

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Aleš ŠPES

VPLIV NANODELCEV TITANOVEGA DIOKSIDA NA MITOHONDRIJE

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

EFFECT OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ON MITOCHONDRIA

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Toma Turka, za somentorja doc. dr. Roka Kostanjška in za recenzentko prof. dr. Damjano Drobne.

Mentor: prof. dr. Tom Turk

Somentor: doc. dr. Rok Kostanjšek

Recenzentka: prof. dr. Damjana Drobne

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana Marinšek Logar
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Tom Turk
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: doc. dr. Rok Kostanjšek
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Aleš Špes

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 576.311.347:620.3:549.514.6:595.373(043)=163.3
KG rak enakonožec / *Porcellio scaber* / mitohondriji / mitohondrijske membrane / nanodelci / titanov dioksid / TiO₂ / rodamin 123 / mitohondrijski membranski potencial
AV ŠPES, Aleš
SA TURK, Tom (mentor) / KOSTANJŠEK, Rok (sometor) / DROBNE, Damjana (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2009
IN VPLIV NANODELCEV TITANOVEGA DIOKSIDA NA MITOHONDRIJE
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP VIII, 41 str., 16 sl., 54 vir.
IJ sl
JI sl / en
AI V nalogi smo preučevali vpliv kratkotrajne izpostavljenosti nanodelcem iz TiO₂ na stabilnost mitohondrijske membrane kopenskih rakov enakonožcev *Porcellio scaber*. Nanodelci lahko tvorijo reaktivne kisikove zvrsti in povzročijo spremembe v lipidni membrani, kar vodi v poškodbe mitohondrijev. Nanodelce iz TiO₂ velikosti 15 nm smo nanесли na liste, s katerimi so se živali prehranjevale. Koncentracija nanodelcev je bila 1000 µg/g suhe teže lista, učinek pa smo ugotavljali po 3., 7. in 10. dnevu. V ta namen smo prilagodili metodo, ki temelji na avtomatskem zaznavanju oddane svetlobe barvila (svetlosti slike). Barvilo rodamin 123 je fluorescentno barvilo, ki se selektivno veže na mitohondrijsko membrano, količina vezanega barvila pa je odvisna od membranskega potenciala. Tako je količina oddane svetlobe odvisna od stanja mitohondrijske membrane. Posebnost našega dela je, da smo ugotavljali učinek na mitohondrije v celotnem organu – prebavni žlezi (hepatopankreas). Ugotovili smo, da sonificirani nanodelci iz TiO₂ ne vplivajo na mitohondrijski membranski potencial, medtem ko nesonificirani nanodelci statistično značilno vplivajo na vezavo rodamina 123 na mitohondrije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 576.311.347:620.3:549.514.6:595.373(043)=163.3
CX isopods /*Porcellio scaber*/ mitochondria / mitochondrial membranes / nanoparticles / titanium dioxide / TiO₂ / Rhodamine 123 / mitochondrial membrane potential
AU ŠPES, Aleš
AA TURK, Tom (supervisor) / KOSTANJŠEK, Rok (co- advisor) / DROBNE, Damjana (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2009
TI EFFECT OF TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLES ON MITOCHONDRIA
DT Graduation Thesis (University studies)
NO VIII, 41 p., 16 fig., 54 ref.
LA sl
AL sl / en
AB In this work we investigated the effect of the short-term exposure of TiO₂ nanoparticles on the stability of mitochondrial membrane of the isopod *Porcellio scaber*. Nanoparticles can cause formation of reactive oxygen species and changes in lipid membrane which leads to mitochondrial damage. Animals were exposed to 15 nm nanoparticles through their food. Animals were exposed to 1000 µg nanoparticle/g dry weight of food. Their effect on stability of mitochondrial membranes was assessed after 3, 7 and 10 days. For this purpose we established new method, which is based on automatic detection of brightness by digital camera. Rhodamine 123 is a fluorescent dye that binds selectively to mitochondria with stable mitochondrial potential (intact membranes). Our work was performed on the whole organ, not only on the cells in cell lines. In this regard it differs from most of other studies on nanoparticles toxicity. We found out that sonicated TiO₂ nanoparticles have no effect on binding of rhodamine on mitochondrial membrane, whereas the effect of non-sonicated nanoparticles on mitochondrial potential is statistically significant.

KAZALO VSEBINE

	str.
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	2
2.1 POSKUSNA ŽIVAL – <i>Porcellio scaber</i>	2
2.1.1 Zgradba in delovanje prebavil raka enakonožca <i>Porcellio scaber</i>	3
2.1.2 Zgradba in funkcija hepatopankreasa raka enakonožca <i>Porcellio scaber</i>	3
2.2 MITOHONDRIJI	4
2.2.1 Rodamin 123	5
2.2.2 Baker	7
2.3 NANODELCI	8
2.3.1 Posledice delovanja nanodelcev v celici	9
2.3.2 Nanodelci TiO₂	11
2.3.3 Ultrazvočna obdelava nanodelcev	12
3 MATERIAL IN METODE	13
3.1 KEMIKALIJE in RAZTOPINE	13
3.2 STEKLOVINA IN POTROŠNI MATERIAL	13
3.3 PRIPRAVA POSKUSNE ŽIVALI <i>Porcellio scaber</i> (ISOPODA, CRUSTACEA)	14
3.4 PRIPRAVA LISTOV ZA PREHRANJEVALNI POSKUS	14
3.5 IZOLACIJA HEPATOPANKREASA:	15
3.6 POTEK POSKUSA	15
3.6.1 Prilagoditev metode – barvanje hepatopankreasa z rodaminom 123	15
3.6.2 Validacija metode s pozitivno kontrolo	15
3.6.3 Uporaba metode za določanje vpliva nanodelcev na stabilnost mitohondrijev	16
3.7 MIKROSKOPIJA	16
3.8 STATISTIČNE METODE	17
4 REZULTATI	18
4.1 POSTOPEK ZA OPAZOVANJE ŽLEZ	18
4.2 VALIDACIJA METODE S POZITIVNO KONTROLO	20
4.3 UPORABA METODE ZA DOLOČANJE VPLIVA NANODELCEV NA STABILNOST MITOHONDRIJEV	23

5	RAZPRAVA IN SKLEPI	28
5.1	Razprava	28
5.2	Sklepi	33
6	POVZETEK.....	34
7	VIRI.....	35

ZAHVALA

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: <i>Porcellio scaber</i> (Glase in sod., 1992)	2
Slika 2: Struktura rodamina 123 (P-Glycoprotein/Related products)	6
Slika 3: Obarvanje hepatopankreasa po inkubaciji v fiziološki raztopini - kontrola	18
Slika 4: Obarvanje hepatopankreasa po 300 minutni inkubaciji v raztopini bakra.....	18
Slika 5 : Obarvanje hepatopankreasa po inkubaciji v fiziološki raztopini – kontrola	19
Slika 6: Obarvanje hepatopankreasa po 300 minutni inkubaciji v raztopini bakra.....	19
Slika 7: Odvisnost časa osvetlitve žleze od časa inkubacije v raztopini bakra (6,3 mg/ml) pri 25x povečavi	20
Slika 8: Odvisnost časa osvetlitve žleze od časa inkubacije v raztopini bakra (6,3 mg/ml) pri 100x povečavi	21
Slika 9: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov z bakrom (1000 µg/g suhe teže lista) pri 25x povečavi	22
Slika 10: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov z bakrom (1000 µg/g suhe teže lista) pri 100x povečavi	22
Slika 11: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov s fiziološko raztopino (kontrola) pri 25x povečavi.....	23
Slika 12: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov s fiziološko raztopino (kontrola) pri 100x povečavi.....	24
Slika 13: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov z nesonificiranimi nanodelci (TiO ₂ , 15 nm, 1000 µg/g suhe teže lista) pri 25x povečavi.....	25
Slika 14: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov z nesonificiranimi nanodelci (TiO ₂ , 15 nm, 1000 µg/g suhe teže lista) pri 100x povečavi.....	25
Slika 15: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov s sonificiranimi nanodelci (TiO ₂ , 15 nm, 1000 µg/g suhe teže lista) pri 25x povečavi.....	26
Slika 16: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov s sonificiranimi nanodelci (TiO ₂ , 15 nm, 1000 µg/g suhe teže lista) pri 100x povečavi.....	27

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP – adenzin trifosfat

DNA – dezoksiribonukleinska kislina

ELISA – encimsko-immunski test

H⁺ – vodikov ion (proton)

HAP – hidroksiapatit

IL-8 – interlevkin 8

MTS – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2- (4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium salt

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide

NADH – nikotinamid adenin dinukleotid

OH⁻ – hidroksilni anion

pH – negativni logaritem koncentracije vodikovih protonov

ROS – reaktivne kisikove zvrsti

TiO₂ – titanov dioksid

tRNA – prenašalna RNA

$\Delta\Psi$ – mitohondrjski membranski potencial

1 UVOD

V današnjem času prihaja do povečane proizvodnje nanodelcev, saj se jih zaradi njihovih fizikalnih in kemijskih lastnosti uporablja za razvoj in uporabo novih materialov predvsem v kemijski industriji, gradbeništvu, medicini, tekstilni ter farmacevtski industriji. V stik z njimi ne prihajamo le kadar jih namensko proizvajamo ali uporabljamo saj nanodelci nastajajo tudi kot stranski produkt pri številnih naravnih procesih (gorenje, korozija...), kopičijo se v zemlji, vodi in organizmih. V primerjavi s strupenostjo kemikalij je o njihovi strupenosti znanega zelo malo, zato nimamo jasnih smernic, kako kvantificirati njihove učinke. Njihove lastnosti se zaradi razmerja med volumnom in površino bistveno razlikujejo od lastnosti, ki jih imajo večji delci enake kemijske sestave. Zato so zmožni interakcij z biološkimi sistemi. Dober modelni organizem za raziskave vpliva kovin na živali na različnih bioloških nivojih je kopenski rak enakonožec, saj je sposoben preživeti v okolju s povišanimi koncentracijami kovin (Hopkin, 1989; Drobne, 1997).

1.1 NAMEN DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

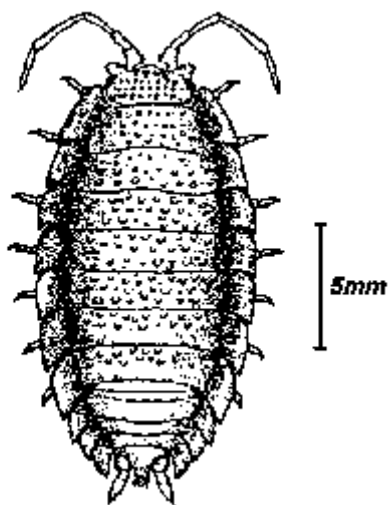
V diplomskem delu smo prilagodili metodo in ocenjevali vpliv zaužitih nanodelcev TiO_2 na stabilnost mitohondrijske membrane pri kopenskem raku enakonožcu. Živali so bile nabrane v njihovem naravnem okolju in predhodno niso bile v stiku z umetnimi nanodelci. Pričakovali smo, da nanodelci TiO_2 različnih velikosti različno vplivajo na stabilnost mitohondrijske membrane.

2 PREGLED OBJAV

2.1 POSKUSNA ŽIVAL – *Porcellio scaber*

Skupina enakonožcev (Isopoda) je drugi največji red perakaridnih rakov. Večina vrst živi v morju, poselili pa so tudi sladkovodne habitate in kopno. Kopenske vrste perakaridnih rakov najdemo v zmerno vlažnih predelih, v naravi med lubjem, pod debli in kamenjem ter tudi v človekovem okolju. Prehranjujejo se pretežno z razpadajočim rastlinskim in živalskim materialom. Za naše poskuse smo uporabili kopensko vrsto *Porcellio scaber* (Oniscidea, Isopoda, Crustacea). Navadno je sive do temno rjave barve, poznamo pa tudi svetlejša lisasta vzorce, predvsem mlade živali pa so lahko rahlo rumene. (Ruppert in Barnes, 1994; Prevorčnik, 1999; Schweitzer, 2000.)

Porcellio scaber je zaradi ustrezne velikosti, številčnosti, nezahtevnega laboratorijskega ravnanja in sposobnosti akumulacije kovin eden izmed najbolj proučevanih organizmov v kopenski ekotoksikologiji. Ti raki so uporabni za ugotavljanje vpliva kemikalij na različne nivoje biološke organizacije, od biokemijskih do populacijskih. Pomembna lastnost je, da lahko tolerirajo visoke koncentracije težkih kovin (Hopkin in sod., 1986; Drobne, 1997).



Slika 1: *Porcellio scaber* (Glase in sod., 1992)

2.1.1 Zgradba in delovanje prebavil raka enakonožca *Porcellio scaber*

Prebavilo izopodnih rakov je sestavljeno iz prebavne cevi in prebavnih žlez (hepatopankreasa).

Prebavna cev je razdeljena na krajše sprednje in daljše zadnje črevo, ki zavzema 80 – 90 % celotne dolžine prebavnega trakta (Zimmer, 2002). Sprednji del je iz kratkega požiralnika in želodca, ki je povezan s črevesom in prebavnimi žlezami. Želodec je namenjen filtriranju, mletju, transportu in encimski razgradnji hrane. Tekočine in zelo droben material prehajajo skozi primarni in sekundarni sistem v prebavne žleze.

Prebavne žleze (hepatopankreas) so sestavljene iz dveh parov cev. Izhajajo iz atrija v posteriornem delu želodca in potekajo vzporedno z zadnjim delom črevesa. Osnovna enota je slepo zaprta cevka iz enoslojnega epitelija. Cevko obkroža tanka mreža mišičnih vlaken, ki s krčenjem in raztezanjem omogočajo tok tekočine v žleze in iz njih. Primarna funkcija je sekrecija encimov, absorpcija hranil, shranjevanje lipidov ter kopičenje kovin (Hames in Hopkin, 1991; Brečko, 1992; Wägele, 1992; Štrus in sod., 1995).

2.1.2 Zgradba in funkcija hepatopankreasa raka enakonožca *Porcellio scaber*

Hepatopankreas sestavljata dva tipa celic, ki jih različni avtorji različno imenujejo:

- Velike celice (Szyfter, 1966), imenovane tudi celice B (Clifford in Witkus, 1971), celice R (resorpcijske) (Lane, 1988) ali celice α (Wägele, 1992)
- Male celice (Szyfter, 1966), imenovane tudi celice S (Clifford in Witkus, 1997), celice F (Lane, 1988) ali celice β (Wägele, 1992)

Velike celice skladiščijo lipide in glikogen, imajo vlogo sekrecije in absorpcije. Ultrastrukturne značilnosti so: prisotnost površinskega, pravilno urejenega mikrovilnega sloja, regija brez organelov pod mikrovili in enakomerna razporeditev mitohondrijev pod tem območjem. Te lastnosti, ki so kazalci absorpcijske vloge, imajo tudi male celice.

Lastnosti sekrecijskih celic, kot so obsežen zrnati endoplazemski retikel, aktivni diktiosomi (Golgijev aparat) z razširjenimi cisternami (Clifford in Witkus, 1971) ter sekrecijska telesa, pa so značilnosti celic s sekrecijsko vlogo. Ultrastrukturne lastnosti velikih celic se lahko med stradanjem, levitvijo in spremembo hrane močno spremenijo (Zimmer, 2002).

Male celice so klinaste oblike, citoplazma je manj gosta, zrnati endoplazemski retikel pa manj zvit kakor pri velikih celicah. Stres se v njih ne izraža tako močno, vsebujejo pa različne tipe intracelularnih granul, ki so mesta kopičenja kovin (Fe, Cu, Zn, Pb) in mesta ekskrecije odpadnih produktov (Prosi in Dallinger, 1988). Zaradi kopičenja velikih količin bakra imenujemo te organele tudi kuprosomi.

2.2 MITOHONDRIJI

Mitohondriji so pomemben del celice pri skoraj vseh evkariontskih celicah. Večinoma imajo obliko valja s premerom 0,5 do 1 μm . Pri premikanju skozi citoplazmo so povezani z mikrotubuli. Zaradi te povezave so pri različnih tipih celice na različnih mestih. Tako lahko mitohondriji tvorijo dolge premikajoče se verige, ali pa se nahajajo okoli mest z veliko porabo energije. Število mitohondrijev v celici se lahko zelo razlikuje. Tako poznamo celice z enim samim mitohondrijem ter celice z nekaj tisoč mitohondriji.

Mitohondrij obdajata dve membrani, ki imata pomembno vlogo v njegovi funkciji. Vsak od lipidnih dvoslojev ima specifične proteine, membrani pa tvorita dva mitohondrijska predela: notranji matriks in ozek medmembranski prostor.

Zunanja membrana vsebuje velike proteine, ki tvorijo kanale v membrani. Zaradi teh kanalov je prepustna za molekule velike do 10.000 Daltonov.

V medmembranskem prostoru so encimi, ki uporabijo ATP iz matriksa za fosforilacijo drugih nukleotidov.

Notranja membrana je nagubana v kriste in ima zaradi tega večjo površino. Vsebuje tri glavne skupine proteinov: (1) proteini, ki so vpleteni pri oksidacijskih reakcijah dihalne verige, (2) encimski kompleks ATP sintetaza tvori ATP v matriksu in (3) specifični transportni proteini, ki regulirajo prehod metabolitov v in iz matriksa. Ker se elektrokemijski potencial, ki poganja ATP sintezo, vzpostavi po celotni notranji membrani, je pomembno, da je ta membrana kar se da neprehodna za večino majhnih ionov.

V matriksu je velika koncentracija mešanice stotine različnih encimov. Tu je tudi nekaj identičnih kopij mitohondrijskega genoma, posebnih mitohondrijskih ribosomov, tRNA ter encimov potrebnih za izražanje mitohondrijskih genov.

Elektroni, ki izvirajo iz NADH, preko kaskade encimskih kompleksov prehajajo na kisik. Pri tem se večina sproščene energije v dihalni verigi uporabi za prenos protonov (H^+) iz matriksa v medmembranski prostor. Ta premik ima dve posledici:

- Ustvari pH-gradient preko notranje mitohondrijske membrane z znatno nižjo koncentracijo H^+ ionov v matriksu kakor v drugih predelih celice, kjer je pH okoli 7.
- Ustvari napetostni gradient (membranski potencial) preko notranje mitohondrijske membrane.

Skupaj ti dve sili tvorita elektrokemijski protonski gradient. V mitohondriju ta znaša okoli 220 mV, od tega prispeva membranski potencial 160 mV (Alberts, 2002).

Zaradi elektrokemijskega protonskega gradienta se na mitohondrije selektivno veže barvilo rodamin 123 (Breunig in sod., 2008).

2.2.1 Rodamin 123

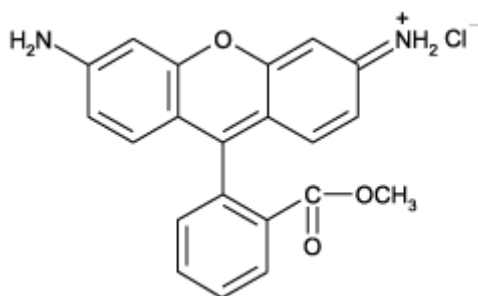
Okvaro mitohondrijev lahko zaznamo kot depolarizacijo mitohondrijske membrane ali kot inhibicijo sinteze ATP. Merjenje spremembe membranskega potenciala ($\Delta\Psi$) je ključno za oceno delovanja mitohondrijev. S tem dobimo podatke o razpoložljivi energiji za ATP

sintezo. Tehnike za merjenje $\Delta\Psi$ temeljijo na preferenčni porazdelitvi membransko permeabilnih fluorescentnih kationskih barvilih v mitohondrijih. Predpostavljajo, da je difuzija barvila neposredno odvisna od stopnje polarizacije membrane (Palmeira in sod., 1996).

Kopičenje barvil je posledica njihovega naboja in njihove topnosti v membranskih lipidih in matriksu. Negativni membranski potencial mitohondrijev, ki je za 130-150 mV nižji od drugih membranskih potencialov v celici, omogoča selektivno vezavo lipofilnih kationov na mitohondrije (Breunig in sod., 2008). Zaradi naštetih lastnosti se ta barvila veliko uporabljajo za merjenje mitohondrijskega membranskega potenciala. Eno izmed najbolj uporabnih barvil za merjenje mitohondrijskega membranskega potenciala je rodamin. Sprva so ga uporabljali le za barvanje histoloških preparatov, saj v celici inhibira oksidativno fosforilacijo. Rodaminov je več, za tovrstno barvanje uporabljamo predvsem rodamin 6G in rodamin B (Johnson in sod., 1980).

Rodamin 123 pa uporabljamo za lokalizacijo mitohondrijev v živih celicah. Bilo je prvo barvilo, ki so ga uporabljali za mikroskopske analize (Johnson in sod., 1980) in analize s pretočnim fluorometrom (Ronot in sod., 1986). Za razliko od rodamina 6G in rodamina B ne povzroča poškodb v celicah. Neposredno obarva mitohondrije, ne da bi pred tem šel skozi endosome in lizosome (Johnson in sod., 1980).

Rodamin 123 ima značilen spekter ekscitacijske in emisijske svetlobe. Ekscitacijski spekter ima vrh pri 507 nm, emisijski pa pri 529 nm.



Slika 2: Struktura rodamina 123 (P-Glycoprotein/Related products)

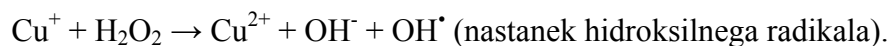
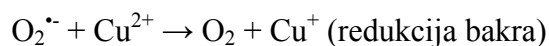
Da rodamin 123 res deluje, so potrdili z uporabo natrijevega azida (NaN_3). Natrijev azid je inhibitor respiratorne verige, ki se veže na citokrom oksidazo ter s tem popolnoma blokira transport elektronov na kisik. Pri celicah, izpostavljenim NaN_3 , pride do znižanja prevzema rodamina 123 v mitohondrijih (Lautraite in sod., 2003).

2.2.2 Baker

Baker je element v sledih, pogost v mnogih kamninah in mineralih. Je eden izmed esencialnih mikroelementov nujno potrebnih za vrsto metabolnih procesov. Najdemo ga skoraj v vseh tipih celic. Oblika in dostopnost organizmom v naravi je odvisna od okoljskih dejavnikov, kot so pH, redoks potencial, trdota vode idr. Spreminjanje teh dejavnikov lahko povzroči pomanjkanje ali strupenost bakra (Fleming in Trevors, 1989).

Čeprav je esencialen element, so povišane koncentracije bakra strupene. Inhibira delovanje citokromov v dihalni verigi, kar povzroči nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti.

V prisotnosti reducenta (superoksidni anionski radikal) se oksidirana oblika reducira, reducirana oblika pa lahko katalizira nastanek hidroskidnega radikala iz vodikovega peroksida:



Več reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) povzroči strukturne in funkcionalne spremembe celičnih membran. Do teh sprememb pride zaradi delovanja prostih radikalov na membranske večkrat nenasičene maščobne kisline, proteine in DNA (Cardoso in sod., 1999).

Sprememba v fosfolipidni strukturi notranje mitohondrijske membrane, ki jo povzročijo prosti radikali, ogrozi delovanje elektronske transportne verige, zaradi česar pride do pomanjkanja energije v celic in posledično smrti (Gerlach in sod., 1994).

Poleg vloge pri nastanku ROS baker tudi inducira prelome verig DNA in oksidacijo baz. Sodeluje pri lipidni peroskidaciji, reducirana oblika (Cu^+) reducira lipidni hidroperoksid do alkoksilnega radikla, nastaja tudi lipid peroksilni radikal. Ta spremeni fluidnost in prepustnost membrane, ali pa se veže na DNA in proteine. V mitohondriju takšni produkti inaktivirajo citokrom c oksidazo.

Omenjene lastnosti so tudi razlog, da smo v nalogi uporabili baker. Služil nam je kot pozitivna kontrola pri ugotavljanju poškodovanosti mitohondrijske membrane.

2.3 NANODELCI

Nanodelci so delci, katerih premer je vsaj v eni dimenziji do nekaj 100 nanometrov. Različne delitve upoštevajo različne meje za klasifikacijo nanodelcev. Po eni od teh delitev, nanodelce razdelimo na fine (~200 nm) in ultrafine nanodelce (~ <20-100 nm) (Koehler in sod., 2008).

Nanodelci se pogosto uporabljajo v medicini, na primer kot kontrastni agensi, magnetni nanodelci iz železovega oksida se uporabljajo v diagnostiki in antibakterijski nanodelci za zdravljenje bakterijskih infekcij (Cao in sod., 2003).

Nanodelci iz kovinskih in keramičnih oksidov se uporabljajo za najrazličnejše namene, od kompozitnih (sestavljanih) materialov, polprevodnikov, fotokemične aktivne površine, površinke prevleke, delov v elektroniki do kozmetike. V velikih količinah se trenutno največ uporabljajo delci iz ogljika, kremenca in titanovega dioksida, ki so manjši od 100 nm (Veranth in sod., 2007).

Nanodelci imajo zaradi večjega števila atomov na površini drugačne lastnosti kakor večji delci iz istih materialov (Tedesco in sod., 2008). Obstajajo tudi druge teorije. Tako so v eni izmed raziskav razliko v toksičnosti pripisali različni kristalni strukturi (anatazna in rutilna oblika) samih delcev in ne razliki v površini delcev (Sayes in sod., 2006).

Na toksičnost nanodelcev vpliva tudi sam postopek izdelave. Pri njem se namreč uporablja klor. Pri procesu tvorbe ultrafinih nanodelcev je vključen korak, ki nevtralizira kisle klorove ione, medtem ko tega koraka pri tvorbi finih nanodelcev ni, zato je del toksičnosti mogoče pripisati tudi samemu kloru (Warheit in sod., 2007).

Kadar imamo nanodelce suspendirane v vodi, je pomemben tudi podatek o aglomeraciji oziroma agregaciji. Kadar med delci obstajajo šibke (van der Waalsove) vezi, govorimo o aglomeraciji, kadar pa so te vezi trdnejše, govorimo o agregaciji (Jiang in sod., 2009). Pri disperziji nanodelcev v raztopini le redko dobimo primarne delce, saj se zaradi elektrostatskih sil ti združujejo. Aglomeracija vzbuja pomisleke o toksičnosti zaradi velikosti, površine in koncentracije nanodelcev v *in vivo* poskusih. Da bi se znebili čim več aglomeratov v poskusu, jih lahko mehansko obdelamo (npr. s sonifikacijo) (Murdock in sod., 2008).

Aplikacije nanodelcev niso nekaj novega, saj so že leta 1939 uporabljali titanov dioksid (TiO_2) za biološke eksperimente, pri katerih je opazoval kostni mozeg pri psih (Huggins, 1939).

2.3.1 Posledice delovanja nanodelcev v celici

Glavna lastnost nanodelcev je njihova velikost, ki jih uvršča med posamezne atome in molekule na eni strani ter kompleksnim materialom na drugi strani. Zaradi tega imajo lahko spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti. Posledica teh spremenjenih lastnosti so različni mehanizmi delovanja, ki so potencialno nevarni za biološke sisteme. Te mehanizme lahko uvrstimo v 4 skupine:

- Svetloba lahko aktivira elektronski par, kar povzroči cepitev vezi in nastanek radikalov,
- S površine nanodelcev se lahko sproščajo strupene snovi,
- Površina nanodelcev lahko služi kot katalitično mesto redoks reakcij,
- Na površini se lahko nastanejo nepravilne strukture kristalov, zaradi katerih nanodelec postane donor ali akceptor elektronov (Nel in sod., 2006).

Posledice delovanja nanodelcev v celici so številne. Tvorba ROS, oksidativni stres, vnetje, sprememba mitohondrijske funkcije, denaturacija proteinov, poškodbe DNA so le nekatere izmed njih (Nel in sod., 2006).

Vdihavanje nanodelcev lahko povzroči vnetje. Kot odgovor na nanodelce se sprošča več citokinov, ki nadzirajo začetek vnetja, te signalne molekule pa so povezane še s številnimi procesi v celici, kot sta npr. celična rast in diferenciacija (Veranth in sod., 2007). Nanodelci imajo lahko vpliv na rast in proliferacijo tumorskih celic (Cao in sod., 2003), sprožijo nastanek večjega števila ROS kakor večji delci istih materialov (Veranth in sod., 2007) ter v celici vplivajo na prevzem snovi pa tudi dostopajo da drugače nedostopnih mest (Tedesco in sod., 2008). Nanodelci lahko pospešijo nastanek ROS, oksidativni stres pa lahko povzroči razpad membranskih lipidov, neravnotežje znotrajceličnega kalcija, spremembe v metabolnih poteh. Vse naštetu lahko sproži apoptozo (Wang in sod., 2007a).

Pri posploševanju nevarnosti nanodelcev moramo biti vseeno previdni, ker ne poznamo mehanizmov delovanja glede na velikost in kemijsko sestavo nanodelcev. Večino raziskav, ki ugotavlja toksičnost nanodelcev so opravili z ogljikovimi nanodelci na makrofagom podobnih celicah. Nanodelci so iz različnih materialov in različne velikosti, kar zahteva natančno testiranje vplivov delcev z različnimi parametri. Poleg tega moramo testiranja opraviti na različnih bioloških nivojih, ne samo *in vivo* in *in vitro*.

Ker so tovrstne raziskave opravili na različnih živalskih modelih, z različnimi protokoli in z različnimi eksperimentalnimi podrobnostmi, jih je tudi po tej plati težko primerjati in sklepati na enoten mehanizem delovanja (Veranth in sod., 2007).

Kot rečeno, so vpliv nanodelcev preučevali na mnogih živalskih modelih z različnimi eksperimentalnimi pristopi. Trenutno poteka največ raziskav indukcije reaktivnih kisikovih zvrsti zaradi kemijskih lastnosti TiO_2 in kakšni so vnetni odzivi (Fabian in sod., 2008).

2.3.2 Nanodelci TiO₂

Eden najbolj uporabljenih materialov, iz katerega so narejeni nanodelci, je titanov dioksid (TiO₂). Je zelo vsestranska snov, glede na velikost delcev pa ga uporabljamo v mnogih aplikacijah. Uporabljal naj bi se celo za zmanjšanje onesnaženja v mestih, saj katalizira pretvorbo dušikovega dioksida v manj toksične nitrate. Vsestranska uporabnost je posledica njegovih lastnosti, kot so netopnost v vodnih raztopinah, ni drag, lahko se pripravi v stabilnih suspenzijah (Fabian in sod., 2008).

Kot beli pigment se veliko uporablja v produkciji barv, papirja, plastike ter premazov. Nanodelci TiO₂ pa se čedalje več uporabljajo tudi v kozmetiki in farmaciji (Lommer in sod., 2002).

Citotoksičnost TiO₂ je odvisna od velikosti delcev. Nanodelci iz TiO₂ so biološko v človeškem in živalskem organizmu inertni (Hart in Hesterberg, 1998). Ultrafini nanodelci pa lahko povzročijo vnetja, fibroze, poškodbe pljuč in celo poškodbe dednine. Zaradi velike možnosti prehoda skozi subepitelijski prostor lahko ultrafini nanodelci prehajajo skozi kožo in vplivajo na imunski sistem (Churg in sod., 1998).

Med dokazane posledice izpostavitve TiO₂ sodijo zvišanje nivoja IL-8 v endotelijskih celicah, znižanje nivoja glutationa v makrofagih in oksidativne poškodbe DNA. Za te spremembe naj bi bila kriva indukcija ROS (Gurr in sod., 2005).

Preživetje človeških celic je odvisno od časa izpostavljenosti in od količine nanodelcev. Po odstranitvi nanodelcev si celice opomorejo, stopnja okrevanja pa je odvisna od razmer ob izpostavitvi. V eni od raziskav so prišli do zaključka, da poškodbe povzročene z ROS niso posledica toksičnih učinkov ultrafinih nanodelcev, saj so lahko le prehodne narave, če se nanodelci odstranijo iz celic (Wang in sod., 2007b).

Nanodelci iz TiO₂ zavirajo rast in razmnoževanje tumorskih jetrnih celic, medtem ko imajo na normalne celice le minimalen učinek. Delovanje pripisujejo dejstvu, da tumorske celice

fagocitirajo TiO₂ nanodelce in jih združijo z lizosomi, posledično naj bi prišlo do uničenja citoplazme (Cao in sod., 2003).

Fotoaktivacija je tudi eden od načinov kako nanodelci TiO₂ škodujejo celici. Zaradi vzbujanja s svetlobo z valovno dolžino manjšo od 385 nm se vzbudijo elektroni zunanjih orbital na površini nanodelcev. Vzburjeni elektroni lahko reagirajo z molekulami vode ali hidroksilnimi ioni, pri tem pa nastanejo hidroskilni in superoksidni radikali (Maness in sod., 1999).

2.3.3 Ultrazvočna obdelava nanodelcev

Da bi preprečili skupke nanodelcev v suspenziji jih lahko mehansko obdelamo. Obdelava materiala z ultrazvokom (v nadaljevanju sonifikacija) je postopek, pri katerem ultrazvok ustvari pritisk na delce, ki se nato zaradi strižnih sli ločijo (Brown in Audet, 2008). Posamezni nanodelci imajo večje razmerje med površino in volumnom, kar naj bi vplivalo na njihove biološke lastnosti (Tedesco in sod., 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 KEMIKALIJE IN RAZTOPINE

- Fiziološka raztopina: fiziološka raztopina za *P. scaber* po Hagedorn in Zirgler 2002
- Baker: raztopina bakra v koncentraciji 6,3 mg/ml. Vir Cu^{2+} ionov je bil $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (Merck), ki smo ga raztopili v fiziološki raztopini
- Rodamin 123 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany): založna raztopina Rodamina 123 je bila 1 mg/ml. Tako založna raztopina kot tudi redčitve in delovna koncentracija (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) so bile narejene s fiziološko raztopino
- Nanodelci (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) iz TiO_2 premera 15 nm, suspendirani v fiziološki raztopini (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sonicificirane smo pripravili s 30 minutno ultrazvočno obdelavo v ultrazvočni kopeli Vibra Cell (Sonics & Materials, Inc, ZDA) pri 20 kHz.

3.2 STEKLOVINA IN POTROŠNI MATERIAL

- Posoda za živali
- Platenka z razpršilcem
- Petrijevke
- Čopič
- Pinceta
- Čaše
- Pipete
- Nastavki za pipete
- Mikrocentrifugirke
- Objektne stekelca
- Krovna stekelca

3.3 PRIPRAVA POSKUSNE ŽIVALI *Porcellio scaber* (ISOPODA, CRUSTACEA)

Poskusne živali smo nabrali v okolici Krškega oktobra 2006. V laboratoriju smo jih imeli v stekleni posodi/terariju v nadzorovanem okolju pri temperaturi 20 ± 2 °C in svetlobnem ciklu (16 ur svetlobe in 8 ur teme). Hranili smo jih s posušenim leskovim listjem (*Corylus avellana*), ki smo ga po potrebi rahlo navlažili z vodo.

Pred izvajanjem poskusa smo živali stehali ter določili fazo levitve (Zidar in sod., 1998). V poskus smo vključili le živali v medlevitvenem ciklu.

Med poskusom je bila vsaka žival v svoji petrijevki. Hranili smo jih z leskovimi listi, na katere smo nanесли želene kemikalije. Ustrezno vlažnost smo živalim zagotovili tako, da smo destilirano vodo razpršili po pokrovu petrijevk, same petrijevke pa smo shranjevali v navlaženih posodah.

Po koncu prehranjevanja smo živali stehali, jim določili fazo levitve ter prešteli iztrebke. Po tem opravljenem postopku je sledila sekcija in analiza posameznih cevčic žlez.

3.4 PRIPRAVA LISTOV ZA PREHRANJEVALNI POSKUS

Živali so se vseskozi prehranjevale z leskovim listjem. Pred uporabo smo liste posušili in stehali, glede na suho težo listov pa nanje odpipetirali baker ali nanodelce. Končna koncentracija tako bakra kakor nanodelcev je bila 1000 mg/g suhe teže lista. Nanešeno raztopino bakra ali suspenzijo nanodelcev smo razmazali s čopičem. Liste smo pustili, da se osušijo, nato pa smo jih prenesli v petrijevke. Po poskusu smo liste ponovno stehali, da bi določili, koliko lista in s tem snovi na njem je žival zaužila med poskusom.

3.5 IZOLACIJA HEPATOPANKREASA:

Po koncu prehranjevanja smo živali usmrtili nato pa naredili sekcijo. S pinceto smo ločili glavo od ostalega telesa. Skupaj z glavo smo izvlekli tudi sprednje črevo, ki se preko želodca drži glave. Ločili smo črevo od žlez hepatopankreasa. Črevo smo zavrgli, ločili žlezne cevke in vsako posamezno dali v fiziološko raztopino za *P. scaber*, ki smo jo pripravili po recepturi Hagedornove in Zieglerja (2002). V njej so žlezne cevke ostale do testiranja (nekaj minut).

3.6 POTEK POSKUSA

3.6.1 Prilagoditev metode – barvanje hepatopankreasa z rodaminom 123

Cevke smo različno dolgo časa (0,5 minute, 1 minuto, 2 minuti, 5 minut) namakali v različnih koncentracijah rodamina 123 (1 mg/ml, 0,1 mg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml) in spirali z različnimi postopki spiranja s fiziološko raztopino (2x in 3x po 2 minuti, 2x in 3x po 3 minute, 2x in 3x po 4 minute, 2x, 3x in 4x po 5 minut, 2x in 3x po 6 minut), da smo ugotovili, pri katerih pogojih vezave in spiranja rodamina 123 dobimo pod mikroskopom najbolj primerno sliko za opazovanje. Sprane cevke smo prenesli na objektno stekelce s kapljico fiziološke raztopine, pokrili s krovnim stekelcem in pregledali pod fluorescentnim mikroskopom Zeiss Axio Imager Z.1 (Zeiss, Nemčija).

3.6.2 Validacija metode s pozitivno kontrolo

Validacija metode s pozitivno kontrolo – *in vitro* inkubacija v bakru

Posamezne cevke žleze smo za različno dolgo (0,5h, 1h, 1,5h, 3h, 4h, 5h) inkubirali v raztopini bakra. Cevke smo nato za 2 minuti prenesli v mikrocentrifugirko s 100 µl rodamina 123 (10 µg/ml). Po preteku inkubacije smo cevke spirali (3X po 5 minut) v

mikrocentrifugirkah s 100 µl fiziološke raztopine, da smo sprali nevezan rodamin 123 iz cevk. Sprane cevke smo nato pregledali pod mikroskopom.

Validacija metode s pozitivno kontrolo – *in vivo* izpostavitvev

Metodo smo validirali tudi z *in vivo* izpostavitvijo hepatopankreasa bakru, ki naj bi destabiliziral mitohondrijsko membrano. Bakrov nitrat $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ smo raztopili v fiziološki raztopini, z raztopino pa premazali leskove liste. Na liste smo nanесли 1000 µg Cu/g suhe teže lista. V vsako petrijevko smo postavili en list z bakrom ter eno žival. Po treh, sedmih in desetih dneh smo opravili sekcijo, inkubirali žlezo v raztopini rodamina 123 in preparat pregledali pod mikroskopom. Za negativno kontrolo smo imeli skupino živali, ki smo jim na liste nanесли le fiziološko raztopino.

3.6.3 Uporaba metode za določanje vpliva nanodelcev na stabilnost mitohondrijev

Po tem, ko smo prilagodili in potrdili ustreznost metode, smo prešli na zastavljeni cilj naše naloge: preveriti vpliv nanodelcev TiO_2 na vezavo rodamina 123 in stabilnost mitohondrijev. Potek poskusa je bil enak kakor pri prilagoditvi metode, le da smo namesto bakra na liste nanašali nanodelce TiO_2 velikosti 15 nm in koncentracije 1000 µg/g suhe teže lista. Za negativno kontrolo smo imeli skupino živali, ki smo jim na liste nanесли le fiziološko raztopino.

3.7 MIKROSKOPIJA

Preparate smo pregledali z mikroskopom Zeiss Axio Imager.Z1 (filter set 01; valovna dolžina ekscitacijske svetlobe 365 nm, emisijske svetlobe 379 nm), ki je bil povezan s kamero AxioCam HRc, sliko smo s programom za zajem in obdelavo slike AxioVision Rel.4.6 opazovali na monitorju. Pri fotografiranju preparatov smo imeli dve možnosti. Pri prvi možnosti bi imeli vse parametre slikanja ročno nastavljene (zaklenjene) in bi ocenjevali svetlost slike (čas osvetlitve). Na nepoškodovano žlezo bi se vezalo več

rodamina 123, ki bi oddajal več svetlobe, zato bi bila slika svetlejša. Druga možnost bi bila, da bi nastavitve prepustili programu, ki bi uporabil najprimernejše parametre za slikanje. Tako bi dobili dokaj podobne slike, vendar z različnimi časi osvetlitve. Krajši čas osvetlitve bi pomenil, da je žleza manj poškodovana, nanjo se je vezalo več rodamina 123 zato oddaja več svetlobe. Izbrali smo drugo možnost.

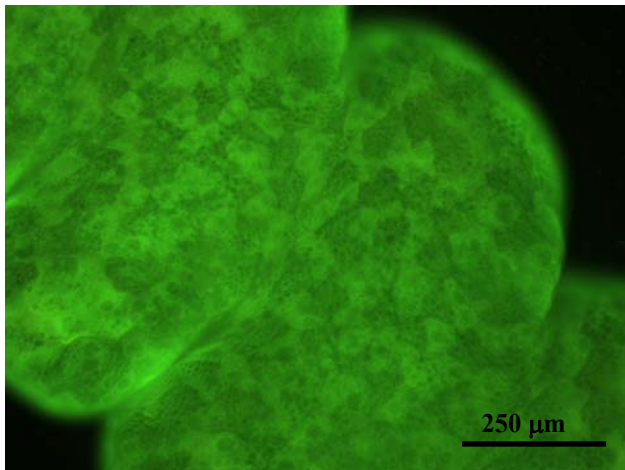
3.8 STATISTIČNE METODE

Statistično razliko smo določali z Mann-Whitneyevim testom (s programom Statgraphics Plus 4.0 za Windows)

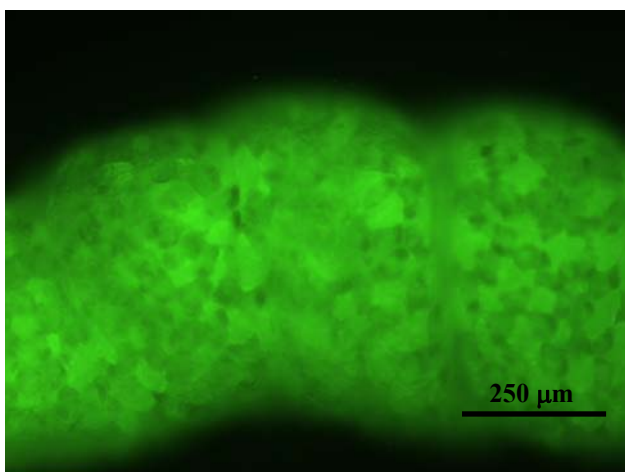
4 REZULTATI

4.1 POSTOPEK ZA OPAZOVANJE ŽLEZ

Pri prilagoditvi metode smo imeli na voljo avtomatske in ročne nastavitve kamere na mikroskopu. Najprej smo poskusili z avtomatskimi nastavitvami slikanja. Spodaj sta prikazani sliki žlez kontrole in najdaljšega časa inkubacije v raztopini bakra.



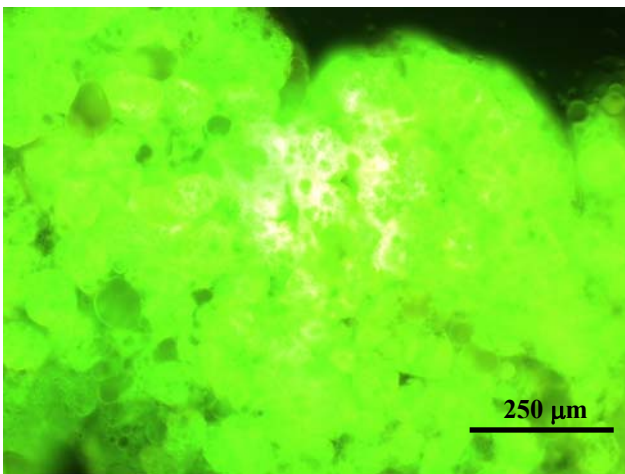
Slika 3: Obarvanje hepatopankreasa po inkubaciji v fiziološki raztopini - kontrola



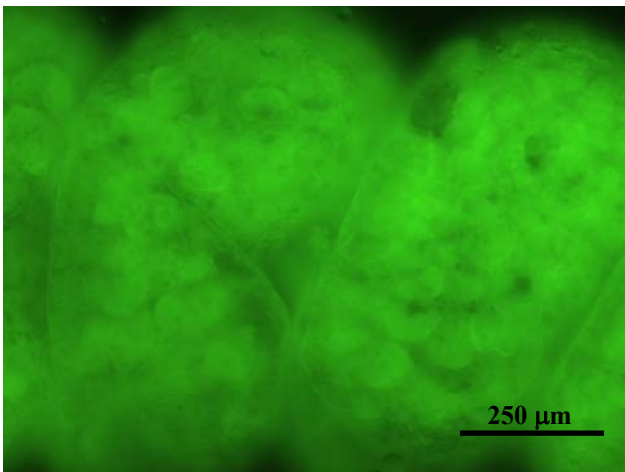
Slika 4: Obarvanje hepatopankreasa po 300 minutni inkubaciji v raztopini bakra

Bistvene razlike med slikama 3 in 4 ni moč opaziti. Zaradi avtomatskih nastavitvev je program izbral optimalne parametre za slikanje, tako da sta žlezi videti dokaj podobno in sta sliki enako svetli.

Zaradi tega smo se odločili še za drugo možnost, ter nastavili čas osvetlitve na kameri na 25 ms. Na spodnjih slikah sta prikazani sliki žlez kontrole (slika 5) in najdaljšega časa inkubacije v raztopini bakra (slika 6).



Slika 5 : Obarvanje hepatopankreasa po inkubaciji v fiziološki raztopini – kontrola



Slika 6: Obarvanje hepatopankreasa po 300 minutni inkubaciji v raztopini bakra

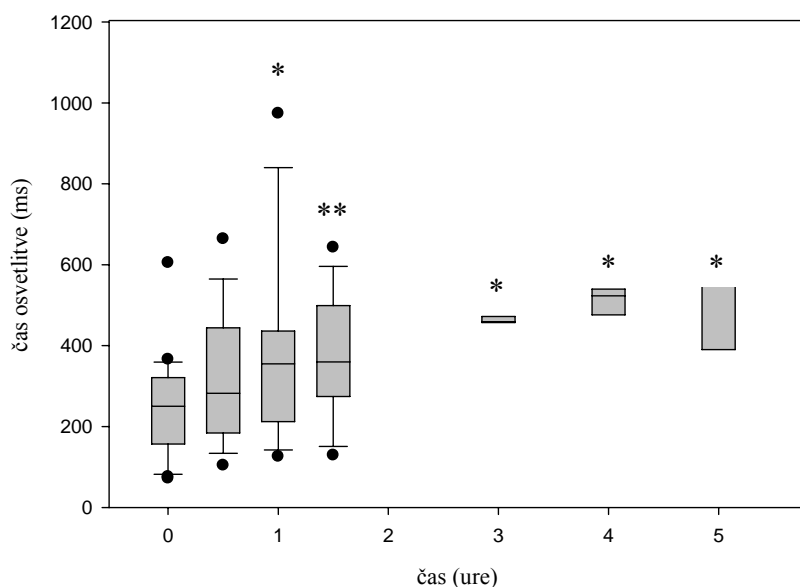
Pri ročnih nastavitvah smo dobili pričakovano različne slike. Žleza, ki smo jo inkubirali v raztopini bakra, je imela poškodovane mitohondrije, zaradi česar se je nanjo vezalo manj rodamina, preparat pa je tako oddajal manj svetlobe.

Kljub temu ima prvi način analize slike določeno prednost. Program sam prilagodi nastavitve in tako nismo podvrženi subjektivni oceni svetlosti slik, ki bi jih morali ocenjevati pri drugi metodi.

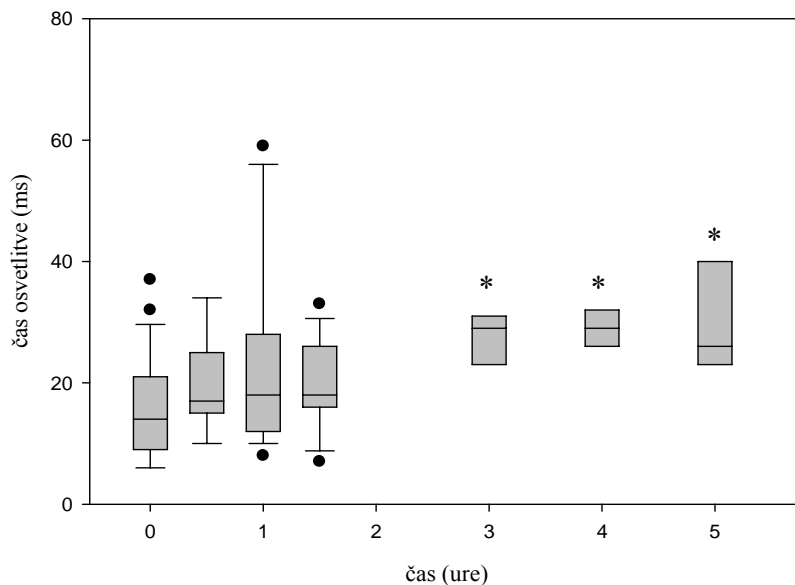
Za rezultate smo uporabili čas osvetlitve, ki ga je kamera sama nastavila pri avtomatskih nastavitvah. Iz teh rezultatov smo dobili sledeče grafe.

4.2 VALIDACIJA METODE S POZITIVNO KONTROLO

Validacija metode s pozitivno kontrolo – in vitro inkubacija v bakru



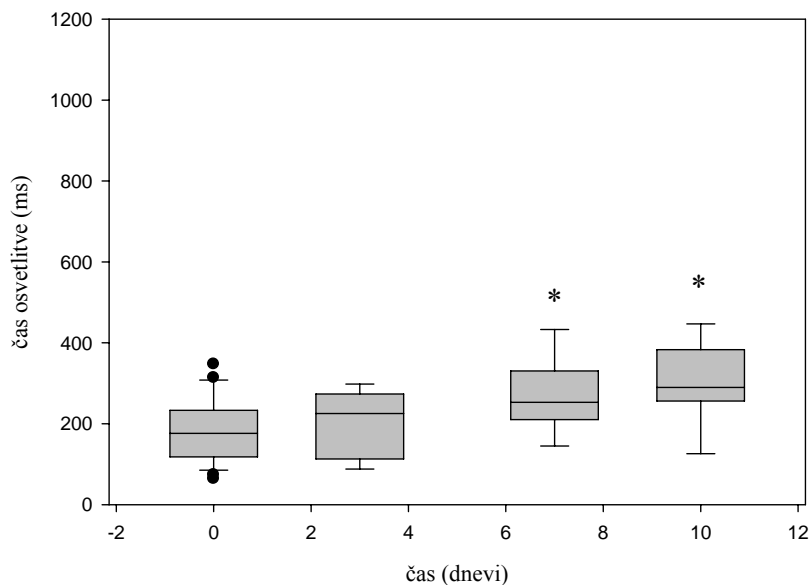
Slika 7: Odvisnost časa osvetlitve žleze od časa inkubacije v raztopini bakra (6,3 mg/ml) pri 25x povečavi (čas 0 je kontrola, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ v primerjavi s kontrolo, • osamelci)



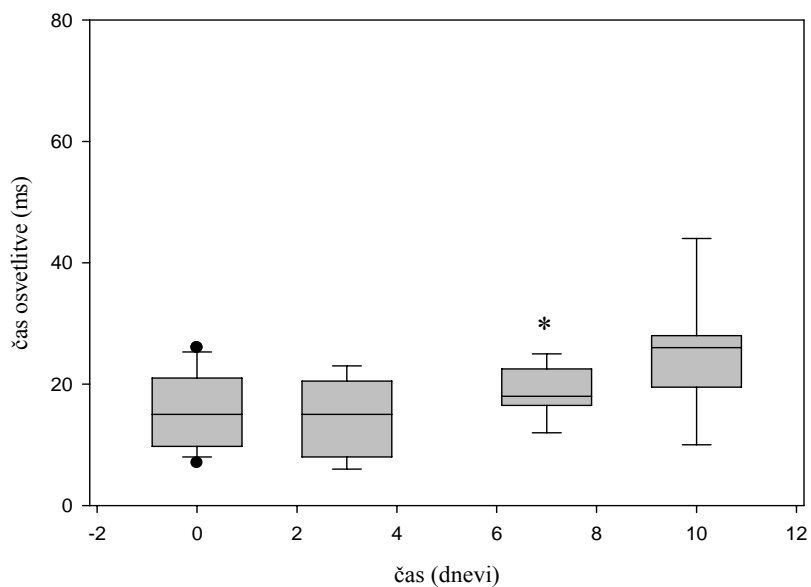
Slika 8: Odvisnost časa osvetlitve žleze od časa inkubacije v raztopini bakra (6,3 mg/ml) pri 100x povečavi (čas 0 je kontrola, * $p < 0.05$ v primerjavi s kontrolo, • osamelci)

Najprej smo preverjali ali lahko z našo metodo ocenjujemo vpliv bakra na vezavo rodamina 123. Žleze smo različno dolgo izpostavili raztopini bakra, jih inkubirali v raztopini rodamina 123, spirali s fiziološko raztopino ter pregledali z mikroskopom. Na slikah 7 in 8 je prikazan čas osvetlitve od različnih časov izpostavljenosti raztopini bakra. Dlje časa kot smo namakali žlezo v raztopini bakra, bolj poškodovane so bile mitohondrijske membrane, manj rodamina 123 se je kasneje vezalo nanje in daljši je bil čas osvetlitve na kameri. Na mitohondrije se je vezalo največ barvila pri kontrolnih poskusih, saj so bile tam njihove membrane nepoškodovane in se je nanje vezalo največ rodamina 123. Pri najbolj poškodovanih žlezah je bilo vezave rodamina 123 najmanj, žleza je najmanj svetila in zato je bil čas osvetlitve najdaljši. Rezultati so to teorijo potrdili, zato lahko sklepamo, da smo potrdili metodo, s katero vrednotimo poškodovanost membran v žlezah hepatopankreasa.

Validacija metode s pozitivno kontrolo – *in vivo* izpostavitvev



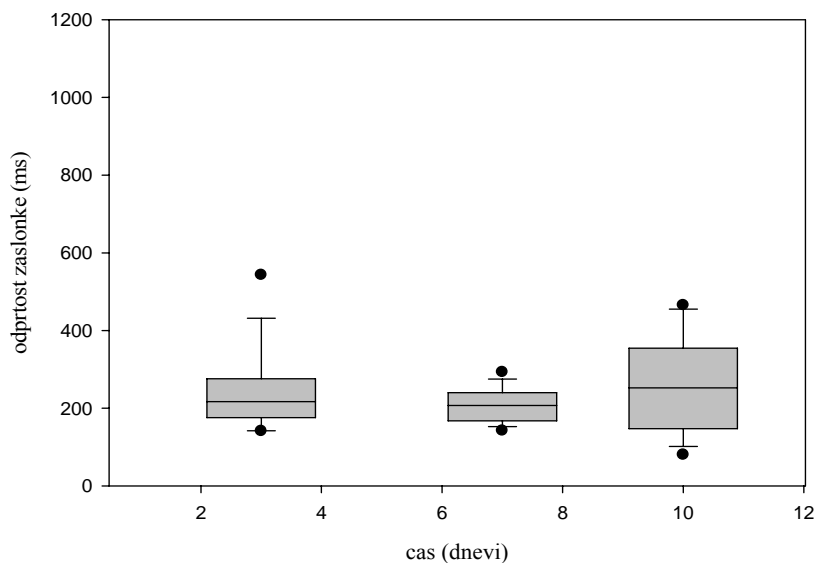
Slika 9: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov z bakrom (1000 µg/g suhe teže lista) pri 25x povečavi (čas 0 je kontrola, * p<0.05 v primerjavi s kontrolo, • osamelci)



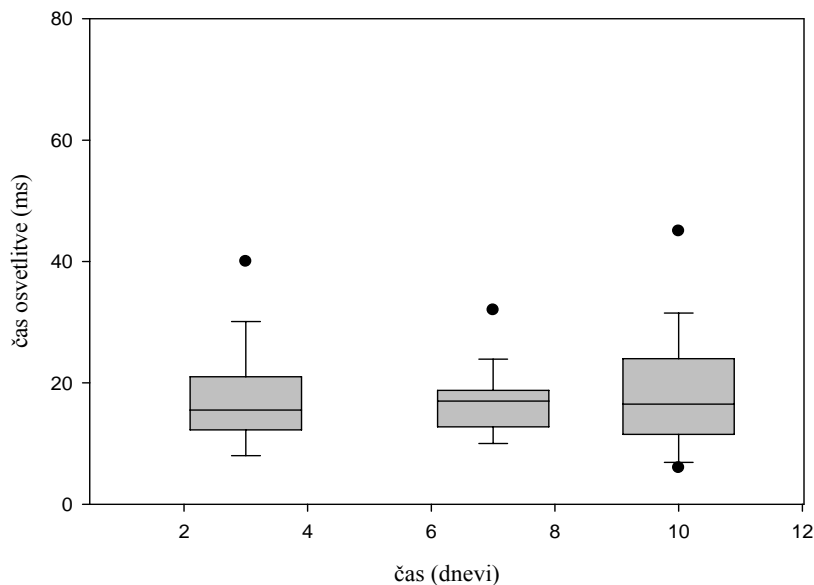
Slika 10: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov z bakrom (1000 µg/g suhe teže lista) pri 100x povečavi (čas 0 je kontrola, * p<0.05 v primerjavi s kontrolo, • osamelci)

Z drugim poskusom smo preizkušali ustreznost metode za vezavo rodamina 123 tudi pri prehranjevalnem poskusu. Na liste smo nanegli baker (1000 $\mu\text{g}/\text{gram}$ suhe teže lista) in kot je razvidno iz slik 9 in 10, je čas osvetlitve odvisen od dolžine prehranjevanja z bakrom. Dlje časa, kot se je žival prehranjevala z bakrom, bolj so bile mitohondrijske membrane poškodovane in manj rodamina 123 se je vezalo nanje. Posledično je bil čas osvetlitve krajši. Iz slik 9 in 10 lahko zaključimo, da je naša metode primerna tudi za vrednotenje poškodovanosti membrane s prehranjevalnim poskusom.

4.3 UPORABA METODE ZA DOLOČANJE VPLIVA NANODELCEV NA STABILNOST MITOHONDRIJEV

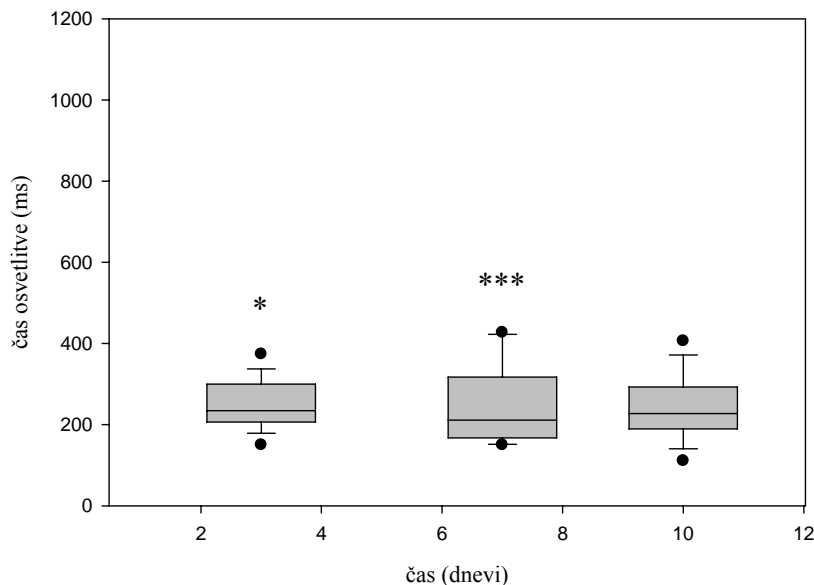


Slika 11: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov s fiziološko raztopino (kontrola) pri 25x povečavi (• osamelci)

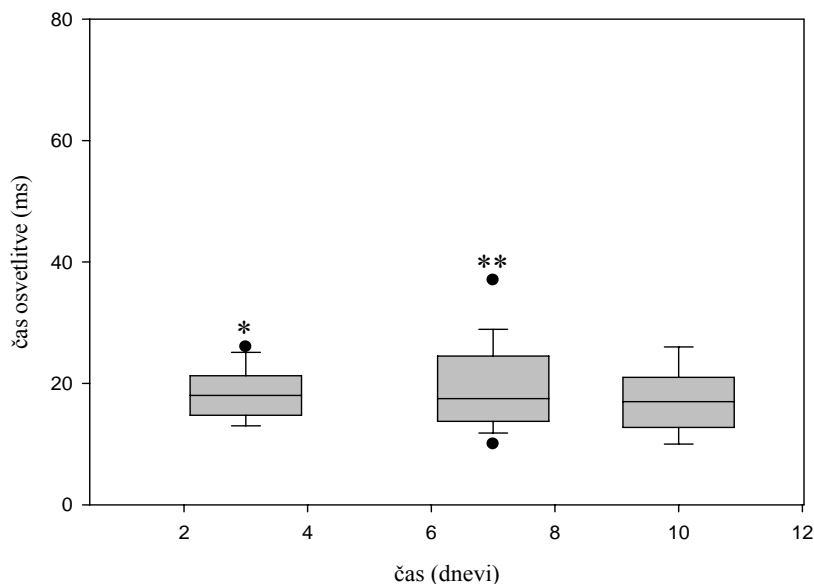


Slika 12: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov s fiziološko raztopino (kontrola) pri 100x povečavi (• osamelci)

Za kontrolo smo imeli v poskusu živali, ki smo jim na liste namesto nanodelcev nanесли fiziološko raztopino. Iz slik 11 in 12 lahko razberemo, da prehranjevanje s fiziološko raztopino ne vpliva na mitohondrijske membrane, saj rezultati po 3., 7. in 10. dnevu ne kažejo sprememb v vezavi rodamina 123.

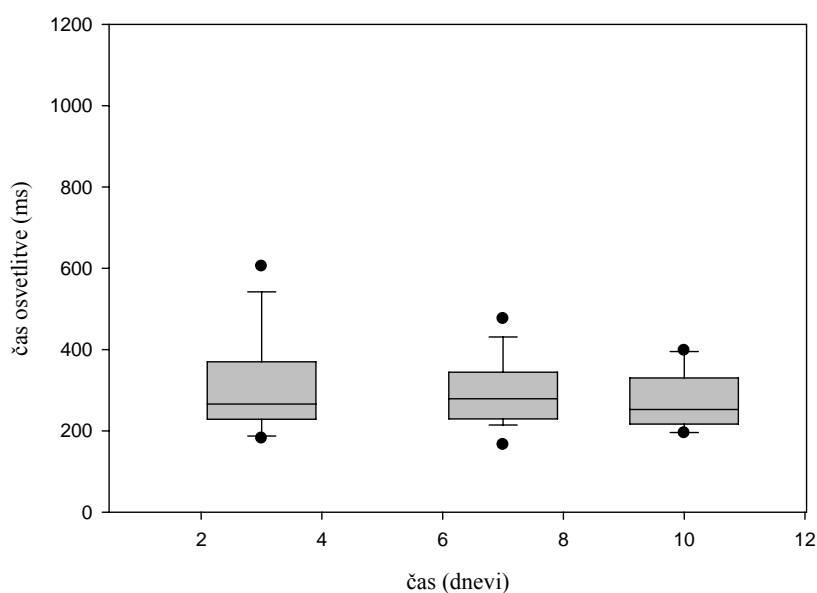


Slika 13: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov z nesoniciranimi nanodelci (TiO_2 , 15 nm, 1000 $\mu\text{g/g}$ suhe teže lista) pri 25x povečavi (* $p < 0.05$, * $p < 0.001$ v primerjavi s prehranjevanjem s fiziološko raztopino ob istem času, • osamelci)**

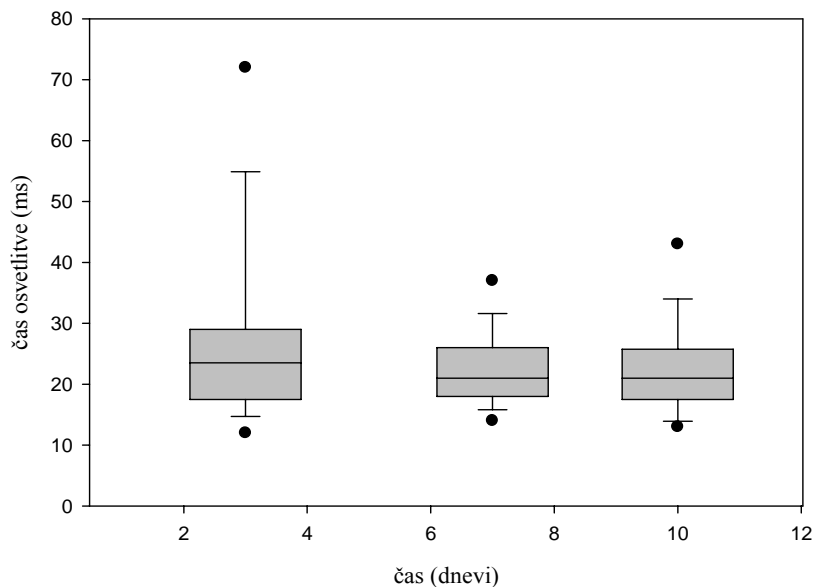


Slika 14: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov z nesoniciranimi nanodelci (TiO_2 , 15 nm, 1000 $\mu\text{g/g}$ suhe teže lista) pri 100x povečavi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ v primerjavi s prehranjevanjem s fiziološko raztopino ob istem času, • osamelci)

Sliki 13 in 14 prikazujeta čas osvetlitve v odvisnosti od časa prehranjevanja poskusnih živali z nesonificiranimi nanodelci. Nesonificirani nanodelci deloma vplivajo na mitohondrijsko membrano. Če primerjamo le spremembo vezanega rodamina 123 med različnimi dnevi prehranjevanja z nesonificiranimi nanodelci vidimo, da spremembe ni. Toda primerjava prehranjevanja s fiziološko raztopino ter z nesonificiranimi nanodelci ob istem času nam pokaže, da je prišlo do značilnih razlik po treh in sedmih dneh poskusa, po desetih dneh pa ne.



Slika 15: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov s sonificiranimi nanodelci (TiO₂, 15 nm, 1000 µg/g suhe teže lista) pri 25x povečavi (• osamelci)



Slika 16: Odvisnost časa osvetlitve žleze od prehranjevanja rakov s sonificiranimi nanodelci (TiO_2 , 15 nm, 1000 $\mu\text{g/g}$ suhe teže lista) pri 100x povečavi (• osamelci)

Sonificirani nanodelci ne vplivajo na stabilnost mitohondrijev, kot lahko vidimo na slikah 15 in 16. V našem desetdnevem poskusu zaradi teh nanodelcev ni prišlo do zmanjšane vezave rodamina 123 na mitohondrijske membrane, saj se čas osvetlitve pri pregledovanju vzorcev z mikroskopom s časom ne spreminja. To velja tako za primerjavo med različnimi dnevi nanodelcem izpostavljenih živali, kot za primerjavo glede na prehranjevalni poskus s fiziološko raztopino.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Vse večja uporaba nanodelcev v vsakdanjem življenju je spodbudila raziskave njihove varnosti za človeka in okolje. Raziskave potekajo na različnih bioloških modelih in z nanodelci različnih materialov. Eden najbolj razširjenih materialov, iz katerega se izdelujejo nanodelci, je titanov dioksid (TiO_2). Uporaben je v široki paleti izdelkov, način uporabe pa je odvisen predvsem od velikost njegovih nanodelcev. Zaradi tako vsestranske uporabe se izvaja tudi veliko toksikoloških testov varnosti teh nanodelcev. V večini poskusov izpostavijo organizme nanodelcem preko vdihovanja ali zaužitja. Tako smo tudi v tej raziskavi kopenske rake izpostavili nanodelcem preko hrane.

Vse več je dokazov, ki povezujejo nanodelce in njihovo strupenost z reaktivnimi kisikovimi zvrstmi (ROS) (Veranth in sod., 2007). Te spojine povzročajo poškodbe v celici. Nanodelci naj bi še povečali njihov nastanek, kar naj bi povečalo obseg celičnih poškodb. Svoj delež pri nastanku ROS prispevajo tudi mitohondriji, zato smo v naši raziskavi preučevali vpliv nanodelcev na stabilnost mitohondrijske membrane. Spremenjena prepustnost membrane bi namreč pomenila povišano uhajanje ROS iz mitohondrijev, kar pa bi imelo negativne učinke.

Prvi cilj naloge je bil prilagoditi metodo za ocenjevanje stabilnosti mitohondrijske membrane v tkivu. Uporabili smo avtomatske nastavitve kamere. Lahko bi nastavili tudi konstanten čas osvetlitve in nato ocenjevali svetlost slike, vendar bi bila v take načinu, po našem mnenju, možnost subjektivne napake večja. Obstajajo tudi programi, s katerimi bi si lahko pomagali in izmerili takšno svetlost slike, vendar je bila to prva raziskava te vrste in smo jo želeli izpeljati kar se da enostavno in poceni. Preparate smo slikali pri 25x in 100x povečavah. Kot rezultat navajamo podatke obeh povečav, saj pri 25x povečavi žleza ni obsegala celotnega vidnega polja in je bila svetilnost odvisna tudi od velikosti same žleze. Večja žleza je morda močnejše svetila že zaradi večje vsebnosti membran, ki so lahko

vezale rodamin 123. Pri 100x povečavi pa smo zajeli le del žleze, zato smo se trudili zajeti tisti del, ki je najbolje odražal stanje celotne žleze. Za razliko od 25x in 100x je 400x povečava zajela le zelo majhen del žleze, kar pa se ni izkazalo za dobro, saj je bila razlika med slikami različnih delov iste žleze prevelika. Zato 400x povečave nismo uporabljali. Na kameri smo uporabljali filter set 01, ki ima ekscitacijo pri 365 nm, emisijo pa pri 397 nm. Glede na značilnosti rodamina 123 (ekscitacijski spekter ima vrh pri 507 nm, emisijski pa pri 529 nm) bi bilo pričakovati, da bi uporabljali filter set 09 (ekscitacija 470 nm, emisija 515 nm). Vendar pri teh valovnih dolžinah že sama žleza oddaja zadosti zelene svetlobe in nam je zaradi preveč ozadja kvarila meritve. Pri filter setu 01 pa smo rodamin 123 specifično ločili od ozadja, kljub temu, da pri 397 nm emitira manj valovanja kot pri 515 nm.

Metodo smo tako uspešno prilagodili, njeno delovanje pa smo preverili z uporabo bakra, ki je znan destabilizator membran.

V drugem delu naloge smo z uporabo bakra potrdili primernost metode za ocenjevanje mitohondrijskega membranskega potenciala. Tako z *in vitro* kot *in vivo* izpostavitvami smo zaznali odvisnost vezave rodamina 123 na mitohondrijske membrane od časovne izpostavljenosti bakru.

V tretjem delu smo testirali vpliv nanodelcev TiO_2 na membrane mitohondrijev. Rezultati kažejo, da sonificirani nanodelci ne vplivajo na stabilnost mitohondrijskih membran, medtem ko imajo nesonificirani nanodelci TiO_2 vpliv na stabilnost mitohondrijske membrane, vendar je ta vpliv viden po treh in sedmih dneh, po desetih dneh pa ne več. Dejansko so mitohondrijske membrane po desetih dneh izpostavljenosti nanodelcem bolj poškodovane kakor po treh ali sedmih dneh. Vendar je težava pri zaznavanju statistične razlike po desetih dne poskusa v tem, da sama osamitev živali povzroča stres, ki lahko vpliva na delovanja celotnega organizma. Da je temu res tako, lahko vidimo na slikah 11 in 12, kjer so prikazane le kontrolne živali. Pri živalih, ki so bile v poskusu 10 dni, je opaziti, sicer ne statistično značilno, da imajo bolj poškodovane mitohondrije od živali, ki so bile v poskusu krajši čas. Ker pa smo ocenjevali vpliv nanodelcev glede na povsem enako kontrolno skupino s fiziološko raztopino, ne zaznamo statistično značilne razlike zgolj zaradi delovanja nanodelcev.

Ti rezultati so v skladu z objavljenimi rezultati Murdocka in sod. (2008), kjer so ugotovili, da je celična viabilnost odvisna od velikosti uporabljenih nanodelcev. Pri uporabi 40 nm velikih nanodelcev Al_2O_3 je bilo celično preživetje manjše kakor pri uporabi nanodelcev velikosti 30 nm. Prav tako je celično preživetje padalo z velikostjo uporabljenih aluminijastih (Al) nanodelcev. Nanodelci Al veliki 50 nm so bili manj reaktivni od 80 nm velikih nanodelcev, kot najbolj reaktivni pa so se izkazali nanodelci velikosti 120 nm.

Sklepamo lahko, da smo z ultrazvokom razbili agregate nanodelcev. Posamezni nanodelci so bili nato dosti majhni, da niso povzročili poškodb mitohondrijev, medtem ko so bili aglomerati v tistem velikostnem razredu, ki je imel večji biološki učinek.

Učinek sonifikacije nanodelcev bi lahko izničilo sušenje suspenzije na listih. Zaradi zmanjševanja volumna tekočine med sušenjem, bi se lahko posamezni nanodelci ponovno združili v agregate. Če bi bilo temu res tako, potem ne bi smeli dobiti razlike med sonificiranimi in nesonificiranimi nanodelci. Predvidevamo, da je zadosti velika vlažnost tako v sami petrijevki kot v posodi, v kateri so bile petrijevke, preprečila sušenje listov, in da do agregacije delcev na površini listov ni prišlo.

Pri rezultatih je tudi razvidno, da smo imeli opravka z dokaj veliko biološko raznolikostjo vzorcev, kajti že pri sami kontroli smo imeli široko območje vrednosti meritev. Vsaka žival je svoj sistem, na katerega ima vpliv mnogo dejavnikov, ki jih v našem delu nismo mogli nadzorovati. Tako smo imeli različno velike, različno stare živali, oba spola, izločili smo le živali, ki so se levile. Že samo za starost pa je dokazano, da vpliva na tvorbo ROS in z njimi povezanimi celičnimi poškodbami (Benz in Yau, 2008).

V literaturi najdemo različne podatke o tem, če in kako so nanodelci nevarni za organizme. Glavna hipoteza je, da naj bi nanodelci povzročili tvorbo ROS, ki nato napadejo večkrat nenasičene fosfolipide. Lipidna peroksidacija povzroči razpad membranskih struktur in smrt celice (Maness in sod., 1999). Predpostavljajo, da je indukcija lipidne peroksidacije le posledica neposrednega stika nanodelcev z biološkimi membranami (Sayes in sod., 2005). Rezultati naše naloge deloma potrjujejo to hipotezo. Če so imeli nanodelci v primeru aglomeratov zadosti velik stik z membranami, so lahko povzročili poškodbe, medtem ko je bil stik sonificiranih nanodelcev premajhen, da bi povzročil večje poškodbe.

Uporaba živali v poskusu ima kar nekaj prednosti. Poskus lahko spremljamo *in vivo*, preučujemo spremembe na nivoju organ/tkivo/celica in imamo pristne fiziološke razmere v poskusu. V našem primeru pa ima opazovanje žleze vendarle pomembno pomanjkljivost. V nalogi nismo zasledovali lokalizacije nanodelcev in ne vemo, kje v organizmu, če sploh, so se nalagali. Morda je razporeditev odvisna od velikosti, v našem primeru pa smo imeli dve različni velikosti nanodelcev. Raziskave glede lokalizacije nanodelcev so že opravili v miših. Mišim so vbrizgali nanodelce (<100 nm) intravenozno ter opazovali porazdelitev nanodelcev v tkivih in organih. Pri odmerku 5 mg/kg telesne teže niso zaznali toksičnosti ali resnih zdravstvenih težav. Ti podatki se skladajo z ugotovitvami, da je TiO₂ po dveh tednih izpostavitve nizko toksičen za ljudi (Boffetta in sod., 2004), pa tudi za miši (Wang in sod., 2007b). Celo pri veliko večjih koncentracijah (560 mg/kg) so pri miših ugotovili dobro toleranco na nanodelce (Umbreit in sod., 2007). Krvni parametri, ki nakazujejo na imunski odziv, niso bili spremenjeni. Prav tako niso zaznali poškodb samih organov. Mikroskopska slika tkiv (možgani, jetra, ledvice, vranica) je bila normalna. En dan po vnosu so bili nanodelci v vseh preiskovanih organih. Po 28 dneh pa jih je bilo največ v jetrih, manj v vranici, medtem ko so v pljučih in ledvicah že po 14 dneh skoraj izginili.

Na stabilnost mitohondrijskih membran bi lahko vplivali tudi nanodelci, ki so prosto v citoplazmi in pridejo v neposreden stik z membranami mitohondrijev. Tu bi preko sinteze ROS lahko sprožili lipidno peroksidacijo in s tem zmanjšali njihovo stabilnost. Mitohondriji so glavni vir ROS, saj ubikinoni in družina citokroma b ne zadrži vseh delno reduciranih kisikovih intermediatov. Elektroni se tako prenesejo neposredno na kisik in nastane superoksidni radikal (Cardoso in sod., 1999). Zato imajo mitohondriji proti ROS več obrambnih sistemov, ki vključujejo tako encimske kakor tudi neencimske antioksidante. Med najpomembnejše spadajo: α -tokoferol, fosfolipid hidroperoksid glutation peroksidaza, MnSOD, citokrom c, katalaza in glutation (Andreyev in sod., 2005). Ti obrambni mehanizmi omogočijo nemoteno delovanje mitohondrijev, saj bi se drugače ob nastanku ROS membrane teh organelov kaj hitro destabilizirale. Naše rezultate lahko razumemo v smislu, da količina sonificiranih nanodelcev, ki so jim bile izpostavljene poskusne živali, ni povzročila usodnega povečanja ROS. Tudi če je v mitohondrijih prišlo do povečanega nastanka teh nevarnih snovi, so jih mitohondrijski popravljalni mehanizmi uspeli nevtralizirati do take mere, da z našim detekcijskim sistemom nismo zaznali spremembe.

V primerjavi z razpoložljivo literaturo na podobni tematiki naši rezultati nekatere raziskave potrjujejo, z drugimi pa se ne ujemajo. To je razumljivo, saj so raziskave namreč opravili na različnih živalskih in celičnih modelih z različnimi nanodelci.

Čeprav mitohondrijsko aktivnost ne gre enačiti z mitohondrijskim membranskim potencialom, naj omenimo še študije vpliva na aktivnost mitohondrijev. Z MTT testom so ugotovili, da je bila mitohondrijska aktivnost pri izpostavitvi fulerenom C₆₀ nespremenjena. Zaznali so sicer spremembe v membranah, vendar niso specifično preučevali mitohondrijsko membrano (Sayes in sod., 2005). Spremembe so pripisali večji tvorbi ROS.

Koncentracijsko odvisnost so ugotovili pri raziskavah vpliva srebrovih delcev na celice (Stolle in sod., 2005). Aktivnost mitohondrijev pri MTS testu je bila pri srebrnih nanodelcih odvisna od koncentracije, večji srebrovi delci pa niso imela učinka na aktivnost mitohondrijev.

Mi mitohondrijske aktivnosti nismo preverjali. Testi se navadno izvajajo na celičnih linijah, ki pa jih mi nismo imeli. V tem se naša naloga tudi bistveno razlikuje od drugih raziskav. Naše poskuse smo opravljali na celotni žlezi in ne na celičnih linijah. Seveda nam je to prineslo določene težave, opazovanju debelega materiala pod mikroskopom, a če želimo interpretirati rezultate in jih v končni fazi prenesti na delovanje pri človeku ima naš model prednost, ker je boljši približek delovanju organizma kot so to izolirane celične linije.

V dosedanjih raziskavah so z uporabo različnih nanodelcev prišli do različnih zaključkov. Xia in sodelavci (Xia in sod., 2004) so preučevali vpliv nanodelcev v izpušnih plinih dizelskih motorjev. Ugotovili so, da je vpliv odvisen od vrste in koncentracije nanodelcev. Alifatski delci niso vplivali na membranski mitohondrijski potencial, medtem ko je bil pri aromatskih spojinah vpliv odvisen od koncentracije nanodelcev. Vendar z raziskavo niso prišli do jasnega zaključka, ali so poškodbe posledica neposrednega delovanja nanodelcev, ali so sekundarna posledica oksidativnega stresa. Z uporabo različno velikih delcev so še ugotovili, da je toksičnost bolj posledica različnih kemikalij kot samih delcev.

Tako MTT test za aktivnost mitohondrijev in rodamin 123 za stabilnost mitohondrijske membrane so uporabili Schrand in sodelavci (Schrand in sod., 2007). Izpostavljenost celic diamantnim nanodelcem velikosti 2-10 nm pa ni pokazala toksičnosti za celice. Mitohondrijske membrane so ostale cele, mitohondrijske aktivnost pa se ni značilno razlikovala pri koncentracijah do 100 µg/ml.

Mitohondrijski potencial se spremeni pri izpostavitvi celic nanodelcem iz hidroksiapatita (Chen in sod., 2007). Ugotovili so, da hidroksiapatit povzroči spremembo mitohondrijskega membranskega potenciala, zaradi tega se poveča izločanje citokroma c iz mitohondrijev. Ta aktivira kaspazo 9, nadaljnje kaskade pa vodijo v apoptozo.

5.2 SKLEPI

- prilagodili smo metodo, ki omogoča posredno oceno stabilnosti mitohondrijskih membran na intaktnem tkivu
- baker poruši stabilnost mitohondrijske membrane, zato smo ga uporabljali za pozitivno kontrolo
- sonificirani nanodelci TiO₂ ne vplivajo na stabilnost mitohondrijske membrane
- nesonificirani nanodelci TiO₂ imajo vpliv na stabilnost mitohondrijske membrane
- različno pripravljene nanodelci imajo različno biološko aktivnost

6 POVZETEK

Uporaba nanodelcev se je v zadnjih letih na različnih področjih (medicina, dignostika, kozmetika in gradbeništvo) skokovito povečala. Vse večja uporaba teh snovi je znanstvenike usmerila v raziskave vpliva na okolje in človeka.

Izmed različnih definicij nanodelcev je najbolj sprejeta ta, da so nanodelci vsi delci, ki imajo vsaj eno dimenzijo manjšo od 100 nanometrov. Zaradi svoje majhnosti imajo na svoji površini izpostavljeno večje število atomov, kot večji delci iste kemijske zgradbe. Zaradi tega se jim v primerjavi z večjimi delci spremenijo kemijske in fizikalne lastnosti, kar lahko privede do neželenih vplivov na človeka in okolje.

Njihovo toksično delovanje v celici naj bi bilo tudi posledica tvorbe reaktivnih kisikovih spojin (ROS) in sprememb v membranah. V naši raziskavi smo ugotavljali vpliv nanodelcev titanovega dioksida (TiO_2) na stabilnost mitohondrijske membrane. Titanov dioksid se kot nanomaterial uporablja predvsem v proizvodnji barv, plastike, papirja ter v kozmetični in farmacevtski industriji.

Za modelni organizem smo uporabili kopenskega enakonožnega raka *Porcellio scaber*. Je eden izmed najbolj proučevanih organizmov v kopenski ekotoksikologiji. Zaradi ustreznosti velikosti, številčnosti, enostavnosti za ravnanje v laboratoriju in sposobnosti akumulacije kovin je zelo uporaben organizem za biomonitoring okolja onesnaženega s kovinami. Pomembna tega raka je njegova lastnost, da tolerira visoke koncentracije težkih kovin.

V nalogi smo najprej prilagodili metodo za posredno določanje stabilnosti mitohondrijskih membran v intaktni prebavni žlezi (hepatopankreas). Rodamin 123 obarva samo mitohondrije, ki ohranjajo stabilen membranski potencial, kar smo izkoristili pri barvanju hepatopankreasa. S fluorescentnim mikroskopom smo nato ugotavljali svetlost slike (čas odprtosti zaslonke na detektorju).

V raziskavi smo kopenske rake izpostavili nanodelcem iz TiO_2 . Nanodelci so imeli premer 15 nm, na liste, s katerimi so se prehranjevali raki, pa smo jih nanašali v koncentraciji 1000 $\mu\text{g/g}$ suhe teže lista. Vpliv na mitohondrije smo ugotavljali po 3., 7. in 10. dneh hranjenja. Ugotovili smo, da sonificirani nanodelci iz TiO_2 ne vplivajo na stabilnost mitohondrijske membrane, medtem ko so nesonificirani delci povzročili spremembe v stabilnosti mitohondrijskega membranskega potenciala.

7 VIRI

Alberts B. 2002. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York, Garland Science: 1463 str.

Andreyev A. Y., Kushnareva Y. E., Starkov A. A. 2005. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry*, 70, 2: 200-214

Benz C. C., Yau C. 2008. Ageing, oxidative stress and cancer: paradigms in parallax. *Nature Reviews Cancer*, 8:875-879

Boffetta P., Soutar A., Cherrie J. W., Granath F., Anderson A., Anttila A., Blettner M., Gaborieau V., Klug S. J., Langard S., Luce D., Merletti F., Miller B., Mirabelli D., Pukkala E., Adami H. O., Weiderpass E. 2004. Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe. *Cancer Causes Control*, 15: 697–706

Brečko D. 1992. Morfologija prebavila in akumulacija težkih kovin v prebavilu izopodov. Magistrska naloga. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 73 str.

Breunig M., Bauer S., Goepferich A. 2008. Polymers and nanoparticles: Intelligent tools for intracellular targeting? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68: 112–128

Brown R. B., Audet J. 2008. Current techniques for single-cell lysis. *Journal of the Royal Society Interface*, 5, Suppl. 2: S131–S138

Cao XY., Dai HL., Yan YH., Li S. 2003. Selective anti-hepatoma treated with titanium oxide nanoparticles *in vitro*. *Journal of Wuhan University of Technology*, 18, 1: 52-54

Cardoso S. M., Pereira C., Oliveira C. R. 1999. Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 26: 3-13

Chen X., Deng C., Tang S., Zhang M. 2007. Mitochondria-dependent apoptosis induced by nanoscale hydroxyapatite in human gastric cancer SGC-7901 cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 1: 128—132

Churg A., Stevens B., Wright J. L. 1998. Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO₂ in a tracheal explant system. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 274: L81–L86

Clifford B., Witkus E. R. 1971. The fine structure of the hepatopancreas of the woodlouse, *Oniscus asellus*. *Journal of Morphology*, 135: 335-350

Drobne D. 1997. Terrestrial isopods—a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16: 1159-1164

Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L., Wiench K., Wohlleben W., van Ravenzwaay B. 2008. Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Archives of Toxicology*, 82:151–157

Flemming C. A., Trevors J. T. 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment a review. *Water, Air and Soil Pollution*, 44: 143-158

Gerlach M., Ben-Shachar D., Riederer P., Youdim M. B. H. 1994. Altered brain metabolism of iron as a cause of neurodegenerative diseases? *Journal of Neurochemistry*, 63: 793-807

Glase J. C., Zimmerman M. C. Waldvogel J. A. 1992. Investigations in orientation behaviour. Student outline. New York, Cornell University

http://www.srvhs.org/staff/teachers/rgroch/bio/bio_home_page/SowbugBehavior.htm#fig1-3.gif (7.9.2008): 9 str.

- Gurr J. R., Wang A. S., Chen C. H., Jan K. Y. 2005. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology*, 213: 66–73
- Hames C. A. C., Hopkin S. P. 1991. Assimilation and loss of ^{109}Cd and ^{65}Zn by the terrestrial isopods *Oniscus asellus* and *Porcellio scaber*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 47: 440-447
- Hart G. A., Hesterberg T. W. 1998. *In vitro* toxicity of respirable-size particles of diatomaceous earth and crystalline silica compared with asbestos and titanium dioxide. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 40: 29–42
- 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: 271-290
- Hopkin S.P. 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. London, Elsevier Applied Science: 366 str.
- Huggins C. B. 1939. A quantitative study of the activity of the reticuloendothelial structures in bone marrow in normal and ischemic limbs as indicated by India ink and titanium dioxide. *Anatomical Record*, 74: 231-255
- Jiang J., Obersdörster G., Biswas P. 2009. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. *Journal of Nanoparticle Research*, 11:77–89
- Johnson L.V., Walsh M.L. Chen L. B. 1980. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 2: 990-994

Koehler A., Marx U., Broeg K., Bahns S., Bressling J. 2008. Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas – A new threat to marine life? *Marine Environmental Research*, 66: 12–14

Lane R. 1988. The digestive system of *Porcellio scaber* Latreille, 1804 (Isopoda, Oniscoidea): Histology and histochemistry. *Crustaceana*, 55: 113-128

Lautraite S., Bigot-Lasserre D., Bars R., Carmichael N. 2003. Optimization of cell-based assays for medium throughput screening of oxidative stress. *Toxicology in vitro*, 17: 207-220

Lommer M. C., Thompson R. P., Powell J. J. 2002. Fine and ultrafine particles of the diet: influence on the mucosal immune response and association with Crohn's disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61: 123–130

Maness P. C., Smolinski S., Blake D. M. Huang Z. Wolfrum E. J. Jackoby W. A. 1999. Bacterial activity of photocatalytic TiO₂: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 9: 4094-4098

Murdock R. C., Braydich-Stolle L., Scharand A. M., Sclager J. J., Hussain S. M. 2008. Characterization of nanometerial desperzion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scatering technique. *Toxicological Sciences*, 101, 2: 239-253

Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. 2006. Toxic potential of materilas at the nanolevel. *Science*, 311: 622-627

P-glycoprotein/related products. 2008. Nottingham, Axxora
<http://www.axxora.com/files/formula/ALX-610-018.gif> (7.9.2008): 1 str.

Palmeira C.M., Moreno A.J., Madeira V.M., Wallace K.B. 1996. Continuous monitoring of mitochondrial membrane potential in hepatocyte cell suspensions. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 35, 1: 35-43

Prevočnik S. 1999. Navodila za vaje iz sistemske zoologije nevretenčarjev. Zbirka Scripta. Ljubljana, Šou – Študentska založba: 52 str.

Prosi F., Dallinger R. 1988. Heavy metals in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latreille. I. Histochemical and ultrastructural characterization of metal-containing lysosomes. *Cell Biology and Toxicology*, 4, 1: 81-96

Ronot X., Benel L., Adolphe M., Mounolou J.C. 1986. Mitochondrial analysis in living cells: the use of rhodamine 123 and flow cytometry. *Biology of the Cell*, 57: 1– 7

Ruppert E. E., Barnes R. D. 1994. Invertebrate zoology. 6th ed. South Melbourne, Brooks/Cole, Thomson Learning: 1056 str.

Sayes C. M. Gobin A. M. Ausman K. D. Mendez J. West J. L. Colvin V. L. 2005. Nano- C_{60} cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials*, 26: 7587-7595

Sayes C.M., Wahi R., Kurian P., Liu Y., West J.L., Ausman K.D., Warheit D.B., Colvin V.L. 2006. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. *Toxicological Sciences*, 92, 1:174–185

Schrand A. M., Huang H., Carlson C., Schlager J. J., Osawa E., Hussain S. M., Dai L. 2007. Are diamond nanoparticles cytotoxic? *Journal of Physical Chemistry Letters*, 111: 2-7

Schweitzer B. 2000 *Porcellio scaber* behavior. Louisville, Bellarmine University http://cas.bellarmino.edu/tietjen/Projects/porcellio_scaber_behavior.htm (7.9.2008): 6 str.

Stolle L. Hussain S. Schlager J. J. Hofmann M.C. 2005. *In Vitro* cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicological Sciences*, 88, 2: 412–419

Szyfter Z. 1966. The correlation of moulting and changes occurring in the hepatopancreas of *Porcellio scaber*. Bulletin de la Societe des Amis des Sciences et des Lettres de Poznan, Ser. D., 7: 95-114

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, A.A. Balkema: 15-23

Tedesco S., Doyle H., Redmond G., Sheehan D. 2008. Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. Marine Environmental Research, 66:131–133

Umbreit T., Weaver J. L., Miller T. J., Zhang J., Shah R., Stratmeyer M. E., Tomazic-Jezic V. 2007. Toxicology of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles: 1. Characterization and tissue distribution in subcutaneously and intravenously injected mice. Toxicologist, 96, 1:287-287

Veranth J. M., Kaser E. G., Veranth M. M., Koch M., Yost G. S. 2007. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. Particle and Fibre Toxicology, 4:2-19

Wägele J.-W. 1992. Isopoda. V: Microscopic anatomy of invertebrates, Crustacea. Harrison F.W., Humes A.G. (eds). New York, Wiley- Liss, Inc.: 559-625

Wang J. J., Sanderson B. J. S., Wang H. Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO₂ particles in cultured human lymphoblastoid cells. 2007. Mutation Research, 628: 99-106

Wang J., Zhou G., Chen C., Yu H., Wang T., Ma Y., Jia G., Gao Y., Li B., Sun J., Li Y., Jiao F., Zhao Y., Chai Z. 2007. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. Toxicology Letters, 168, 2:176–185

Warheit D.B., Webb T.R., Reed K. L., Frerichs S., Sayes C. M. 2007. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties. *Toxicology*, 230: 90-104

Xia T., Korge P., Weiss J. N., Li N., Venkatesen M. I., Sioutas C., Nel A. 2004. Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: Implications for Ultrafine Particle Toxicity. *Environmental Health Perspectives*, 122, 14: 1347-1358

Zidar P., Drobne D., Štrus J. 1998. Determination of moult stages of *Porcellio scaber* (Isopoda) for routine use. *Crustaceana*, 71, 6: 646-654

Zimmer M. 2002. Nutrition in terrestrial isopods (Isopoda: Oniscidea): an evolutionary ecological approach. *Biology Reviews*, 77: 455-493

ZAHVALA

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Aleš ŠPES

**VPLIV NANODELCEV TITANOVEGA DIOKSIDA NA
MITOHONDRIJE**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009