mutation Research, 513, 1-2: 69-74
- Monosson E. Nanoparticles. 2010. The Encyclopedia of Earth (8. feb. 2011). http://www.eoearth.org/article/Nanoparticles (17. jul. 2012)
- Moriwaki H., Osborne M.R., Phillips D.H. 2008. Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction. Toxicology in Vitro, 22, 1: 36-44

- Mršić N. 1997. Živali naših tal: uvod v pedozoologijo sistematika in ekologija s splošnim pregledom talnih živali. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 416 str.
- Nakagawa Y., Wakuri S., Sakamoto K., Tanaka N. 1997. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. Mutation Research, 394: 125-132
- Nativo P., Prior I.A., Brust M. 2008. Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles. ACS Nano, 2, 8: 1639–1644
- Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environmental Health Perspectives, 113, 7: 823-839
- Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the »comet« assay. Radiation Research, 122, 1: 86-94
- Östling O, Johanson K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 123, 1: 291-298
- Paoletti M.G., Hassall M. 1999. Woodlice (Isopoda: Oniscidea): their potential for assessing sustainability and use as bioindicators. Agriculture, Ecosystems and Environment, 74, 1-3: 157-165
- Park E.J., Yi J., Chung K.H., Ryu D.Y., Choi J., Park K. 2008. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. Toxicology Letters, 180, 3: 222-229
- Parsons A.B., Geyer R., Hughes T.R., Boone C. 2003. Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation. Progress in Cell Cycle Research, 5: 159-166
- Patterson J.W., Brezonik P.L., Putnam H.D. 1970. Measurement and significance of adenosine triphosphate in activated sludge. Environmental Science and Technology, 4, 7: 569-575
- Peycheva E., Georgieva M., Miloshev G. 2009. Comparison between alkaline and neutral variants of yeast comet assay. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 23, 1: 1090-1092

- Pfaller T., Colognato R., Nelissen I., Favilli F., Casals E., Ooms D., Leppens H., Ponti J., Stritzinger R., Puntes V., Boraschi D., Duschl A., Oostingh G.J. 2010. The suitability of different cellular in vitro immunotoxicity and genotoxicity methods for the analysis of nanoparticle-induced events. Nanotoxicology, 4, 1: 52-72
- Ploger R., Zhang J., Bassett D., Reeves R., Hieter P., Boguski M., Spencer F. 2000. XREFdb: cross-referencing the genetics and genes of mammals and model organisms. Nucleic Acids Research, 28, 1: 120-122
- Prossi F., Dallinger R. 1988. Heavy metals in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latreille. I. Histocemical and ultrastructural charasterisation of metal - containing lysosomes. Cell Biology and Toxicology, 4, 1: 81-96
- Raspor P. 1996. Kvasovke. V: Biotehnologija. Osnovna znanja. Raspor P. (ur.). Ljubljana, Bia: 70-93
- Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N.J.F., Jha A.N. 2008. Hydroxyl radicals (•OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. Mutation Research, 640, 1-2: 113-122
- Remškar M. 2009. Nanodelci in nanovarnost. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje in Urad Republike Slovenije za kemikalije: 103 str.
- Rengasamy S., King W.P., Eimer B.C., Shaffer R.E. 2008. Filtration Performance of NIOSH-Approved N95 and P100 Filtering Facepiece Respirators Against 4 to 30 Nanometer-Size Nanoparticles. Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 5, 9: 556-564
- Ruppert E.E., Barnes R.D. 1994. Invertebrate zoology. 6th ed. South Melbourne, Brooks/Cole, Thomson Learning: 1056 str.
- Sedar A.W., Forte J.G. 1964. Effects of calcium depletion on the junctional complex between oxyntic cells of gastric glands. The Journal of Cell Biology, 22, 1: 173-188
- Selan L., Berlutti F., Passariello C., Thaller M.C., Renzini G. 1992. Reliability of a bioluminescence ATP assay for detection of bacteria. Journal of Clinical Microbiology, 30, 7: 1739-1742
- Sherman F. 2002. Getting started with yeast. Methods in Enzymology, 350: 3-41

- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple tehnique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, 175, 1: 184-191
- Speit G., Hartmann A. 1999. The Comet Assay (Single-Cell Gel Test). Methods in Molecular Biology, 113, 2: 203-212
- Stanley P.E. 1986. Extraction of adenosine triphosphate from microbal and somatic cells. Methods in Enzymology, 133: 14-22
- Steward F.G. 2001. Fingerprinting viral assemblages by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Methods in Microbiology, 30: 85-103
- Štagoj M.N., Podobnik M. 2006. Kvasovke tovarne rekombinantnih proteinov. Farmacevtski vestnik, 57, 4: 235-240
- Štrus J., Drobne D., Lièar P. 1995. Comparative anatomy and functional aspects of the digestive system in amphibious and terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea). V: Terrestrial isopod biology. Alikhan M.A. (ed.). Rotterdam, CRC Press: 15-23
- Terry L.J., Shows E.B., Wente S.R. 2007. Crossing the nuclear envelope: Hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. Science, 318, 5855: 1412-1416
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35, 3: 206-221
- Tkachenko A.G. Xie H., Coleman D., Glomm W., Ryan J., Anderson M.F., Franzen S., Feldheim D.L. 2003. Multifunctional gold nanoparticle-peptide complexes for nuclear targeting. Journal of the American Chemical Society, 125, 16: 4700-4701
- Trouiller B., Reliene R., Westbrook A., Solaimani P., Schiestl R.H. 2009. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability *In vivo* in Mice. Cancer Research, 69, 22: 8784-8789
- Vandghanooni S., Eskandani M. 2011. Comet Assay: A Method to Evaluate Genotoxicity of Nano-Drug Delivery System. BioImpacts, 1, 2: 87-97

- Vippola M., Falck G.C., Lindberg H.K., Suhonen S., Vanhala E., Norppa H., Savolainen K., Tossavainen A., Tuomi T. 2009. Preparation of nanoparticle dispersions for *invitro* toxicity testing. Human & Experimental Toxicology, 28, 6-7: 377-385
- Walther P. 2008. High-Resolution Cryoscanning Electron Microscopy of Biological Samples. V: Biological Low-Voltage Scanning Electron Microscopy. Schatten H., Pawley J. (eds.). New York, Springer: 245-262
- Wang F., Gao F., Lan M., Yuan H., Huang Y., Liu J. 2009. Oxidative stress contributes to silica nanoparticle-induced cytotoxicity in human embryonic kidney cells. Toxicology *In Vitro*, 23, 5: 808-815
- Wise J.P. Sr., Goodale B.C., Wise S.S., Craig G.A., Pongan A.F., Walter R.B., Thompson W.D., Ng A.K., Aboueissa A.M., Mitani H., Spalding M.J., Mason M.D. 2010. Silver nanospheres are cytotoxic and genotoxic to fish cells. Aquatic Toxicology, 97, 1: 34-41
- Wnag J.J., Sanderson B.J.S., Wang H. 2007. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. Mutation Research, 628, 2: 99-106
- Xu A., Chai Y., Nohmi T., Hei T.K. 2009. Genotoxic responses to titanium dioxide nanoparticles and fullerene in *gpt* delta transgenic MEF cells. Particle and Fibre Toxicology, 6: 3
- Yang H., Liu C., Yang D., Zhanga H., Xi Z. 2009. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. Journal of Applied Toxicology, 29, 1: 69-78
- Zhu R.R., Wang S.L., Zhang R., Sun X.Y., Yao S.D. 2007. A novel toxicological evaluation of TiO₂ nanoparticles on DNA structure. Chinese Journal of Chemistry, 25, 7: 958-961
- Zimmer M. 2002. Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): an evolutionary ecological approach. Biology Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 77, 4: 455-493

ZAHVALA

Zahvaljujem se svoji mentorici prof. dr. Romani Marinšek Logar za strokovno pomoč in nasvete pri laboratorijskem delu in pri pisanju diplomske naloge.

Iskrena hvala mladi raziskovalki Katarini Rajapakse za vodenje in pomoč pri delu v laboratoriju ter za vse praktične nasvete.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Damjani Drobne za strokovni pregled naloge.

Tamari Milivojević se zahvaljujem za pomoč pri delu z izopodi Porcellio scaber.

Hvala tudi Tini Dobeljšek za pomoč v laboratoriju.

Celotnemu osebju Katedre za mikrobiologijo in mikrobno biotehnologijo se zahvaljujem za pomoč in nasvete pri delu v laboratoriju ter za prijetno vzdušje.

Hvala tudi celotni ekipi raziskovalne skupine Bionanoteam, za pomoč in nasvete pri delu z izpodnimi raki *Porcellio scaber*.

Zahvaljujem se prof. dr. Darku Makovcu in Petru Dušaku za slikanje suspenzij TiO_2 in CuO s presevnim elektronskim mikroskopom.

Najlepša hvala tudi staršem za podporo in spodbudo v času študija. Očetu se zahvaljujem za pomoč pri oblikovanju diplomske naloge. Hvala mami za lektoriranje diplomskega dela.

Hvala vsem!

PRILOGE

Priloga A

Čas kultivacije	Meritev 1	Meritev 2		
(ure)	(OD654)	(OD654)	Povprečje meritev (OD654)	Standardni odklon
0	0,026	0,034	0,03	0,00566
1	0,036	0,048	0,042	0,00849
2	0,05	0,059	0,0545	0,00636
3	0,083	0,098	0,0905	0,01061
4	0,15	0,13	0,14	0,01414
5	0,254	0,221	0,2375	0,02333
6	0,435	0,48	0,4575	0,03182
7	0,654	0,678	0,666	0,01697
8	0,84	0,876	0,858	0,02546
9	1,077	1,112	1,0945	0,02475
10	1,21	1,253	1,2315	0,03041
11	1,222	1,274	1,248	0,03677
11,67	1,227	1,289	1,258	0,04384
24	1,32	1,348	1,334	0,01980

Podatki za rastno krivuljo Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875, prikazano na sliki 12:

Podatki za rastno krivuljo Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875, prikazano na sliki 13:

	Koncentracija	Koncentracija		
Čas	celic [št.	celic [št.		
kultivacije	celic/mL] -	celic/mL] -		
(ure)	meritev 1	meritev 2	Povprečje meritev [št. celic/mL]	Standardni odklon
0	3,88×10 ⁶	3,99×10 ⁶	3935000	77782
1	3,96×10 ⁶	4,17×10 ⁶	4067222	145350
2	7,15×10 ⁶	7,11×10 ⁶	7128333	25927
3	9,44×10 ⁶	9,85×10 ⁶	9645000	289914
4	1,49×10 ⁷	1,83×10 ⁷	16603333	2399449
5	2,36×10 ⁷	3,13×10 ⁷	27436667	5463578
6	4,82×10 ⁷	5,62×10 ⁷	52200000	5656854
7	8,87×10 ⁷	8,21×10 ⁷	85392857	4656803
8	1,13×10 ⁸	1,27×10 ⁸	120166667	9663793
9	1,71×10 ⁸	1,91×10 ⁸	180833333	14377838
10	1,92×10 ⁸	2,05×10 ⁸	198500000	9192388
11	1,97×10 ⁸	$2,10 \times 10^{8}$	203400000	9333810
24	2,24×10 ⁸	2,35×10 ⁸	229500000	7778175

Priloga B

Koncentracij	e celic	Saccharom	vces cerev	isiae ZP	M 1875 a	ob času 2	uri n	o začetku l	cultivac	iie
Roncentracij	c conc	Succruitoni	yees cerev	isiuc Ln		00 cusu 2	սութ	o Zacetku i	sunnvac	aje –

	1. ponovitev [št.	2. ponovitev [št.	Povprečje [št.	Standardni
IZPOSTAVITEV	celic/mL] celic/mL]		celic/mL]	odklon
Negativna kontrola = brez				
tretiranja	6,31E+06	6,54E+06	6,43E+06	1,63E+05
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂				
0,1µg/mL	5,51E+06	5,80E+06	5,65E+06	2,05E+05
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂ 10				
μg/mL	6,15E+06	5,78E+06	5,97E+06	2,61E+05
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂				
100 μg/mL	5,53E+06	5,41E+06	5,47E+06	7,97E+04

Koncentracije celic Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 ob času 4 ure po začetku kultivacije

	1. ponovitev [št.	2. ponovitev [št.	Povprečje [št.	Standardni
IZPOSTAVITEV	celic/mL]	elic/mL] celic/mL]		odklon
Negativna kontrola = brez				
tretiranja	1,45E+07	1,48E+07	1,47E+07	2,12E+05
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂				
0,1µg/mL	1,31E+07	1,33E+07	1,32E+07	1,59E+05
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂ 10				
µg/mL	1,07E+07	1,27E+07	1,17E+07	1,46E+06
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂				
100 µg/mL	1,22E+07	1,37E+07	1,29E+07	1,08E+06

Koncentracije celic Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 ob času 6 ur po začetku kultivacije

	1. ponovitev [št.	2. ponovitev [št.	Povprečje [št.	Standardni
IZPOSTAVITEV	celic/mL]	celic/mL]	celic/mL]	odklon
Negativna kontrola = brez				
tretiranja	4,21E+07	4,58E+07	4,40E+07	2,62E+06
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂				
0,1µg/mL	3,52E+07	3,64E+07	3,58E+07	8,61E+05
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂ 10				
μg/mL	3,32E+07	3,23E+07	3,27E+07	5,74E+05
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂				
100 µg/mL	3,47E+07	3,62E+07	3,54E+07	1,08E+06

Koncentracije celic Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875 ob času 24 ur po začetku kultivacije

	1. ponovitev [št.	2. ponovitev [št.	Povprečje [št.	Standardni
IZPOSTAVITEV	celic/mL]	celic/mL]	celic/mL]	odklon
Negativna kontrola = brez				
tretiranja	2,29E+08	2,18E+08	2,24E+08	7,78E+06
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂				
0,1µg/mL	2,00E+08	1,76E+08	1,88E+08	1,70E+07
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂ 10				
μg/mL	1,46E+08	1,69E+08	1,57E+08	1,63E+07
Izpostavitev nanodelcem TiO ₂				
100 μg/mL	1,97E+08	1,92E+08	1,95E+08	3,77E+06

Priloga C

Dunnov test primerjave	Statistično značilna razlika	Povzetek
Nagativna kontrola 1 vs Nagativna kontrola 2	Ne	ns
Nagativna kontrola 1 vs Nagativna kontrola 3	Ne	ns
Nagativna kontrola 1 vs Nagativna kontrola 4	Ne	ns
Nagativna kontrola 1 vs Nagativna kontrola 5	Ne	ns
Nagativna kontrola 1 vs Nagativna kontrola 6	Ne	ns
Nagativna kontrola 1 vs Nagativna kontrola 7	Ne	ns
Nagativna kontrola 1 vs Nagativna kontrola 8	Ne	ns
Nagativna kontrola 2 vs Nagativna kontrola 3	Ne	ns
Nagativna kontrola 2 vs Nagativna kontrola 4	Ne	ns
Nagativna kontrola 2 vs Nagativna kontrola 5	Ne	ns
Nagativna kontrola 2 vs Nagativna kontrola 6	Ne	ns
Nagativna kontrola 2 vs Nagativna kontrola 7	Ne	ns
Nagativna kontrola 2 vs Nagativna kontrola 8	Ne	ns
Nagativna kontrola 3 vs Nagativna kontrola 4	Ne	ns
Nagativna kontrola 3 vs Nagativna kontrola 5	Ne	ns
Nagativna kontrola 3 vs Nagativna kontrola 6	Ne	ns
Nagativna kontrola 3 vs Nagativna kontrola 7	Ne	ns
Nagativna kontrola 3 vs Nagativna kontrola 8	Ne	ns
Nagativna kontrola 4 vs Nagativna kontrola 5	Ne	ns
Nagativna kontrola 4 vs Nagativna kontrola 6	Ne	ns
Nagativna kontrola 4 vs Nagativna kontrola 7	Ne	ns
Nagativna kontrola 4 vs Nagativna kontrola 8	Ne	ns
Nagativna kontrola 5 vs Nagativna kontrola 6	Ne	ns
Nagativna kontrola 5 vs Nagativna kontrola 7	Ne	ns
Nagativna kontrola 5 vs Nagativna kontrola 8	Ne	ns
Nagativna kontrola 6 vs Nagativna kontrola 7	Ne	ns
Nagativna kontrola 6 vs Nagativna kontrola 8	Ne	ns
Nagativna kontrola 7 vs Nagativna kontrola 8	Ne	ns

Statistična analiza rezultatov kometnega testa s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Legenda:

ns – statistično neznačilna razlika (P>0,05)

Dunnov tost primoriovo	Statistično značilna rozliko	Povzotok
Pozitivna kontrola 1 vs Pozitivna kontrola 2	No	ns
Pozitivna kontrola 1 vs Pozitivna kontrola 2	Ne	ns
Pozitivna kontrola 1 vs Pozitivna kontrola 3	Ne	
Pozitivna kontrola 1 vs Pozitivna kontrola 4	Ne	ns
Pozitivna kontrola 1 vs Pozitivna kontrola 5	Ne	ns
Pozitivna kontrola I vs Pozitivna kontrola 6	Ne	ns
Pozitivna kontrola 1 vs Pozitivna kontrola 7	Ne	ns
Pozitivna kontrola 1 vs Pozitivna kontrola 8	Ne	ns
Pozitivna kontrola 2 vs Pozitivna kontrola 3	Ne	ns
Pozitivna kontrola 2 vs Pozitivna kontrola 4	Ne	ns
Pozitivna kontrola 2 vs Pozitivna kontrola 5	Ne	ns
Pozitivna kontrola 2 vs Pozitivna kontrola 6	Ne	ns
Pozitivna kontrola 2 vs Pozitivna kontrola 7	Ne	ns
Pozitivna kontrola 2 vs Pozitivna kontrola 8	Ne	ns
Pozitivna kontrola 3 vs Pozitivna kontrola 4	Ne	ns
Pozitivna kontrola 3 vs Pozitivna kontrola 5	Ne	ns
Pozitivna kontrola 3 vs Pozitivna kontrola 6	Ne	ns
Pozitivna kontrola 3 vs Pozitivna kontrola 7	Ne	ns
Pozitivna kontrola 3 vs Pozitivna kontrola 8	Ne	ns
Pozitivna kontrola 4 vs Pozitivna kontrola 5	Ne	ns
Pozitivna kontrola 4 vs Pozitivna kontrola 6	Ne	ns
Pozitivna kontrola 4 vs Pozitivna kontrola 7	Ne	ns
Pozitivna kontrola 4 vs Pozitivna kontrola 8	Ne	ns
Pozitivna kontrola 5 vs Pozitivna kontrola 6	Ne	ns
Pozitivna kontrola 5 vs Pozitivna kontrola 7	Ne	ns
Pozitivna kontrola 5 vs Pozitivna kontrola 8	Ne	ns
Pozitivna kontrola 6 vs Pozitivna kontrola 7	Ne	ns
Pozitivna kontrola 6 vs Pozitivna kontrola 8	Ne	ns
Pozitivna kontrola 7 vs Pozitivna kontrola 8	Ne	ns

Statistična analiza rezultatov kometnega testa s kvasovkami Saccharomyces cerevisiae ZIM 1875

Legenda:

ns – statistično neznačilna razlika (P>0,05)

Priloga D

Vsebnost ATP v kulturi kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* ZIM 1875 po 16 urni izpostavitvi nanodelcem TiO2 in CuO.

		Koncentracija	Koncentracija		
	Koncentracija ATP	ATP [mol/L]	ATP [mol/L]		Standardni
	[mol/L] (1. meritev)	(2. meritev)	(3. meritev)	Povprečje	odklon
Kontrola (brez tretiranja)	1,60E-09	1,52E-09	1,71E-09	1,61E-09	9,64E-11
Nano 0,1 µg/mL	8,87E-10	8,11E-10	9,35E-10	8,78E-10	6,28E-11
Bulk 0,1 µg/mL	1,08E-09	9,47E-10	9,73E-10	1,00E-09	7,29E-11
Nano 10 µg/mL	8,11E-10	7,78E-10	7,04E-10	7,65E-10	5,48E-11
Bulk 10 µg/mL	9,69E-10	9,05E-10	1,01E-09	9,61E-10	5,22E-11
Nano 100 µg/mL	5,54E-10	4,26E-10	6,38E-10	5,39E-10	1,07E-10
Bulk 100 μg/mL	9,56E-10	8,46E-10	8,77E-10	8,93E-10	5,63E-11

Podatki za CuO:

	Koncentracija	Koncentracija Koncentracija Koncentracija			
	ATP [mol/L]	ATP [mol/L]	ATP [mol/L]		Standardni
	(1. meritev)	(2. meritev)	(3. meritev)	Povprečje	odklon
Kontrola (brez tretiranja)	1,74E-09	1,74E-09	1,64E-09	1,71E-09	5,52E-11
Nano 0,005 μg/mL	7,34E-10	9,59E-10	9,36E-10	8,76E-10	1,24E-10
Bulk 0,005 µg/mL	1,00E-09	1,05E-09	1,08E-09	1,05E-09	3,94E-11
Nano 0,5 µg/mL	6,02E-10	6,31E-10	5,57E-10	5,97E-10	3,74E-11
Bulk 0,5 µg/mL	8,80E-10	9,98E-10	9,66E-10	9,48E-10	6,11E-11
Nano 50 μg/mL	7,36E-10	6,84E-10	7,53E-10	7,25E-10	3,63E-11
Bulk 50 µg/mL	9,83E-10	8,67E-10	8,58E-10	9,03E-10	7,00E-11

Priloga E

	Viabilnost		Viabilnost		
	celic (1.	Viabilnost	celic (3.		
	biološka	celic (2.	biološka	Povprečna	
	ponovitev)	biološka	ponovitev)	vrednost	Standardni
	[%]	ponovitev) [%]	[%]	[%]	odklon
Negativna kontrola	100	98,15	98,08	98,74	1,090
CuO Nano 0,005 µg/mL	94,00	96,61	98,00	96,20	2,031
CuO Nano 0,5 µg/mL	98,00	98,21	96,08	97,43	1,176
CuO Nano 50 µg/mL	93,65	96,08	96,36	95,36	1,491
CuO Bulk 0,005 µg/mL	96,00	98,11	98,00	97,37	1,189
CuO Bulk 0,5 µg/mL	96,08	96,15	98,04	96,76	1,111
CuO Bulk 50 µg/mL	94,83	94,44	96,08	95,12	0,855
TiO ₂ Nano 0,1 μg/mL	94,20	96,00	94,20	94,80	1,038
TiO ₂ Nano 10 µg/mL	95,59	94,00	96,00	95,20	1,056
TiO ₂ Nano 100 µg/mL	94,23	93,33	95,00	94,19	0,834
TiO ₂ Bulk 0,1 μg/mL	94,12	96,36	96,00	95,49	1,206
TiO ₂ Bulk 10 µg/mL	92,00	96,00	96,43	94,81	2,443
TiO ₂ Bulk 100 µg/mL	94,12	98,21	94,23	95,52	2,333

Podatki o viabilnosti kvasov
k $Saccharomyces\ cerevisiae\ po\ 16-urni\ izpostavitvi\ TiO_2\ in\ CuO,\ določeni\ z\ barvanjem\ celic\ s\ tripanskim\ modrilom$





Porazdelitev vrednosti OTM pri negativni kontroli, ki smo jo opravili ob merjenju vpliva nanodelcev TiO_2 na poškodbe DNA. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Oznaka Neg.X.Y pomeni: negativna kontrola pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri pozitivni kontroli, ki smo jo opravili ob merjenju vpliva nanodelcev TiO₂ na poškodbe DNA. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Oznaka Poz.X.Y pomeni: pozitivna kontrola pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk makrodelcem TiO₂ pri koncentraciji 0,1 µg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Oznaka B.0.1.X.Y pomeni tretiranje z makrodelci pri koncentraciji 0,1 µg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk makrodelcem TiO₂ pri koncentraciji 10 µg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Oznaka B.10.X.Y pomeni tretiranje z makrodelci pri koncentraciji 10 µg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk makrodelcem TiO₂ pri koncentraciji 100 µg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Oznaka Bulk.100.X.Y pomeni tretiranje z makrodelci pri koncentraciji 100 µg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk nanodelcem TiO₂ pri koncentraciji 0,1 µg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Oznaka N.0.1.X.Y pomeni tretiranje z nanodelci pri koncentraciji 0,1 µg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk nanodelcem TiO_2 pri koncentraciji 10 µg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Oznaka N.10.X.Y pomeni tretiranje z nanodelci pri koncentraciji 10 µg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in

Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk nanodelcem TiO₂ pri koncentraciji 100 μg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Oznaka N.100.X.Y pomeni tretiranje z nanodelci pri koncentraciji 100 μg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.




Porazdelitev vrednosti OTM pri negativni kontroli, ki smo jo opravili ob merjenju vpliva nanodelcev CuO na poškodbe DNA. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Oznaka Neg.X.Y pomeni: negativna kontrola pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri pozitivni kontroli, ki smo jo opravili ob merjenju vpliva nanodelcev CuO na poškodbe DNA. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Oznaka Poz.X.Y pomeni: pozitivna kontrola pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk makrodelcem CuO pri koncentraciji 0,005 µg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Oznaka B.0.005.X.Y pomeni tretiranje z makrodelci pri koncentraciji 0,005 µg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk makrodelcem CuO pri koncentraciji 0,5 µg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Oznaka B.0.5.X.Y pomeni tretiranje z makrodelci pri koncentraciji 0,5 µg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk makrodelcem CuO pri koncentraciji 50 µg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Oznaka B.50.X.Y pomeni tretiranje z makrodelci pri koncentraciji 50 µg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk nanodelcem CuO pri koncentraciji 0,005 µg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Oznaka N.0.005.X.Y pomeni tretiranje z nanodelci pri koncentraciji 0,005 µg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk nanodelcem CuO pri koncentraciji 0,5 µg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Oznaka N.0.5.X.Y pomeni tretiranje z nanodelci pri koncentraciji 0,5 µg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.



Porazdelitev vrednosti OTM pri izpostavitvi kvasovk nanodelcem CuO pri koncentraciji 50 µg/mL. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Oznaka N.50.X.Y pomeni tretiranje z nanodelci pri koncentraciji 50 µg/mL pri X-ti biološki ponovitvi in Y-ti tehnični ponovitvi.

Priloga H



Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri nanosu 5 mM raztopine H_2O_2 na minigel. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Ker smo celice hepatopankreasa posamezne živali nanesli na dva minigela, smo pri posamezni živali ocenili 120 kometov.



Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri nanosu 10 mM raztopine H₂O₂ na minigel. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Ker smo celice hepatopankreasa posamezne živali nanesli na dva minigela, smo pri posamezni živali ocenili 120 kometov.



Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri nanosu 20 mM raztopine H₂O₂ na minigel. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Ker smo celice hepatopankreasa posamezne živali nanesli na dva minigela, smo pri posamezni živali ocenili 120 kometov.





Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri kontrolni skupini živali. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Ker smo celice hepatopankreasa posamezne živali nanesli na dva minigela, smo pri posamezni živali ocenili 120 kometov.



Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri skupini živali, ki je bila 7 dni izpostavljena nanodelcem TiO₂. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Ker smo celice hepatopankreasa posamezne živali nanesli na dva minigela, smo pri posamezni živali ocenili 120 kometov.



Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri skupini živali, ki je bila po 7-dnevni izpostavitvi nanodelcem TiO₂ za 24 ur prestavljena na čisto hrano. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Ker smo celice hepatopankreasa posamezne živali nanesli na dva minigela, smo pri posamezni živali ocenili 120 kometov.





Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri živalih, ki smo jim peroralno aplicirali suspenzijo nanodelcev TiO₂. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Ker smo celice hepatopankreasa posamezne živali nanesli na dva minigela, smo pri posamezni živali ocenili 120 kometov.



Porazdelitev vrednosti Tail DNA [%] pri nanosu suspenzije nanodelcev TiO_2 na minigel. Posamezen okvir z ročaji prikazuje porazdelitev rezultatov ocenjevanja 60 kometov (enega minigela). Z krogci so označeni osamelci. Ker smo celice hepatopankreasa posamezne živali nanesli na dva minigela, smo pri posamezni živali ocenili 120 kometov.