

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Tina DOBELŠEK

**PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA ZA UGOTAVLJANJE
GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV IN DELCEV VIŠJIH
VELIKOSTNIH RAZREDOV TITANOVEGA DIOKSIDA (TiO_2) NA
PRAŽIVALI *Tetrahymena thermophila***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**THE ADAPTATION OF COMET ASSAY FOR TESTING
GENOTOXICITY OF NANO AND BULK PARTICLES OF TITANIUM
DIOXIDE (TiO_2) WITH PROTOZOA *Tetrahymena thermophila***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega medoddelčnega študija mikrobiologije na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Eksperimentalni del naloge je bil opravljen na Katedri za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Za mentorico diplomskega dela je imenovana prof. dr. Romana Marinšek Logar in za recenzentko prof. dr. Damjana Drobne.

Mentorica: prof. dr. Romana MARINŠEK LOGAR

Recenzentka: prof. dr. Damjana DROBNE

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. David STOPAR
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

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.

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

Tina DOBELŠEK

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 620.3:615.9:577.2.083:582.24(043)=163.6
KG	nanotoksikologija/genotoksičnost/nanodelci/TiO ₂ /kometni test/präzivali/ <i>Tetrahymena thermophila</i>
AV	DOBELŠEK, Tina
SA	MARINŠEK LOGAR, Romana (mentorica)/ DROBNE, Damjana (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI	2014
IN	PRILAGODITEV KOMETNEGA TESTA ZA UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV IN DELCEV VIŠJIH VELIKOSTNIH RAZREDOV TITANOVEGA DIOKSIDA (TiO ₂) NA PRAŽIVALI <i>Tetrahymena thermophila</i>
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
OP	XI, 61 str., 6 pregl., 23 sl., 54 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Nanodelci so postali del vsakdanjega življenja, nanotehnologija hitro napreduje, nanodelci pa se proizvajajo v več tisoč tonah letno. Tako se pojavlja potreba po ustreznom ocenjevanju in ovrednotenju škode, ki jo nanodelci lahko predstavljajo za ekosisteme in zdravje ljudi. Med nezanemarljivimi negativnimi učinki, ki jih prinaša nanotehnologija je genotoksičnost, možnost poškodbe DNK, ki ni takoj opazna, vendar lahko privede do nastanka raka ali težav s plodnostjo. V okviru diplomske naloge smo prilagodili kometni test za testiranje genotoksičnosti nanodelcev in makrodelcev titanovega dioksida na praživali <i>Tetrahymena thermophila</i> . S spremeljanjem rasti praživali in uporabo ATP-luciferaznega testa smo ugotovili, da nanodelci TiO ₂ vplivajo na rast in energetsko stanje celic. Ugotovili smo, da celice <i>T. thermophila</i> aktivno prevzemajo delce TiO ₂ iz gojišča in jih skladiščijo v prebavnih vakuolah. V nasprotju z vsesplošno razširjenim prepričanjem, da TiO ₂ povzroča genotoksičnost preko oksidativnega stresa, mi nismo izmerili povišanih vrednosti ROS (reaktivnih kisikovih spojin) v primerjavi s kontrolo (razen pri delcih višjih velikostnih razredov - makrodelcih višjih koncentracij). Ker pozitivnih rezultatov kometnih testov nismo mogli podpreti s citotoksičnimi markerji kot so lipidna peroksidacija in produkcija ROS, predvidevamo, da so rezultati kometnega testa lažno pozitivni in predlagamo, da se kometni test vedno dopolni še s kakšnim drugim testom genotoksičnosti.

KEY WORDS AND DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 620.3:615.9:577.2.083:582.24(043)=163.6
CX	nanotoxicology/nanotoxicity/nanoparticles/TiO ₂ /comet assay/protozoa/ <i>Tetrahymena thermophila</i>
AU	DOBELŠEK, Tina
AA	MARINŠEK LOGAR, Romana (supervisor)/ DROBNE, Damjana (reviewer)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmenal Programme in Microbiology
PY	2014
TI	THE ADAPTATION OF COMET ASSAY FOR TESTING GENOTOXICITY OF NANO AND BULK PARTICLES OF TITANIUM DIOXIDE (TiO ₂) WITH PROTOZOA <i>Tetrahymena thermophila</i>
DT	Graduation Thesis (University studies)
NO	XI, 61 p., 6 tab., 23 fig., 5 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Involvement of nanoparticles in our everyday lives are increasing. Nanotechnology is developing rapidly and nanoparticles are produced in thousands of tons per year. There is an increased need of assessment of damage that could be caused by nanoparticles to ecosystems and people's helth. The ability of nanoparticles to induce DNA damage is one of negative effects of nanotechnology. This side effect can not be recoreded immediately, but it can become a source of cancer or fertility problems over time. In this thesis, we have adapted the comet assay which tests genotoxicity of TiO ₂ nanoparticles on protozoa <i>Tetrahymena thermophila</i> . By measurig the growth of the protozoa and by ATP-luciferase test, we found that TiO ₂ nanoparticles influence the protozoan growth and its energetic condition. We have observed active uptake of particles by protozoa into food vacuoles. In contrary to current theory which says that TiO ₂ is inducing genotoxicity via oxidative stress, we did not detect any increase in ROS levels in comparison to controls (except with bulk TiO ₂ of higher concentration). We could not support positive results of comet assay with citotoxic markers such as lipid peroxidation or ROS production so we asume that our results are false positive. We suggest that results of comet assay should allways be supported by result of some other genotoxic tests.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI).....	III
Key words documentation (KWD).....	IV
Kazalo vsebine.....	V
Kazalo preglednic.....	VIII
Kazaloslik.....	IX
Okrajšave in simboli.....	XII
	str.
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 (TiO_2)	3
2.2 GENOTOKSIČNOST NANODELCEV	4
2.2.1 Mehanizmi genotoksičnosti nanodelcev	5
2.2.2 Testiranje genotoksičnosti nanodelcev	6
2.3 KOMETNI TEST	7
2.4 POSKUSNI ORGANIZEM - <i>Tetrahymena thermophila</i>	10
2.4.1 Fagocitoza	11
2.4.2 <i>Tetrahymena thermophila</i> in nanotoksikologija	12
3 MATERIALI IN METODE.....	13
3.1 KEMIKALIJE IN TESTNI ORGANIZEM.....	13
3.1.1 Gojenje poskusnega organizma <i>T. thermophyla</i>	13
3.1.2 Pogoji izpostavitve delcem TiO_2	14
3.1.3 Priprava suspenzij delcev TiO_2	15
3.1.4 Karakterizacija delcev TiO_2	16
3.2 DOLOČANJE RASTNE KRIVULJE IN VIABILNOSTI.....	17
3.3 IZVAJANJE ATP-LUCIFERAZNEGA TESTA.....	19

3.4 MERJENJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE.....	21
3.5 MERJENJE REAKTIVNIH KISIKOVIH SPOJIN (ROS).....	23
3.6 OPAZOVANJE POLNJENJA VAKUOL Z DELCI TiO ₂	24
3.7 IZVAJANJE KOMETNIH TESTOV.....	25
3.7.1 Kemikalije, potrebne za izvedbo kometnih testov	27
3.7.2 Kometni test z alkalno lizo <i>in vivo</i>	28
3.7.3 Elektroforeza	29
3.7.4 Opazovanje kometov pod mikroskopom in ocenjevanje poškodb jedrne DNK	29
3.7.5 Kometni test z alkalno lizo <i>in vitro</i>	30
3.7.6 Acelularni kometni test z alkalno lizo	30
3.7.7 Kometni test z nevtralno lizo <i>in vivo</i> ter <i>in vitro</i>	31
3.7.8 Statistična analiza kometnih testov	31
4 REZULTATI	32
4.1 KARAKTERISTIKE DELCEV TiO ₂	32
4.2 IZRIS RASTNE KRIVULJE	34
4.3 REZULTATI VIABILNOSTI	35
4.4 REZULTATI ATP-LUCIFERAZNEGA TESTA.....	36
4.5 REZULTATI LIPIDNE PEROKSIDACIJE.....	37
4.6 REZULTATI MERJENJA REAKTIVNIH KISIKOVIH SPOJIN (ROS).....	38
4.7 REZULTATI OPAZOVANJA POLNJENJA VAKUOL Z DELCI TiO ₂	40
4.8 MORFOLOŠKE SPREMEBE CELIC <i>T. thermophila</i> PO IZPOSTAVITVI DELCEM TiO ₂	41
4.9 REZULTATI KOMETNIH TESTOV	42
4.9.1 Rezultati kometnega testa z alkalno lizo <i>in vivo</i>	42
4.9.2 Rezultati kometnega testa z alkalno lizo <i>in vitro</i>	43
4.9.3 Rezultati acelularnega kometnega testa z alkalno lizo	44
4.9.4 Rezultati kometnega testa z nevtralno lizo <i>in vivo</i>	45
4.9.5 Rezultati kometnega testa z nevtralno lizo <i>in vitro</i>	46

4.9.6 Končni rezultat kometnih testov.....	47
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	48
5.1 RAZPRAVA.....	48
5.2 SKLEPI.....	52
6 POVZETEK.....	54
7 VIRI.....	56
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Sestava "bogatega gojišča" (BG).....	13
Preglednica 2: Kloridi za pripravo bogatega gojišča.....	13
Preglednica 3: Sulfati pripravo bogatega gojišča.....	14
Preglednica 4: Priprava založnih raztopin za izvedbo kometnega testa.....	27
Preglednica 5: Priprava delovnih raztopin za izvedbo kometnega testa.....	27
Preglednica 6: Priprava agaroznih gelov (minigelov) za matirana objektna stekelca.....	28

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prikaz kometa z označenimi predeli (Kononenko, 2012).....	9
Slika 2: Slika praživali <i>Tetrahymena thermophila</i> (Subramanian, 2009).....	10
Slika 3: Shematski prikaz priprave celic <i>Tetrahymena thermophila</i> ter dodajanja delcev TiO ₂	15
Slika 4: Prikaz Neubauerjeve števne komore za štetje celic z mikroskopom (Stopar in sod., 2005: 22).....	18
Slika 5: Prikaz reakcije oksidacije luciferina v oksiluciferin (Chen in Cushion, 1994).....	19
Slika 6: Prikaz reakcije tiobarbiturne kisline in malondialdehida, ki da obarvan produkt (Antolovich in sod., 2002).....	21
Slika 7: Celici <i>T. thermophila</i> s praznimi in polnimi vakuolami (foto: Dobelšek T.).....	24
Slika 8: Shematski prikaz različnih protokolov, ki smo se jih poslužili za izvajanje kometnega testa.....	26
Slika 9: Slika nanodelcev TiO ₂ (Novak in sod., 2012).....	32
Slika 10: Zeta potencial nanodelcev TiO ₂ (1000 µg/mL) glede na pH izmerjen v revnem gojišču.....	33
Slika 11: Rastna krivulja praživali <i>T. thermophila</i>	34
Slika 12: Časovni prikaz viabilnosti praživali <i>T. thermophila</i>	35
Slika 13: Koncentracija ATP v kulturi praživali <i>T. thermophila</i> po izpostavitvi različnim koncentracijam in velikostim delcev TiO ₂ , merjene po 4 in 24 urah.....	36
Slika 14: Slika 14: Formacija ROS po 4 urah izpostavitve suspenzijam delcev TiO ₂	38
Slika 15: Kinetika nastajanja ROS med štiriurno izpostavitvijo delcem TiO ₂	39
Slika 16: Deleži celic praživali, ki so imele vsaj eno prebavno vakuolo napolnjeno z delci TiO ₂	40
Slika 17: Celica <i>T. thermophila</i> z razlito celično vsebino ter spremenjeno morfologijo (foto: Dobelšek T.).....	41
Slika 18: Odstotki repne DNK glede na biološko ponovitev, velikost in koncentracijo delcev pri celicah, ki so bile tretirane z delci v gojišču (alkalna liza).....	42

Slika 19: Odstotki repne DNK glede na biološko ponovitev, velikost in koncentracijo delcev pri celicah, ki so bile tretirane z delci, ko so bile vklopljene v gel (alkalna liza).....	43
Slika 20: Odstotki repne DNK glede na biološko ponovitev, velikost in koncentracijo delcev pri acellularnem tretiranju z delci (alkalna liza).....	44
Slika 21: Odstotki repne DNK glede na biološko ponovitev, velikost in koncentracijo delcev pri celicah, ki so bile tretirane z delci v gojišču (nevtralna liza).....	45
Slika 22: Odstotki repne DNK glede na biološko ponovitev, velikost in koncentracijo delcev pri celicah, ki so bile tretirane z delci, ko so bile vklopljene v gel (nevtralna liza).....	46
Slika 23: Povprečni odstotek repne DNK za vse izvedene različice kometnega testa, izvedene po različnih postopkih, z različnimi koncentracijami in velikostmi delcev.....	47

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	Adenozin-5'-trifosfat
BG	Bogato gojišče
Bulk	Delci z osnovnimi dimenzijami večjimi od 100 nm, makrodelci
ddH ₂ O	Dvakrat destilirana voda
DLS	Dinamično sipanje svetlobe (angl. <i>Dynamic Light Scattering</i>)
DMSO	Dimetil sulfoksid
DNK / DNA	Deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EDTA	Etilendiamintetraocetna kislina (angl. <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
EtBr	Etidijev bromid
LMP agarosa	Agarosa z nizko temperaturo tališča (angl. <i>Low Melting Point agarose</i>)
MDA	Malondialdehid (angl. <i>Malondialdehyde</i>)
MMS	Metil metansulfonat (angl. <i>Methyl methanesulfonate</i>)
MQ = MILLIQ	Deminalizirana, destilirana voda
NMP agarosa	Agarosa z običajno temperaturo tališča (angl. <i>Normal Melting Point agarose</i>)
OD ₆₅₀	Optična gostota merjena pri valovni dolžini svetlobe $\lambda=650$ nm (angl. <i>Optical Density</i>)
OTM	Repni moment po Olivu (angl. <i>Olive Tail Moment</i>)
RCF	Relativna centrifugalna sila (angl. <i>Relative Centrifugal Force</i>)
RG	Revno gojišče
ROS	Reaktivne kisikove zvrsti (angl. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
SCGE	Gelska elektroforeza posameznih celic (angl. <i>Single Cell Gel Electrophoresis</i>)
SEM	Vrstični elektronski mikroskop (angl. <i>Scanning Electron Microscope</i>)
Tail DNA [%]	(= repna DNK) Delež DNA v kometnem repu, izražen v %
TEM	Presevni elektronski mikroskop (angl. <i>Transmission Electron Microscope</i>)
TTH	<i>Tetrahymena thermophila</i>
UV	Ultravijolična svetloba (angl. <i>Ultra Violet</i>)

1 UVOD

Nanodelci so postali del vsakdanjega življenja, nanotehnologija hitro napreduje, delci pa se proizvajajo v več tisoč tonah letno (Kahru in sod., 2008). Tako se pojavlja potreba po ustreznom ocenjevanju in ovrednotenju škode, ki jo nanodelci lahko predstavljajo za ekosisteme in zdravje ljudi (Stone in sod., 2009; Karlsson, 2010).

Titanov dioksid (TiO_2) nas v sodobnem svetu obdaja tako rekoč na vsakem koraku in se mu je nemogoče izogniti, saj je prisoten v prenekaterih izdelkih, ki jih vsakodnevno uporabljamo. Še vedno pa vemo premalo o tem, kako strupeni so pravzaprav ti delci za organizme. V kakšni meri interagirajo z DNK in povzročajo različne poškodbe? Pojavlja se potreba po standardizaciji vrste testov, ki bi nam zagotavljali večji nadzor za ugotavljanje strupenosti. Nanodelci se zaradi svoje velikosti lahko vedejo v okolju precej bolj reaktivno kot delci višjih velikostnih razredov, zato nas zanima, kako genotoksični so eni in drugi.

Med nezanemarljivimi negativnimi učinki, ki jih prinaša nanotehnologija je genotoksičnost, možnost poškodbe DNK, ki niso takoj opazne, vendar lahko vodijo v nastanek raka, kroničnih bolezni ali težave s plodnostjo. Zato so genotoksikološke študije pomembe za zagotavljanje zdravja ljudi in okolja, v katerem živimo.

V zadnjih letih se je nanotoksikologija močno razvila. Izvedenih je bilo že veliko študij o škodljivosti najrazličnejših nanodelcev. Vendar pa znanstvenikom povzročajo težave nepoenotene študije in metode, tako da jih je med sabo pravzaprav nemogoče primerjati. Pojavlja se potreba po naboru testov, ki bi omogočili enotnejše vrednotenje genotoksičnosti.

Med največkrat uporabljene metode za ocenjevanje genotoksičnosti prištevamo kometni test, saj z njim lahko hitro in relativno enostavno ocenimo vpliv določene kemikalije na poškodbo DNK testnega organizma. Vsekakor pa za potrditev rezultatov potrebujemo še druge metode, s katerimi podpremo dobljene rezultate. Postopke, s katerimi bomo podprli rezultate kometnega testa izberemo glede na predviden mehanizem genotoksičnosti določenih nanodelcev. Če delamo z nanodelci, za katere se predvideva, da povzročajo genotoksičnost s tem, da izzovejo oksidativni stres, je najbolje, da opravimo teste, ki nam preverijo povišanje oksidativnega stresa v celicah.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je ugotoviti, kako genotoksični so nanodelci in delci višjih velikostnih razredov in prilagoditi kometni test za modelni organizem *Tetrahymena thermophila* tako, da bo primeren za ugotavljanje morebitne genotoksičnosti nanodelcev in delcev višjih velikostnih razredov titanovega dioksida. Rezultate kometnega testa pa vzporedno preverimo še z nekaterimi biološkimi testi (viabilnost, ATP-luciferažni test, polnjenje vakuol s titanovim dioksidom, lipidna peroksidacija in merjenje reaktivnih kisikovih spojin).

1.2 HIPOTEZE

Predvidevamo, da delci TiO₂ povzročajo zmanjšanje koncentracije ATP v kulturi in da je vpliv na koncentracijo ATP različen pri različnih velikostih delcev.

Predvidevamo, da bomo kometni test ustrezno prilagodili testnemu organizmu in tako pridobili možnost testiranja morebitne genotoksičnosti titanovega dioksida.

Predvidevamo, da titanov dioksid povzroča poškodbe DNK, da vpliva na lipidno peroksidacijo in na tvorbo reaktivnih kisikovih spojin ter da so razlike med poškodbami z različno velikimi delci očitne.

Predvidevamo, da celice *Tetrahymena thermophila* aktivno zaužijejo delce TiO₂, ki se koncentrirajo v prebavnih vakuolah, po določenem časovnem obdobju pa se izločijo. Predvidevamo, da lahko proces polnjenja in izločanja spremljamo s svetlobnim mikroskopom.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANODELCI

Mednarodna organizacija za standardizacijo (ISO) je izraz »nanomaterial« definirala kot material, ki ima vsaj eno dimenzijo v nanometrskem območju, ki naj bi bilo od 1 do 100 nm (Magdolenova in sod., 2014). Nanodelci so torej delci, ki imajo vsaj eno dimenzijo manjšo od 100 nm, lahko so naravnega izvora, načrtno proizvedeni (inženirski nanodelci) ali nenamensko proizvedeni in imajo razmerje med površino in volumnom večje od $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$ (Oberdörster in sod., 2005; Magdolenova in sod., 2014).

Delci višjih velikostnih razredov (ang. bulk) oz. makrodelci pa so delci, ki so večji od 100 nm in imajo manjše razmerje med površino in volumnom in zaradi tega drugačne fizikalno-kemijske, mehanske in optične lastnosti. V nadaljevanju diplomskega dela se bomo za delce višjih velikostnih razredov posluževali izraza »makrodelci«.

Zaradi razvoja komercialne nanotehnologije, je vse več ljudi izpostavljenih nanodelcem. Ocenjuje se, da bo proizvodnja v prihodnjih letih dramatično naraščala, kar pomeni, da bodo vedno večje količine nanodelcev izpuščene v okolje, kjer živimo in neposredno ali posredno prišle v stik z nami (Kahru in sod., 2008).

Kljub množični proizvodnji nanodelcev, pa njihov vpliv na okolje (predvsem na vodne ekosisteme) in na zdravje ljudi še ni dobro raziskan in ga še ne razumemo dovolj. Lastnosti nanodelcev, ki so za izboljšavo določenih produktov lahko dobre, so morda lahko škodljive za biološke sisteme (Magdolenova in sod., 2014). Tako lahko naprimer velikost, oblika, površinske lastnosti delca, sestava, topnost, agregacija, prisotnost mutagenov ali prehodnih kovin vplivajo na mehanizme genotoksičnosti (Magdolenova in sod., 2014; Stone in sod., 2009; Karlsson in sod., 2010). Izziv za nanotoksikologe v tem trenutku je, da raziščejo mehanizme, s katerimi nanodelci vplivajo na celice, tkiva in organe ter vzpostavijo standardne teste za testiranje strupenosti različnih nanodelcev. Le s standardizacijo testov strupenosti bomo lahko zagotovili bolj varno uporabo nanodelcev.

2.1.1 Nanodelci titanovega dioksida (TiO_2)

Makrodelci TiO_2 naj bi bili biološko inertni in naj ne bi škodovali ljudem in živalim, zato jih zakonodaja v Evropski uniji uvršča med varne materiale za prehrano ljudi (Petković in sod., 2011a; Remškar, 2009). Vendar pa zakonodaja nikjer ne omenja velikosti delcev, čeprav je

čedalje več dokazov o tem, da se nanodelci obnašajo drugače kot makrodelci in so lahko potencialno bolj škodljivi zdravju (Remškar, 2009). Že vrsto let se množično uporablajo v pigmentih za proizvodnjo barv, v papirju, plastiki, keramiki, prekrivanju varilnih palic, v sodobni medicini in farmaciji ter kot prehranski aditivi. Zaradi svojih fotokatalitskih sposobnosti se uporablajo kot dezinfekcijsko sredstvo pri tretiranju odpadnih voda v čistilnih napravah, pri čiščenju zraka, proučuje pa se celo njihova uporaba pri izdelavi solarnih celic (Petković in sod., 2011a; Ju-Nam in sod., 2008; Aruoja in sod., 2009). Najdemo jih tudi v tekstu (nogavicah in spodnjem perilu, ki je v neposrednem stiku s kožo), zobnih pastah ter ostalih kozmetičnih izdelkih kot so npr. kreme za zaščito pred soncem. Ocenjuje se, da je bilo leta 2010 proizvedenih že 5000 ton nanodelcev TiO₂ letno, z leti pa naj bi se proizvodnja še povečala (Kahru in Dubourguier., 2010).

Nanodelci TiO₂ v zadnjem času zamenjujejo makrodelce, predvsem zaradi svoje visoke stabilnosti, boljših antikoroziskih in fotokatalitskih lastnosti. Vendar pa se nanodelci od makrodelcev ne razlikujejo le po zaželenih lastnostih, temveč lahko imajo potencirane tudi nezaželjene, celo škodljive lastnosti (Petković in sod., 2011a).

Znano je, da lahko nanodelci TiO₂ sprožijo oksidativni stres, povečajo produkcijo vodikovega peroksida in dušikovega oksida, sprožijo vnetne odzive in nastanek mikrojeder. Vendar je znanje o mehanizmih genotoksičnosti še precej pomanjkljivo (Sathya in sod., 2010; Xu in sod., 2009; Gurr in sod., 2005). Možne pa so tudi direktne interakcije DNK in delcev TiO₂, kar lahko vpliva na mitozo in fizično prepreči pravilno podvojevanje celic (Magdolenova in sod., 2014) ali pa vpliv delcev na permeabilnost celične membrane (Li in sod., 2008).

2.2 GENOTOKSIČNOST NANODELCEV

Genotoksikologija je veda, ki proučuje spremembe na genetskem materialu, ki se zgodijo zaradi izpostavitve dednega materiala toksičnim dejavnikom. Poškodbe na DNK pa lahko vodijo v kancerogenezo ali neplodnost (Sathya in sod., 2010).

Obstaja že vrsta študij, ki obravnavajo genotoksičnost nanodelcev. Objavljenih pa je bilo tudi kar nekaj preglednih člankov o tej tematiki (Gonzales in sod., 2008; Stone in sod., 2009; Landsiedel in sod., 2009; Karlsson in sod., 2010; Donaldson in sod., 2010). Magdolenova je s sodelavci v letu 2014 objavila pregledni članek, kjer so ugotovili, da so rezultati genotoksičnosti večkrat kontradiktorni in jih je izredno težko primerjati, saj so informacije o karakterizaciji delcev velikokrat nepopolne, poleg tega pa se raziskave razlikujejo v pogojih izpostavitve delcem, v stabilnosti suspenzije v bioloških medijih in fizikalno-kemijskih lastnostih. Metode za ocenjevanje tveganja zdravja je tako še vedno potrebno standardizirati z

naborom testov genotoksičnosti in citotoksičnosti, ki morajo biti poenoteni in ponovljivi (Magdolenova in sod., 2014).

2.2.1 Mehanizmi genotoksičnosti nanodelcev

Mehanizmi genotoksičnosti še vedno niso dobro raziskani in dandanes še ni povsem jasno, ali se spremembe na DNK v resnici pojavijo zaradi delovanja nanodelcev (Donaldson in sod., 2010; Magdolenova in sod., 2014).

Primarna genotoksičnost se lahko pojavi zaradi direktnega stika nanodelcev z dednim materialom ali pa preko posrednih poškodb zaradi oksidativnega stresa preko reaktivnih kisikovih spojin (ROS – angl. *Reactive Oxygen Species*), ki ga povzročijo nanodelci. Prav tako lahko do posrednih poškodb privedejo ioni, ki se sproščajo pri topnih nanodelcih. Sekundarno genotoksičnost pa lahko izzove vnetni odziv organizma, pri katerem se sproščajo ROS, ki lahko poškodujejo DNK (Magdolenova in sod., 2014; Stone in sod., 2009)

Direktni primarni vpliv nastane, ko nanodelci vstopijo v celično jedro. To lahko storijo delci, ki imajo premer manjši od 8 nm, delci s premerom od 15 – 60 nm pa lahko pridejo v jedro med procesom mitoze, ko jedrni ovoj razpade. Nanodelci v jedru se lahko vežejo z DNK molekulami ali s proteini v jedru in vplivajo na podvajanje ali transkripcijo. Med samo mitozo se lahko povežejo s kromosomi in kemijsko ali mehansko povzročijo motnje mitoze, kar lahko privede do nastanka mikrojeder (Magdolenova in sod., 2014).

Tudi večji delci, ki ne morejo prodreti v jedro, lahko sprožijo nastanek poškodb na DNK (Donaldson in sod., 2010). Posredno primarno genotoksičnost lahko povzročijo nanodelci tako, da: a) interagirajo z jedrnimi proteini, ki so vključeni v podvojevanje, transkripcijo in popravljalne mehanizme, b) interagirajo z delitvenim vretenom, centrosoli ali proteini, ki so vključeni pri mitozi (npr. motnje pri polimerizaciji tubulina)(Gonzales in sod., 2010), c) povzročijo motnje kritičnih točk celičnega cikla, ki lahko privedejo do nastanka večjedrnih celic, č) nastanejo ROS, ki povzročijo prelome vijačnice, kar lahko vodi v napačno parjenje baz in napačno podvojevanje, ki je potencialno lahko kancerogeno), d) ioni topnih nanodelcev lahko povzročijo nastanek ROS po poti Fentonove reakcije, e) nastanejo ROS, ki lahko poškodujejo celične komponente (npr. mitohondrije), f) inhibirajo obrambo z antioksidanti (npr. inhibirajo glutation, ki je pomemben celični antioksidant) (Magdolenova in sod., 2014). Indirektna genotoksičnost nanodelcev je običajno posledica oksidativnega stresa, ki je definiran kot porušeno ravnotežje med tvorbo prostih radikalov in intracelularno vsebnostjo antioksidantov (Betteridge, 2000).

Sekundarna genotoksičnost je posledica vnetnega odziva organizma in je pri enoceličnih organizmih ne poznamo. Nanodelci lahko v višjih organizmih sprožijo produkcijo ROS v fagocitih (Magdolenova in sod., 2014).

Poškodbe DNK, ki jih popravljalni mehanizmi ne zaznajo ali ne morejo popraviti, potencialno lahko vodijo v kancerogenost (Magdolenova in sod., 2014).

2.2.2 Testiranje genotoksičnosti nanodelcev

Leta 2014 so Magdolenova in sodelavci objavili pregledni članek, kjer so pregledali 112 člankov, ki opisujejo genotoksičnost nanodelcev (Magdolenova in sod., 2014). Ugotovili so, da je bilo največ raziskav narejenih z metodo kometnega testa (58 *in vitro* in 9 *in vivo*), za testiranje genotoksičnosti pa so uveljavljene tudi nekatere druge metode. Najpogostejše so Ames test, kromosomska aberacija in test mikrojeder. Kometni test bomo podrobneje opisali v naslednjem poglavju.

Ames test temelji na reverzni mutaciji poškodovanega gena za histidin. Bakterije (*Salmonella typhimurium*), ki mutirajo, ponovno dobijo zmožnost rasti na gojišču z minimalno vsebnostjo te aminokisline. Pomanjkljivost te metode je v tem, da so nekateri nanodelci preveliki in ne morejo prodrati v jedro (tudi zaradi tvorbe večjih aglomeratov), nekateri delci pa ne morejo prodrati skozi bakterijske stene. Ames test se je večinoma izkazal za negativnega (Sathya in sod., 2010; Landsiedel in sod., 2009; Magdolenova in sod., 2014).

Kromosomska aberacija je metoda, kjer spremljamo nenavadne spremembe na kromosomih. Celični cikel se ustavi na stopnji metafaze, tik pred celično delitvijo in kromosomi se nato barvajo po Giemsi in opazujejo pod mikroskopom (Sathya in sod., 2010; Magdolenova in sod., 2014).

Test mikrojeder temelji na zaznavanju (običajno preko mikroskopa) mikrojeder, ki se pojavijo v anafazi in so koščki kromosoma, ki ostanejo, ko se le-ta razdeli. Ti delci so izločeni iz jedra in se nahajajo v citoplazmi hčerinske celice. Ta test se uporablja predvsem za ocenjevanje kromosomskih prelomov in okvar popravljalnih mehanizmov, za ugotavljanje izgube kromosomov, nekroze ali apoptoze (Sathya in sod., 2010; Magdolenova in sod., 2014).

Raziskave genotoksičnosti še vedno predstavljajo trd oreh, saj jih je izredno težko primerjati med seboj. Z raziskavami, ki so bile opravljene do sedaj je težko narediti smiselne zaključke, katere karakteristike nanodelcev v resnici povzročajo največ poškodb DNK, saj med

različnimi raziskavami variira preveč različnih dejavnikov (celični tip, različni nanodelci in pogosto premalo podrobno okarakterizirani, različni proizvajalci, različni mediji, različne doze, interakcije z biološkimi sistemi, organskimi spojinami, različna aglomeracija...)(Sathya in sod., 2010; Magdolenova in sod., 2014; Stone in sod., 2009).

2.3 KOMETNI TEST

Kometni test, ki ga lahko imenujemo tudi elektroforeza posameznih celic (SCGE – angl. *Single Cell Gel Electrophoresis*) je preprosta metoda za merjenje poškodb na vijačnici DNK pri evkariontskih organizmih. Posamezne celice vklopimo v agarozni gel (na objektnem stekelcu) in jih liziramo z detergenti in močnimi raztopinami soli, da se formirajo nukleoidi, ki vsebujejo supernavito DNK, ki je pritrjena na jedrni matriks. Ko izvedemo elektroforezo pri visokem pH, kot rezultat analize dobimo strukture, ki spominjajo na komete in le-te opazujemo in merimo z epifluorescentnim mikroskopom. Intenziteta kometnega »repa« v primerjavi s kometno »glavo« nam pove, koliko prelomov je v DNK, saj deli negativno nabite vijačnice, ki se prelomijo, potujejo proti anodi (Collins, 2004).

Najpogosteje uporabljena je alkalna različica kometnega testa, ki jo je razvil Singh s sodelavci (1988). S to različico je mogoče zaznavati enojne prelome vijačnice, ki naj bi bili pogostejši pri delovanju genotoksičnih snovi (Tice in sod., 2000). Leta 1990 je Olive s sodelavci predstavila novo različico alkalne metode, pri kateri je DNK izpostavljena elektroforezi pri pH=12,3 (Olive in sod., 1990). Veljalo naj bi, da se DNK odvije in denaturira pri pH vrednosti nad 12,0 zaradi prekinitve vodikovih vezi v dvojni vijačnici DNK (Tice in sod., 2000).

Za ugotavljanje dvojnih prelomov vijačnice DNK se uporablja metoda nevtralne lize, ki so jo razvili Wojewodzka in sodelavci (2002). Dvojni prelomi vijačnice se sicer pojavljajo redkeje kot enojni, vendar so bolj pomembni, saj so pogosto za celico letalni.

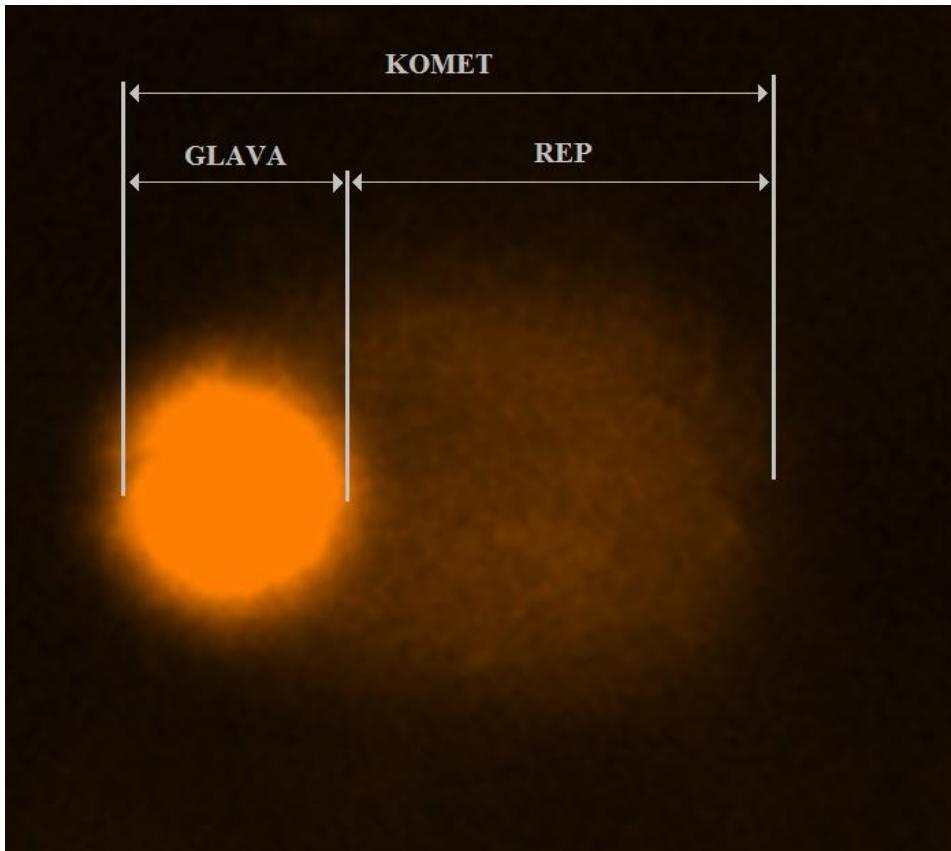
Kometni test ima, tako kot vsaka metoda, svoje prednosti in slabosti. Trenutno pa je najpogosteje uporabljena metoda za ugotavljanje genotoksičnosti nanodelcev (Magdalenova in sod., 2014). Med prednosti lahko prištevamo možnost spremljanja poškodb DNK v posameznih celicah kot tudi pri celotnih populacijah. Dobra stran kometa je tudi hitrost izvedbe (nekaj dni) in preprostost metode, saj je relativno enostavna, ko jo enkrat osvojimo. Ima visoko občutljivost, saj lahko poškodbe DNK zaznamo že pri majhnem številu celic na vzorec in zadostujejo že relativno majhne količine testiranih substanc, da lahko izmerimo učinek. Pri analizi je potrebno zagotoviti visok odstotek viabilnosti, da izključimo možnost

lažno pozitivnih rezultatov zaradi citotoksičnosti. Tudi ekonomičnost metode je pozitivna lastnost (če imamo na voljo epifluorescentni mikroskop in programsko opremo). Med slabosti metode prištevamo možnost lažno pozitivnih rezultatov, bodisi zaradi prevelikega citotoksičnega vpliva testirane snovi (zato je pred izvedbo kometnega testa potrebno izvajati teste viabilnosti, kjer je priporočljiv odstotek živih celic vsaj 80 %), bodisi zaradi interakcij nanodelcev s samo DNK pri nepopolnem spiranju medija (Tice in sod., 2000; Stone in sod., 2009; Magdolenova in sod., 2014; Dhawan in sod., 2009). Do lažno pozitivnih rezultatov lahko pripelje tudi nenadna sprememba v vrednosti pH ali osmolarnosti. To se lahko zgodi zaradi vpliva nanodelcev na celice ali zaradi biološke reakcije testnega organizma na testirano snov (Tice in sod., 2000). S kometnim testom ne moremo zaznati fiksiranih mutacij (Stone in sod., 2009).

Pri izvedbi kometnega testa je potrebno paziti, da tekom postopka ne izzovemo dodatnih poškodb DNK, zato vse postopke izvajamo v temnem prostoru, pri nizkih temperaturah (4 °C) (Henderson in sod., 1998). Pred nanosom celic na agarozne minigele, preverimo viabilnost kulture, ki mora biti minimalno 80 % (Tice in sod., 2000). Za test viabilnosti se priporoča barvanje s tripanskim modrilom in štetje celic z Neubauerjevo števno komoro (Stone in sod., 2009). Nato celice ustrezno redčimo, da dobimo prbl. 140 celic/µL. Tako so posamezne celice v gelu dovolj naranzen, da jih lahko vizualno ocenujemo. Celice vklopimo v agarozni gel in nanesemo na obrušena objektna stekelca, temu pa sledi celična liza z detergenti in tretiranje s soljo. Sledi elektroforeza, kjer se poškodovani fragmenti sproščenega kromatina, ki so negativno nabiti, pomaknejo proti anodi, nepoškodovana DNA pa ostane na mestu. Tako nastanejo strukture, ki spominjajo na komet (slika 1). Po elektroforezi gele obarvamo. Najpogosteje se uporablja etidijev bromid (Tice in sod., 2000; Collins, 2004). Fluorescentno barvilo tako omogoči vizualizacijo kometov z epifluorescentnim mikroskopom. Mikroskop je večinoma povezan s kamero in računalnikom, kjer imamo nameščeno programsko opremo za kvantitativno analizo kometov. Lahko pa jih ocenujemo tudi vizualno, s prostim očesom (Collins, 2004). Poškodbe DNK ovrednotimo na minimalno 50 naključno izbranih celicah na enem minigelu. Poškodbe DNK lahko analiziramo z različnimi parametri kot so npr. dolžina repa, delež DNK v repu in repni moment. Pri večjih poškodbah DNK se dolžina repa ne spreminja, povečuje pa se intenziteta obarvanosti DNK oz. delež DNK v repu (Tail DNA [%]) (Collins, 2004). Repni moment izražamo kot repni moment po Olivu (OTM – angl. *Olive Tail Moment*) (Olive in sod., 1990) in vključuje dolžino repa kot tudi delež DNK v repu. OTM izračunamo po enačbi:

$$\text{OTM} = \text{razdalja med težiščem glave in težiščem repa} \times \text{Tail DNA [\%]} \times 0,01 \quad \dots (1)$$

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



Slika 1: Prikaz kometa z označenimi predeli (Kononenko, 2012)

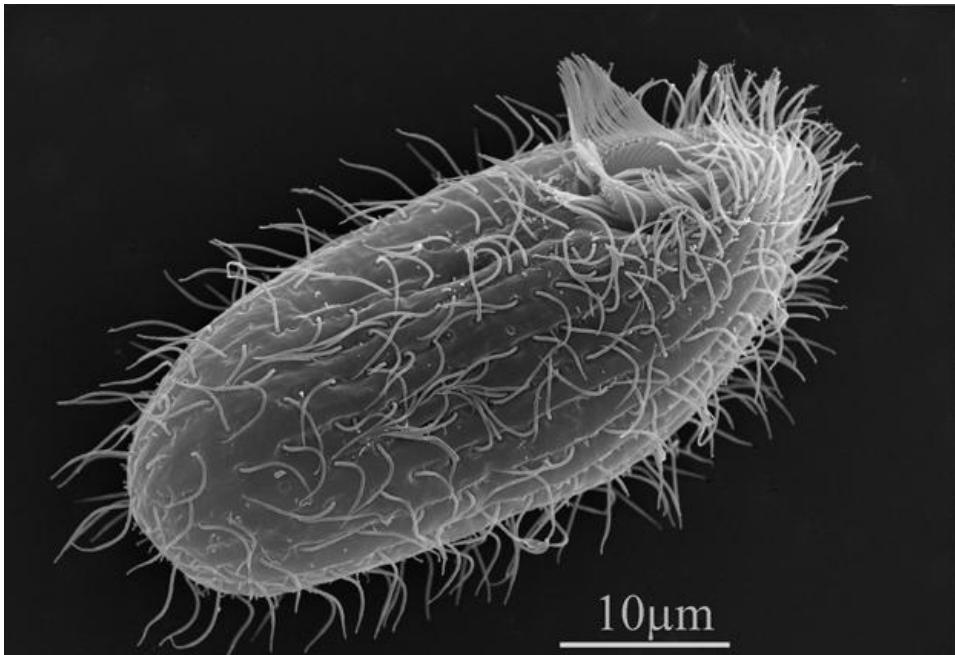
Če celice izpostavimo testnemu vzorcu pred vklapljanjem v gel, govorimo o »*in vivo*« kometnem testu. Pri »*in vitro*« različici pa celice najprej vklopimo v gel in šele potem izpostavimo vzorcu (Osojnik Črnivec, 2006). Ena od različic »*in vitro*« testa, je acelularni kometni test. Pri tej različici preverjamo, ali potencialno genotoksična snov vpliva na DNK neposredno. Celice pri tej različici najprej vklopimo v agarozni gel na objektna stekelca, nato jih liziramo in speremo, tako da na minigelih ostane samo DNK, ki jo izpostavimo testirani snovi v odsotnosti celičnih metabolnih aktivnosti (Tice in sod., 2000).

V zadnjih letih se je kometni test razvil v enega izmed ključnih orodij za proučevanje vplivov različnih dejavnikov na DNK. Uporablja se tako v nanotoksikoloških študijah, kot pri človeškem in okoljskem biomonitoringu (Tice in sod., 2000; Dhawan in sod., 2009). Vsekakor pa mora kometni test prestati še poenotenje v mnogih laboratorijih ter mednarodne ocene primernosti in zanesljivosti testa, da bi ga lahko vključili v nabor testov za ugotavljanje genotoksičnosti in citotoksičnosti nanodelcev (Tice in sod., 2000; Magdolenova in sod., 2014). Priporočeno je, da se za bolj zanesljive metode genotoksičnosti uporabi vsaj dva ali več testov

genotoksičnosti hkrati (Landsiedel in sod., 2009; Stone in sod., 2009).

2.4 POSKUSNI ORGANIZEM - *Tetrahymena thermophila*

Tetrahymena thermophila je sladkovodna vrsta mitetalkarjev, ki se umešča v razred Oligohymenophorea, podrazred Hymenostomia, red Hymenostomida, podred Tetrahymenina (Corlis, 1984; Corlis 1994). Laboratorijsko ta enocelični organizem že več let služi kot modelni evkariontski organizem v številnih molekulerno-bioloških in toksikoloških študijah. Številne raziskave so pokazale, da je zanesljiv model za oceno toksičnih snovi. Ima zelo dobro okarakteriziran genom in se uporablja kot modelni organizem za ocenjevanje poškodb DNK (Lah in sod., 2004b; Dhawan in sod., 2009). Leta 2006 so sekvencirali celoten genom *T. thermophila*, ki se nahaja v bazi podatkov (angl. *Tetrahymena genome database*) (Stover in sod., 2005).



Slika 2: Slika praživali *Tetrahymena thermophila* (Subramanian, 2009)

Slika je bila posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM), dobro pa je vidna struktura celičnih ustec ter mitetalke iz mikrtubulov, ki prekrivajo celotno celico.

T. thermophila je evkariontski enocelični organizem z osnovnimi strukturami živalske celice. Spada med manjše predstavnike mitetalkarjev ($20 - 50 \mu\text{m}$). Vsebuje diploidno mikrojedro in makrojedro, ki ga sestavlja več kopij preurejenega genoma. Citoplazemski del celice vključuje endoplazmatske strukture, značilne za vse mitetalkarje. Izjema so le hipertrofija prehranskih

vakuol in prisotnost osmoregularnega sistema in kontraktilnih vakuol, ki uravnavajo ionsko ravnovesje. Tipične lastnosti, značilne za celično površino vrste *Tetrahymena* so: a) zaplenjen ustni aparat (celična usteca), sestavljen iz štirih mitogentalskih gub, ki so nameščene bližje sprednjemu delu celice (od tu izvira tudi ime *Tetrahymena*, kar pomeni štirikožna), b) podaljšan celični anus ali citoprokt, ki je na zadnjem delu celice, c) dve pori kontraktilnih vakuol v zadnjem delu celice (Lah, 2001).

Tetrahymena se pojavlja kot modelni organizem v mnogih toksikoloških študijah zaradi svojih pozitivnih lastnosti: a) je evkariontski organizem, ki ima bolj primeren genom za študije genotoksičnosti kot prokarioti, saj je bolj podoben človeškemu, b) ima kratek generacijski čas, kar pomeni, da pri optimalnih pogojih rasti sodi med najhitreje razmnožujoče se organizme, c) mogoče jih je gojiti v natančno definiranem gojišču, ki je ekonomsko ugodno, v čisti kulturi č) celice so relativno velike in je na njih mogoče izvajati natančne morfološke študije (Lah, 2001).

Poleg zgoraj naštetih lastnosti *Tetrahymena* ustrezata konceptu 3R (angl. *Replacement, Reduction, Refinement* = zamenjava, redukcija, plemenitenje). To je koncept, ki predstavlja alternativo testiranju na živalih, še posebej vretenčarjih. Pomeni pa zamenjavo metod na testnih živalih s tistimi, ki ne vsebujejo živali, ampak nižje organizme (praživali, bakterije, glive, rastline), če je s takšnimi metodami možno doseči enake cilje študij. Redukcija se nanaša na zmanjšanje števila testnih živali, če s tem lahko zagotovimo enak nivo pridobljenih informacij. Plemenitenje pa se nanaša na metode, ki zminimalizirajo potencialne bolečine, trpljenje in stres poskusnih živali (Russel in Burch, 1959).

2.4.1 Fagocitoza

T. thermophila ima posebno strukturo za prehranjevanje, ki ji rečemo celična usteca, ki je specializirana za »prehranjevanje« z delci (od manj kot 100 nm do 100.000 nm), zaradi tega predvidevajo, da naj bi bila dober modelni organizem za nanotoksikologijo (Kahru in sod., 2008). Usteca so sestavljena iz prilagojenih, sprijetih mitogentalk, ki so kot valovita membrana. Na levi strani ustne odprtine so tri majhne mitogentalki, ki se upogibajo v smeri urinega kazalca proti ustom. Koordinirano gibanje teh mitogentalk potiska delce hrane v ustno odprtino. Ko hrana doseže citosom, se le-ta zapre in membrana obda delček hrane. Tako nastane vakuola s hrano, ki se odcepi in se premakne v celico. Takšen tip tvorbe vakuol imenujemo fagocitoza in je prisotna pri mnogih enoceličnih organizmih. Vakuola s hrano se združi z lizosomom, v katerem so prisotni encimi in tako pride do presnove zaužite hrane. Kar celica ne more presnavljati pa izloči skozi citoprokt. Presnova od zaužite hrane do ekskrecije naj bi trajala od

20 minut do 2 uri (Phagocytosis in *Tetrahymena thermophila*..., 2004).

2.4.2 *Tetrahymena thermophila* kot testni organizem v nanotoksikologiji

Wiesner in sod. (2006) so v članku zapisali: »Mikrobna ekotoksikologija je zelo pomembna, še posebej pri pojasnjevanju mehanizmov citotoksičnosti, ki jih lahko približamo tudi evkariontskim celicam. Poleg tega so mikroorganizmi temelj vseh poznanih ekosistemov, ki služijo kot osnova vseh prehranjevalnih verig, so primarna sredstva za vse globalne biokemijske cikle in so pomembne komponente zdravih tal. Mikroorganizmi bi lahko služili kot potencialni posredniki pretvorb nanodelcev, ki bi lahko vplivali na njihovo mobilnost in (eko)toksikologijo« (Wiesner in sod., 2006).

Ker je *Tetrahymena* organizem, ki je v velikem številu prisoten tudi v naravi, predvsem v vodnem okolju, kamor se na koncu svoje poti izliva tudi večina inženirsko proizvedenih nanodelcev, nam lahko služi tudi kot modelni organizem za ekotoksikologijo voda, v katerih so prisotni nanodelci, kar je v skladu z zapisom Wiesnerja in sodelavcev (2006).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 KEMIKALIJE IN TESTNI ORGANIZEM

Reagenti so bili kupljeni pri Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, ZDA), Merck (Darmstadt, Nemčija) ali Biolife (Milan, Italija). Če je bilo karkoli kupljeno drugje, bo to v nadaljevanju posebej navedeno.

3.1.1 Gojenje poskusnega organizma *T. thermophyla*

Za poskusni organizem smo uporabili čisto kulturo praživali *Tetrahymena thermophila* iz Protoxkit F™ (MicroBioTests Inc., Belgija). Praživali so kupljene v dormantni obliki in jih oživimo tako, da jih prenesemo v bogato tekoče gojišče. Z 1 mL izhodne kulture smo (v laminarju, pri sterilnih pogojih) inokulirali 50 mL "bogatega gojišča" (v nadaljevanju BG) v 300 mL serumsko stekleničko, pokrito z zamaškom iz staničevine. Gojili smo jih 24 ur, v temi, pri 25 °C.

Preglednica 1: Sestava "bogatega gojišča" (BG) (Schultz, 1997)

Komponenta gojišča	Količina
Bakteriološki pepton	5 g
D-glukoza	5 g
Kvasni ekstrat	1g
Trisma-base	1,2114 g
Kloridi	10 mL
Sulfati	10 mL
2-krat destilirana voda (dd H ₂ O)	do 1000 mL

Preglednica 2: Kloridi za pripravo bogatega gojišča

Komponenta	Količina
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,5 g
CuCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 g
FeCl ₃ x 6H ₂ O	0,0125 g
dd H ₂ O	100 mL

Preglednica 3: Sulfati za pripravo bogatega gojišča

Komponenta	Količina
MgSO ₄ x 7H ₂ O	1 g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) x 6H ₂ O	0,25 g
MnCl ₂ x 6H ₂ O	0,005 g
ZnCl ₂	0,0005 g
dd H ₂ O	100 mL

BG smo umerili pH na vrednost 7,35 z 1M HCl. Gojišče smo po pripravi prelimi v 300 mL serumske stekleničke (v vsako stekleničko 50 mL BG), jih zaprli s staničevino in avtoklavirali 15 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bara.

3.1.2 Pogoji izpostavitve delcem TiO₂

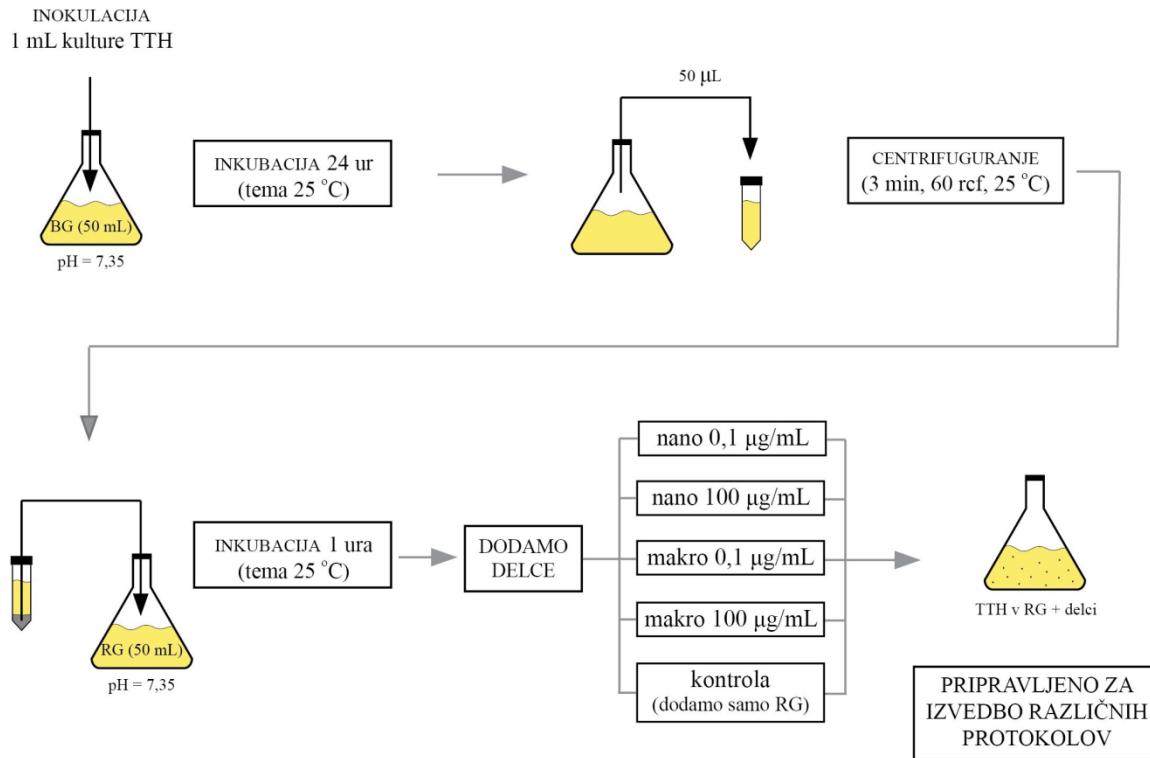
Da bi se izognili interakcijam med delci TiO₂ in proteini v gojišču, smo uporabili t.i. "revno gojišče" (v nadaljevanju besedila RG), ki se od BG razlikuje po tem, da ne vsebuje bakteriološkega peptona in kvasnega ekstrata (Schultz, 1997) (vsa ostala priprava RG je enaka kot za BG).

Celice, ki so bile v BG preko noči, smo z gojiščem vred prelimi v 50 mL centrifugirke in jih 3 minute centrifugirali pri 60 rcf. Nato smo medij odlili, celice resuspendirali v RG in jih pustili v inkubatorju (tema, 25 °C).

Po eni uri smo celice izpostavili nanodelcem in makrodelcem TiO₂ (glej poglavje: 3.1.3 Priprava suspenzij delcev TiO₂). Končne koncentracije delcev v mediju so bile 0,1 in 100 µg/mL. Po dodatku delcev, smo kulture *T. thermophila* inkubirali 4 ure (tema, 25 °C).

Za vsako koncentracijo delcev ter za vsako obliko delcev posebej (nano, makro) smo uporabili tri neodvisna gojišča (biološke ponovitve). Tri gojišča s celicami, vendar brez dodanega TiO₂, so nam služila kot negativna kontrola za vsak postopek posebej (razen pri postopku za kometni test, kjer smo potrebovali 6 gojišč brez TiO₂, saj so nam kasneje 3 služila za pozitivno in 3 za negativno kontrolo).

Po 4 urah izpostavitve delcem TiO₂, smo celice lahko uporabili pri različnih postopkih (t.i. kultura, pripravljena za postopek).



Slika 3: Shematski prikaz priprave celic *Tetrahymena thermophila* ter dodajanja delcev TiO₂

3.1.3 Priprava suspenzij delcev TiO₂

Pred pričetkom dela smo pripravili založne suspenzije nanodelcev in makrodelcev TiO₂. Nanodelci so bili kupljeni pri Sigma-Aldrich kot prah, z 99,7 % čistostjo (anatazni kristalni titanov (IV) oksid, povprečna velikost delcev: 15 nm in površina: 190 do 290 m²/g). Makrodelci pa pri podjetju Merck (titanov (IV) oksid, za analize). Založne suspenzije smo pripravili v RG tako, da so bile koncentracije delcev 0,2 in 200 µg/mL. Založne suspenzije smo sterilizirali z avtoklaviranjem pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,2 bara (15 min). Po avtoklaviranju in vedno, preden smo delce uporabili, smo vse suspenzije sonicirali v ultrazvočni vodni kopeli za 30 min.

3.1.4 Karakterizacija delcev TiO₂

Metodo za karakterizacijo delcev TiO₂, kot smo jo izvedli, je opisala Rajapakse s sod. (2013). Vodne disperzije nanodelcev smo nanesli na ogljikove mrežice, posušili na sobni temperaturi ter jih pregledali s transmisijskim elektronskim mikroskopom (Philips CM 100; Koninklijke Philips Electronics, Eindhoven, Nizozemska), da bi ugotovili, v kakšni obliki se pojavlja TiO₂. Suspenzije nanodelcev v RG (1000 µg/mL) smo karakterizirali z DLS metodo (dinamično sisanje svetlobe), s čimer smo pridobili podatke o hidrodinamskem radiju nanodelcev v suspenziji. Kako veliki so delci v RG, smo ugotavljali s 3D DLS-SLS (dynamic light scattering – static light scattering spectrometer: LS Instruments, Fribourg, Švica).

Zeta potencial nanodelcev v RG (1000 µg/mL) smo merili z ZetaPals (Brookhaven Instrument Corporation, ZDA).

3.2 SPREMLJANJE RASTI IN UGOTAVLJANJE VIABILNOSTI

Rast praživali smo spremljali s tremi neodvisnimi vzorci smo čiste kulture *T. thermophila* v BG, ki smo jih tekom poskusa hranili v temi, pri 25 °C. Merili smo optično gostoto OD₆₅₀ in šteli celice z Neubauerjevo števno komoro (slika 4) s svetlobnim mikroskopom. S števno komoro in svetlobnim mikroskopom smo ugotavljali tudi viabilnost kulture.

V 100 mL BG v serumski steklenički smo inokulirali 1 mL prekonočne kulture praživali. Vzorce za meritve OD₆₅₀ in štetje s svetlobnim mikroskopom smo jemali pri času (ure): 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 24, 25, 27, 29, 31, 33, 48, 49, 51, 53, 55, 72, 120, 146 in 192 (9.dan inkubacije), vzorce za določanje viabilnosti pa pri času (ure): 0, 3, 6, 24, 27, 31, 48, 120, 192.

Optično gostoto smo merili s spektrofotometrom (NovaSpec II, Visible Spectrophotometer) pri valovni dolžini 650 nm. Pred vsako meritvijo OD₆₅₀ smo spektrofotometer umerili s sterilnim BG.

Pri štetju z Neubauerjevo števno komoro smo šteli celice v kvadratkih. Globina špranje med dnom komore in krovnim stekelcem je 0,1 mm. Mreža števne komore je razdeljena na kvadrate. Površina večjega kvadrata je 1/25 mm², površina manjših kvadratov pa je 1/400 mm² (slika 4). Na vgravirano mrežo smo nanesli kapljico vzorca (50 µL vzorca in 50 µL 4 % formaldehida v 0,9 % NaCl, da smo celice usmrtili in jih je bilo mogoče prešteti) in prekrili s krovnim stekelcem. Prešteli smo celice na najmanj petih kvadratih v vzorcu (1/25 mm²) in izračunali povprečno število celic na en kvadrat (0,1 µL).

Za izračun koncentracije celic smo uporabili naslednjo enačbo:

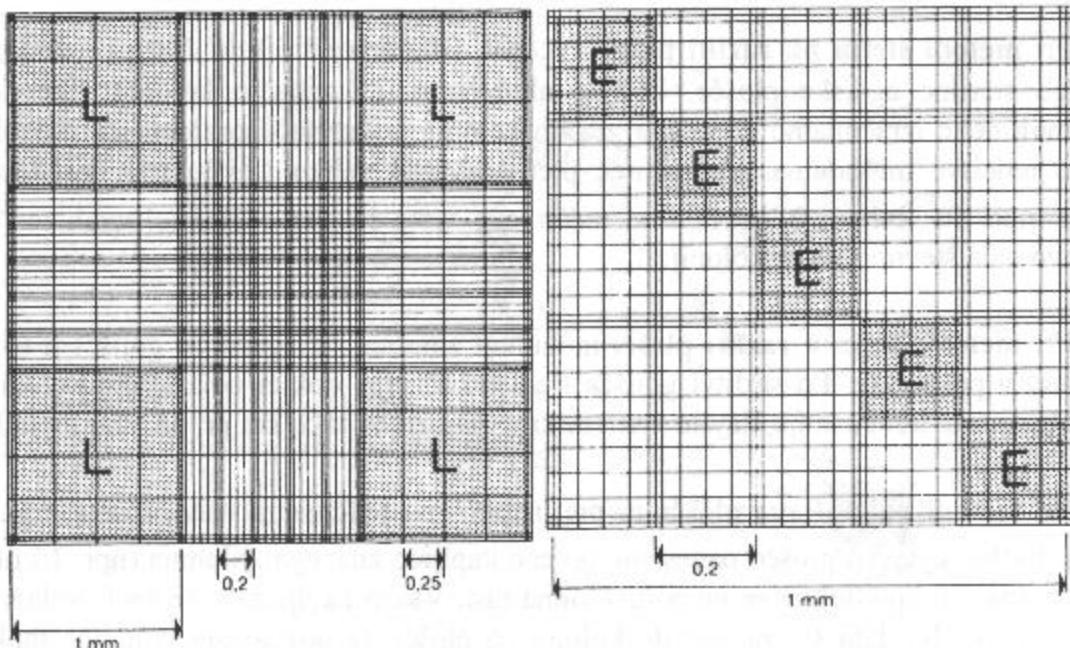
$$\text{Število celic/mL} = X \cdot Y \cdot 25 \cdot 10^4 \quad \dots(2)$$

X... povprečno število celic na en kvadrat

Y... faktor redčitve (v našem primeru 2, saj smo vzorec za polovico redčili s formaldehidom v NaCl)

25... število kvadratov na mm²

10⁴... faktor za preračunavanje na 1 mL vzorca (Stopar in sod., 2005)



Slika 4: Prikaz Neubauerjeve števne komore za štetje celic z mikroskopom (Stopar in sod., 2005: 22)

Za ugotavljanje viabilnosti (odstotek živih celic) smo iz izhodne kulture vzeli 50 μL in dodali 50 μL barvila tripan modro (0,4 % raztopina tripanskega modrila), ki obarva mrtve celice modro (barvilo prodre skozi poškodovano membrano celic). Po petih miutah smo po zgoraj opisanem postopku za štetje z Neubauerjevo števno komoro, prešteli mrtve celice in nato še vse celice in izračunali št. živih celic (razlika med vsemi in mrtvimi) ter viabilnost z naslednjo enačbo:

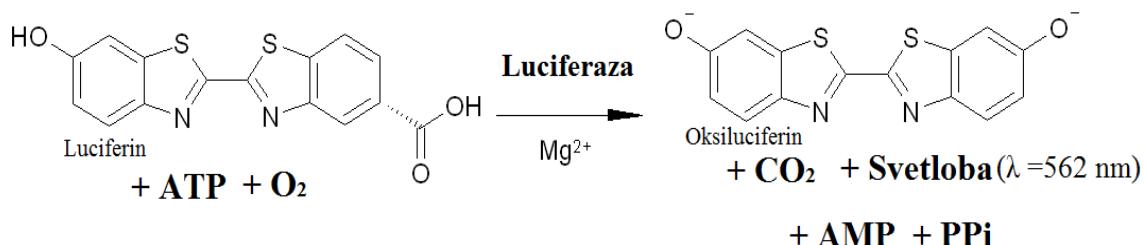
$$\text{Odstotek živih celic [\%]} = X : Y \cdot 100 \quad \dots(3)$$

X... povprečno število živih (neobarvanih) celic na en kvadrat

Y... povprečno število vseh celic na en kvadrat

3.3 ATP-LUCIFERAZNI TEST

Koncentracijo ATP v vzorcih smo merili posredno, s pomočjo luminescentne reakcije oksidacije luciferina (slika 5).



Slika 5: Prikaz reakcije oksidacije luciferina v oksiluciferin (Chen in Cushion, 1994)

Za optimalno delovanje luciferaze je potreben pH = 7,75 in temperatura 25 °C.

Postopek merjenja koncentracije ATP je bil izveden po postopku, ki ga je opisal Kononenko (2012) v svojem diplomskem delu (le da smo v našem primeru uporabili kot testni organizem *T. thermophila*, Kononenko pa kvasovke).

Da lahko izmerimo koncentracijo 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 µL ekstrakcijskega pufra, ki smo ga segreli na 100 °C. V segret ekstrakcijski pufer smo dodali 100 µL kulture *T. thermophila* v RG, ki je bila 4 ure izpostavljena testnim snovem (TiO₂ nanodelci, makrodelci in kontrola brez dodanih delcev, (priprava in tretiranje praživali je predstavljeno na sliki 3), 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.

Koncentracijo ATP v kulturi praživali 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.

V kiveto smo odpipetirali $100\ \mu\text{L}$ na sobno temperaturo segretega reagenta ($40\times$ redčeni FL-AAM v FL-AAB) in $100\ \mu\text{L}$ 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 Luminescent Unit*). Meritve smo izvedli v roku 20 sekund po zmešanju vzorca z reagentom, saj s časom reakcije luminescentni signal slablji. Od dobljenih vrednosti RLU smo odšteli vrednost RLU prazne kivete.

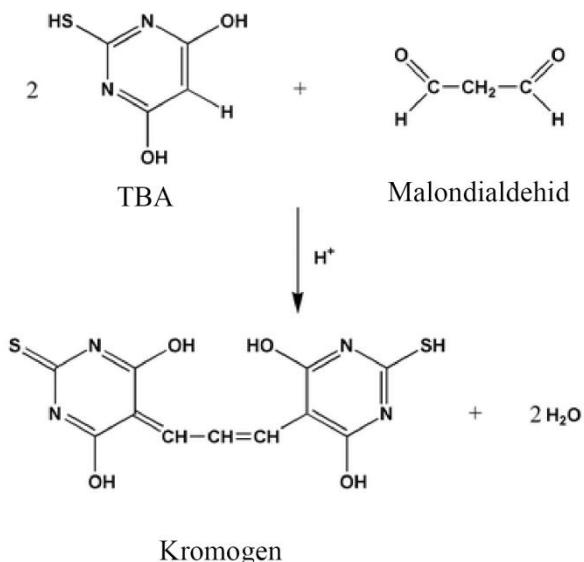
Za izris umeritvene krivulje smo izmerili luminescenco standardnih raztopin ATP s koncentracijami 2×10^{-7} do 2×10^{-12} mol/L. S pomočjo merjenja različnih redčitev standardnih raztopin ATP z znano koncentracijo smo izrisali umeritveno krivuljo, ki nam je omogočila pretvorbo enot RLU v dejansko koncentracijo ATP (Kononenko, 2012).

Koncentracijo ATP smo merili po dodatku delcev pri času (ure): 4 in 24. Ves čas je inkubacija potekala v temi, pri 25°C .

3.4 MERJENJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE

Uporabljeno metodo za ugotavljanje lipidne peroksidacije z določanjem količine malondialdehida (MDA), je opisala Rajapakse (2012, 2013).

Lipidno peroksidacijo smo zaznavali preko nastajanja malondialdehida (MDA). To je stranski produkt lipidne peroksidacije, ki reagira s tiobarbiturno kislino (Ortega-Villasante in sod., 2005).



Slika 6: Prikaz reakcije tiobarbiturne kisline in malondialdehida, ki da obarvan produkt (Antolovich in sod., 2002)

Vzeli smo 15 mL kulture, pripravljene po postopku, opisanem v poglavju 3.1.2 in jo 10 minut centrifugirali pri 6700 rcf ter odlili supernatant. Celice smo sonificirali v vodi z ledom za 3 minute.

Za merjenje celokupne koncentracije proteinov v kulturi, smo vzeli 5 μL vzorca in dodali 995 μL destilirane vode. Vzorec smo še desetkrat redčili in koncentracijo proteinov v vzorcu izmerili spektrofotometrično pri valovni dolžini 280 nm. Celokupna koncentracija proteinov nam je služila kot podatek o celokupni biomasi v eksperimentu.

Za merjenje koncentracije MDA smo vzeli 500 µL homogeniziranega vzorca in mu dodali 500 mL pufra A (30 % triklorocetna kislina, 0,75 % 2-tiobarbiturna kislina, 0,5 M HCl in 0,02 % butilhidroksitoluen) in vzorec inkubirali na 90 °C pol ure in nato ohladili na ledu. Ohlajenemu vzorcu smo dodali 1,5 mL n-butanola in centrifugirali (10 min, 4 °C, 6700 rcf). Absorbanco nastalega kromofora smo izmerili pri valovni dolžini 535 nm in 600 nm (le-to odštejemo, da popravimo napake, ki nastanejo zaradi nespecifične motnosti).

Koncentracijo MDA smo izračunali z ekstinkcijskim koeficientom $156 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ortega-Villasante in sod., 2005). Vsako koncentracijo MDA smo delili s celokupno koncentracijo proteinov iz istega vzorca.

3.5 MERJENJE REAKTIVNIH KISIKOVIH SPOJIN (ROS)

Uporabljeno metodo za ocenjevanje reaktivnih kisikovih spojin (ROS), je opisala Rajapakse (2013).

Poškodbe zaradi ROS smo ocenjevali z OxiSelect Intracellular ROS Assay Kit™ (Cell Biolabs, ZDA). Merili smo zeleno fluorescenco po postopku, ki so ga opisali Petkovic in sodelavci (2011b). DCFH-DA (2', 7' -diklorodihidrofluorescin diacetat), standardi, H_2O_2 in TiO_2 suspenzije so bili pripravljeni v celičnem gojišču (RG).

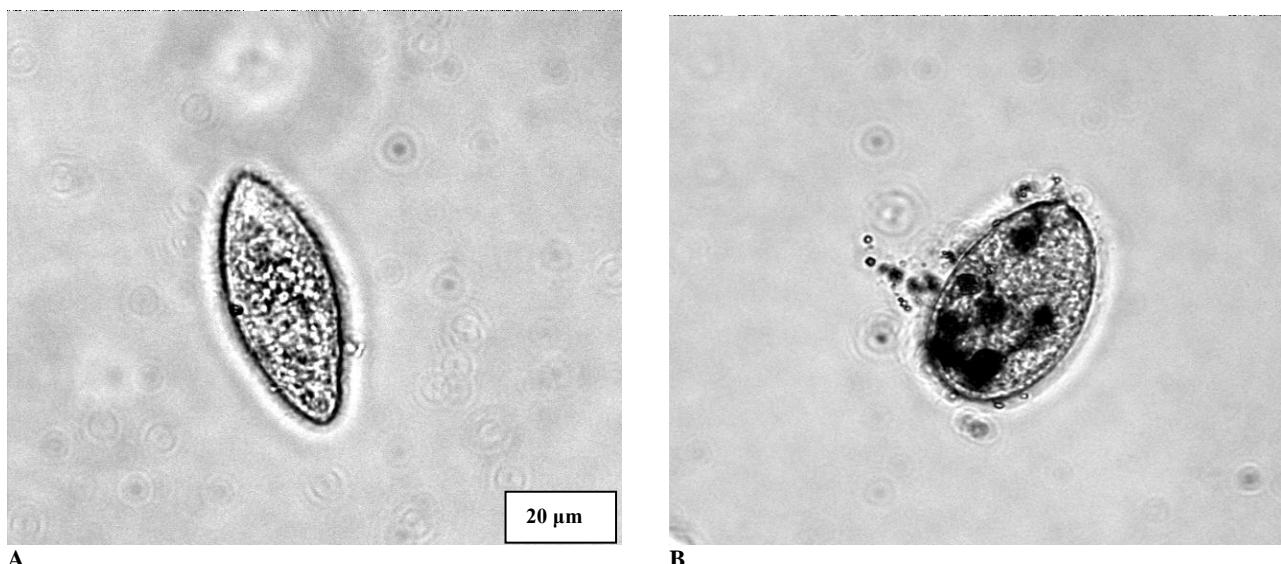
Celice *T. thermophila* (v RG) smo najprej tretirali s 100 μM raztopino DDCHF-DA za 60 minut na 30 °C. Nato smo celice tretirali za 4 ure z 0,1 in 100 $\mu g/mL$ nanodelci TiO_2 , 0,1 in 100 $\mu g/mL$ makrodelci TiO_2 , s H_2O_2 , ki je služil kot pozitivna kontrola in samo z RG, ki je služilo kot negativna kontrola (opis priprave v poglavju 3.1.2).

Vodikov peroksid (H_2O_2) sproži oksidacijo DCFH-DA v DCF (LeBel in sod., 1992), ki smo ga merili z "Synergy H4 hybrid fluorescence plate reader" (BioTek, ZDA).

Za kinetično analizo nastajanja ROS, smo spremljali intenziteto fluorescence (valovne dolžine: 480 nm za vzbujanje in 530 nm emisijska svetloba) zaradi tvorjenja DCF. Vzorce smo inkubirali 4 ure pri 25 °C, fluorescenco pa smo merili prve pol ure vsakih 5 minut, kasneje pa vsakih 30 minut. Za vsako koncentracijo nano- ali makrodelcev, smo izvedli tri biološke ponovitve in dve tehnični ponovitvi.

3.6 OPAZOVANJE POLNJENJA VAKUOL Z DELCI TiO_2

Celice smo pripravili kot je opisano v poglavju 3.1.2 (nano in makro, pri vsaki velikosti delcev smo imeli koncentraciji $0,1 \mu\text{g/mL}$ in $100 \mu\text{g/mL}$). Za negativno kontrolo smo dodali RG. V vsakem vzorcu smo pregledali 100 celic in prešteli, koliko jih vsebuje prebavne vakuole, ki so vsebovale delce (izrazito črno obarvani delci v celicah), kot kaže slika 7.



Slika 7: Celici *T. thermophila* s praznimi in polnimi vakuolami (foto: Dobelšek T.)

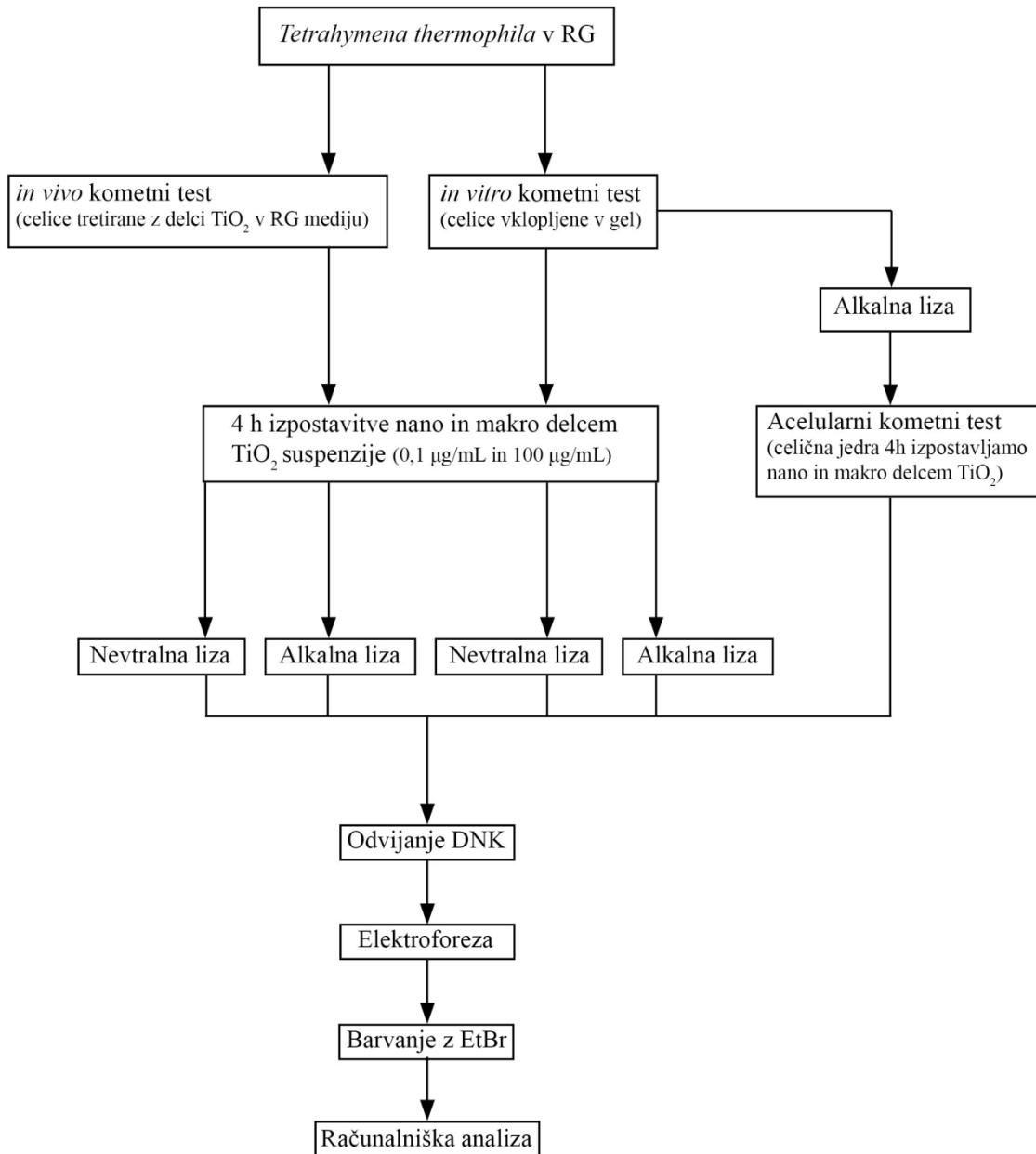
Celici sta fotografirani pod svetlobnim mikroskopom pri povečavi $200\times$. Pri celici A ne opazimo obarvanih vakuol (negativna kontrola), pri celici B pa so obarvane vakuole, polne delcev, zelo dobro opazne.

Obarvane vakuole smo šteli pri času (ure): 1, 4, 24 in 48, ves čas pa celice inkubirali v temi pri 25°C . Delež celic, ki so prevzele delce v prebavne vakuole, smo izrazili v odstotkih.

3.7 IZVAJANJE RAZLIČNIH VARIANT KOMETNEGA TESTA

Vse različice kometnega testa, ki smo jih posebej prilagodili za naš testni organizem, so objavljene v članku Rajapakse in sod. (2013).

Da bi ugotovili, za kakšno vrsto poškodb DNK gre, smo uporabili različne postopke za izvajanje kometnega testa, ki smo jih prilagodili našemu testnemu organizmu (*T. thermophila*). Postopek kometnega testa smo želeli prilagoditi tako, da bi nam omogočil dokazati statistično značilne razlike med negativno in pozitivno kontrolo. Različni postopki za kometni test so prikazani na sliki 8.



Slika 8: Shematski prikaz različnih postopkov, ki smo se jih poslužili za izvajanje kometnega testa

3.7.1 Kemikalije, potrebne za izvedbo kometnega testa

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 uporabljenih agaroze za minigele na obrušenih objektnih stekelcih.

Preglednica 4: Priprava založnih raztopin za izvedbo kometnega testa

Založna raztopina	Priprava
K-Na PBS	80 g NaCl, 2 g KCl, 2 g KH ₂ PO ₄ , dolijemo do 1000 mL dd H ₂ O in umerimo pH na 7,2 do 7,4.
Tris HCl (1M)	121,1 g Trizma base, dolijemo 900 mL dd H ₂ O in umerimo pH na 7,5.
NaOH (1M)	Najprej nalijemo približno 500 mL dd H ₂ O, dodamo 400 g NaOH in sol počasi topimo z mešanjem, dolijemo do 1000 mL dd H ₂ O (če zlijemo vso vodo na sol, lahko pride do burne reakcije).
EDTA (1M)	372,2 g EDTA, dolijemo do 1000 mL dd H ₂ O in umerimo pH na 8 (z dodajanjem NaOH).

Preglednica 5: Priprava delovnih raztopin za izvedbo kometnega testa

Delovna raztopina	Priprava
Delovna raztopina K-Na PBS	100 mL založne raztopine K-Na PBS in 900 mL ohlajene dd H ₂ O.
Delovna raztopina Tris HCl	400 mL založne raztopine Tris HCl in 600 mL ohlajene dd H ₂ O.
Raztopina za alkalno lizo	1,23 g NaOH, 70,1 g NaCl, 1 g N-Lavrilsarkozinat, 0,5 mL Triton X 100, 100 mL 10 % DMSO (dimetil sulfoksid), 900 mL dd H ₂ O; raztopina mora biti vedno sveže pripravljena.
Raztopina za nevtralno lizo	213,6 g NaCl, 37,224 EDTA, 10 mM Tris HCl, 1 g N-Lavrilsarkozinat, 0,5 mL Triton X 100, 100 mL 10 % DMSO, 900 mL dd H ₂ O; raztopina mora biti vedno sveže pripravljena. pH=9
Elektroforetski pufer	6 mL založne raztopine NaOH, 4 mL založne raztopine EDTA, dolijemo 1990 mL dd H ₂ O.
Etidijev bromid (EtBr)	3 mL Delovne raztopine K-Na PBS in 3 µL založne raztopine etidijevega bromida (1 % = 10 mg/mL)

Preglednica 6: Priprava agaroznih gelov (minigelov) za obrušena objektna stekelca

Sloji minigelov	Priprava
1. sloj: 0,5 % NMP agaroha	0,5 g NMP agaroha + 50 mL delovnega K-Na PBS
2. sloj: 0,3 % NMP agaroha	0,3 g NMP agaroha + 50 mL delovnega K-Na PBS
3. sloj: 0,35 % LMP agaroha	0,35 g LMP agaroha + 50 mL delovnega K-Na PBS

Pri vseh postopkih za kometne teste, smo pred nanosom celic na minigele, preverili njihovo viabilnost (enačba (3)) in jih prešteli (izračunali koncentracijo v vzorcu po enačbi (2)). Če je bila viabilnost 90 % ali več, smo nadaljevali s kometnim testom. Koncentracijo celic pa smo potrebovali zato, da smo lahko na meinigele nanesli priporočeno koncentracijo (140 celic/ μL). Za vsako velikost delcev, za vsako koncentracijo delcev ter za pozitivno in negativno kontrolo smo izvedli po tri biološke ponovitve in dve tehnični.

3.7.2 Kometni test z alkalno lizo *in vivo*

Kometne teste z alkalno lizo smo izpeljali tako, da nam je za osnovo služil postopek, ki so ga razvili Lah in sod. (2004b). Spremenili smo ga tako, da smo ga prilagodili testiranju genotoksičnosti suspenzije TiO_2 . Spremenili smo tudi število in sestavo minigelov, inkubacijski čas v raztopini za alkalno lizo, potek elektroforeze in koncentracije EtBr za vizualizacijo kometov.

Kulture praživali smo pripravili za izvajanje postopka, kot je opisano v poglavju Pogoji izpostavitve delcem TiO_2 (nano in makro, pri vsaki velikosti delcev smo imeli koncentraciji 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Tri biološke ponovitve, brez dodane suspenzije delcev, vendar z dodanim RG, smo uporabili za negativno kontrolo, tri pa za pozitivno kontrolo (kasneje dodamo H_2O_2). Po tretiraju z delci, smo celice 5 min centrifugirali na 60 rcf. Supernatant smo odlili, celice zavili v aluminijasto folijo in jih pustili na ledu.

Pripravili smo prvi sloj agaroznih minigelov na obrušenih stekelcih (400 μL 0,5 % NMP agaroha smo nanesli na stekelce, prekrili z gladkim objektnim stekelcem in pustili na hladnem, da se agaroha strdi, nato smo zgornje stekelce previdno odstranili in dobili minigel, pripravljen za nanos drugega sloja).

Celice na ledu smo odnesli v poseben prostor za izvajanje kometnih testov. V tem prostoru so posebna navodila, kam se lahko odlagajo kemikalije, kdaj se uporablja UV luč, kako se pere steklovina, kje se uporablja rokavice in kako se uporablja mikroskop in računalnik. Za delo v

kometnem laboratoriju je obvezno predhodno uvajanje zaradi zagotavljanja varnosti tistih, ki v prostoru delajo.

Na minigele smo v kometnem laboratoriju nanesli drugi sloj ($500 \mu\text{L}$ 0,3 % NMP), postavili smo jih na led in pustili 20 minut, da so se strdili. V tretji sloj agaroze (0,35 % LMP) smo vmešali ustrezен volumen celic in jih nanesli na minigele ($500 \mu\text{L}$), pokrili z gladkim objektnim stekelcem in pustili 20 minut na ledu v temi. Ko se je agariza strdila, smo odstranili zgornje stekelce in minigele za 5 minut namočili v hladen delovni K-Na PBS pufer. Pozitivnim kontrolam pa smo za teh 5 minut primešali $200 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Nato smo vsa stekelca še 2-krat po 10 minut spirali z delovnim K-Na PBS pufrom. Po inkubaciji v pufru, smo le-tega odlili in minigelom dodali raztopino za alkalno lizo ter jih pustili v hladilniku preko noči. Naslednje jutro smo odlili raztopino za alkalno lizo in minigele trikrat spirali po 20 minut v elektroforetskem pufru, da se je jedrna DNK razvila.

3.7.3 Elektroforeza

Stekelca smo po spiranju z elektroforetskim pufrom prestavili v banjico za izvajanje elektroforeze in dolili toliko pufra, da so stekelca popolnoma prekrita. Banjico smo pokrili s pokrovom in aluminijasto folijo, da zagotovimo temo in zagnali elektroforezo (25 V, 300 mA, 20 W, 20 min). Po elektroforezi smo minigele prestavili v posodo z delovnim Tris HCl za 20 minut. Nato smo stekelca do analize z mikroskopom postavili v pokrito posodo, ki je imela na dnu papirnato brisačo, namočeno v delovnim Tris HCl, da se geli niso izsušili.

3.7.4 Analiza kometov z mikroskopom in vrednotenje poškodb jedrne DNK

Za opazovanje kometov z mikroskopom, smo vzorce postopoma jemali iz posode ter vsak vzorec sporti obarvali z etidijevim bromidom in ga pokrili s krovnim stekelcem tik pred ocenjevanjem kometov.

Vizualizacija slike je potekala z epifluorescentnim mikroskopom (Olympus BX50) pri $400\times$ povečavi. Mikroskopske slike smo prenesli na računalnik z digitalno kamero (Hamatsu Orca 2). Poškodbe DNK smo ovrednotili z uporabo računalniškega programa Komet 5.0 Computer Software (Kinetic Imaging Ltd., 2001). Komete (rep in glavo) smo zajemali ročno. Pri posameznem minigelu smo analizirali 60 kometov.

Po analizi slike smo previdno odstranili minigele s stekelc ter vse, kar je bilo v stiku z

etidijevim bromidom, primerno zavrgli v posebno posodo, ki je bila potem še nekaj dni izpostavljena UV svetlobi.

3.7.5 Kometni test z alkalno lizo *in vitro*

Kulture praživali smo pripravili za izvajanje postopka, kot je opisano v poglavju Pogoji izpostavitve delcem TiO₂, vendar le do točke, ko celice inkubiramo 1h v RG, delcev TiO₂ pa še ne dodamo. Pripravili smo prvi in drugi sloj (NMP) agaroznih minigelov na obrušenih stekelcih. V tretji sloj (LMP) minigelov smo nanesli ustrezno redčeno kulturo celic iz RG. Celice, vključene v gel, smo izpostavili TiO₂ suspenzijam (nano in makro, pri vsaki velikosti delcev smo imeli koncentraciji 0,1 µg/mL in 100 µg/mL) za 4 ure, v temi, pri 25 °C. Po izpostavitvi delcem, smo minigele s celicami smo za 5 minut namočili v hladen delovni K-Na PBS pufer. Pozitivnim kontrolam pa smo za teh 5 minut primešali 200 µM H₂O₂. Po inkubaciji v pufru, smo le-tega odlili in minigelom dodali raztopino za alkalno lizo ter jih pustili v hladilniku preko noči. Naslednje jutro smo odlili raztopino za alkalno lizo in minigele trikrat spirali po 20 minut v elektroforetskem pufru. Sledila je elektroforeza.

3.7.6 Acelularni kometni test z alkalno lizo

Izraz »acelularni« smo izbrali, ker v tem postopku delcem ne izpostavimo celotnih celic, ampak najprej izvedemo alkalno lizo, tako da nam ostane samo jedrna DNK, vklopljena v gel. V tem primeru nas zanima, ali je prišlo do poškodbe DNK zaradi neposrednega delovanja delcev.

Kulture praživali smo pripravili za izvajanje postopka, kot je opisano v poglavju Pogoji izpostavitve delcem TiO₂, vendar le do točke, ko celice inkubiramo 1h v RG, delcev TiO₂ pa še ne dodamo. Pripravili smo prvi in drugi sloj (NMP) agaroznih minigelov na obrušenih stekelcih. V tretji sloj (LMP) minigelov smo nanesli ustrezno redčeno kulturo celic iz RG. Minigele s celicami smo za 5 minut namočili v hladen delovni K-Na PBS pufer. Pozitivnim kontrolam pa smo za teh 5 minut primešali 200 µM H₂O₂. Po inkubaciji v pufru, smo le-tega odlili in minigelom dodali raztopino za alkalno lizo ter jih pustili v hladilniku preko noči. Naslednje jutro smo odlili raztopino za alkalno lizo in minigele trikrat spirali po 20 minut v elektroforetskem pufru, nato pa jih izpostavili TiO₂ suspenzijam (nano in makro, pri vsaki velikosti delcev smo imeli koncentraciji 0,1 µg/mL in 100 µg/mL) za 4 ure, v temi, na 25 °C. Po izpostavitvi smo jih ponovno trikrat sprali z elektroforetskim pufrom (vsakič po 5 minut). Sledila je elektroforeza.

3.7.7 Kometni test z nevtralno lizo *in vivo* ter *in vitro*

Pri teh postopkih smo celice pripravili in izpostavili suspenzijam delcev TiO₂ na enak način, kot je opisano v poglavjih »Kometni test z alkalno lizo *in vivo*« in »Kometni test z alkalno lizo *in vitro*«. Za pozitivno kontrolo smo dodali 100µM metil metansulfonat (MMS). Za nevtralno lizo nam je za osnovo služil postopek, ki so ga razvili Wojewodzka in sod. (2002), vendar smo ga nekoliko prilagodili testiranju genotoksičnosti TiO₂ na našem testnem organizmu. Ko smo pripravili minigele s celicami, smo jih pustili eno uro v hladilniku na 4 °C s pufrom za nevtralno lizo. Po lizi smo minigele sprali z elektroforetskim pufrom in jih nato še eno uro pustili v raztopini elektroforetskega pufra v hladilniku. Sledila je elektroforeza.

3.7.8 Statistična analiza rezultatov kometnega testa

Statistično analizo rezultatov je izvedla doc. dr. Damijana Kastelec, metoda in rezultati pa so objavljeni v članku Rajapakse in sod. (2013).

Na podlagi porazdelitve izmerjenih vrednosti “repna_DNK” na približno 60 jedrih za vsako ponovitev, za vsa obravnavanja, smo se zaradi prisotnosti osamelcev odločili, da kot reprezentativno vrednost vzamemo mediano. V nadaljevanju smo na medianah “repna_DNK” naredili analizo variance za nepopolen štirifaktorski poskus v poskusni zasnovi slučajne skupine. Prvi faktor »poskus« ima dve ravni: alkalna liza (AL) in nevtralna liza (NL). Drugi faktor »metoda« ima tri ravni pri AL: acelularno (a), gel (gel), gojišče (goj); in samo zadnji dve ravni pri NL. Tretji faktor je »velikost« z dvema ravnema: makro (M) in nano (N). Četrти faktor je »koncentracija« z dvema ravnema: 1 in 2. Predpostavke analize variance so izpolnjene.

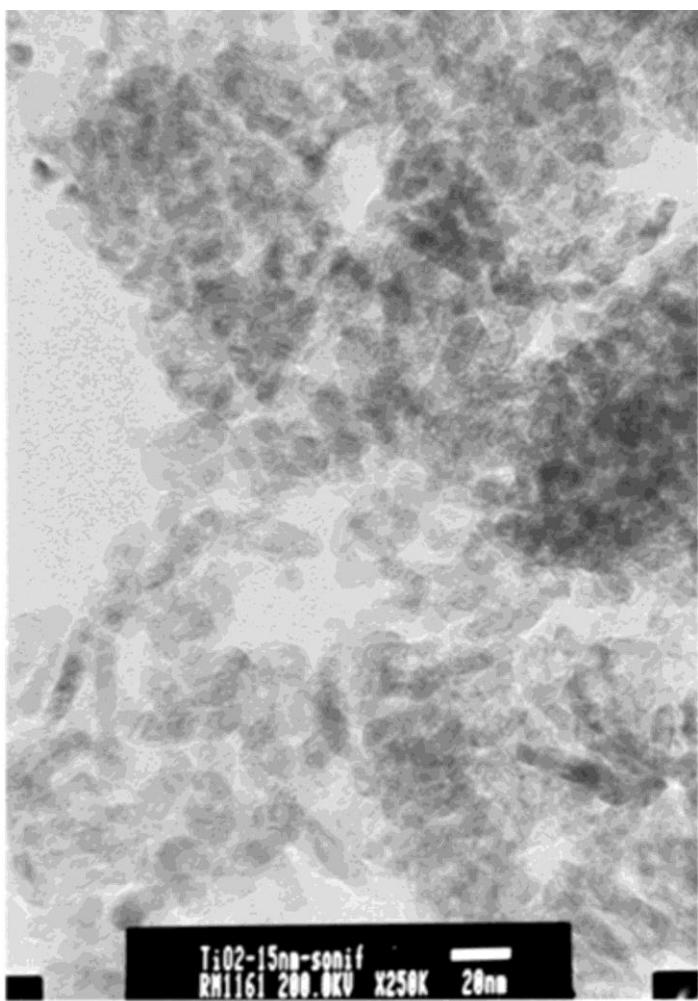
Na podlagi ANOVE vidimo, da so najbolj očitne razlike med postopkoma AL in NL (faktor poskus), statistično značilna je trojna interakcija metoda:velikost:koncentracija in tri dvojne interakcije: poskus:metoda, poskus:koncentracija, metoda:koncentracija. To pomeni, da ne moremo povprečne poškodovanosti DNK v repu primerjati samo po ravneh glavnih dejavnikov (faktorjev), temveč je potrebno narediti mnogotere primerjave po obravnavanjih (22 obravnavanj).

Izbrali smo Duncanov test mnogoterih primerjav za določitev statistično značilnih razlik ($\alpha = 0,05$).

4 REZULTATI

4.1 KARAKTERISTIKE DELCEV TiO₂

S transmisijskim elektronским mikroskopom smo ugotovili, da so bili nanodelci homogene oblike in velikosti. Razmerje med dolžino in premerom je bilo 5:1, tako da so bili delci rahlo podolgovate, anatazne oblike. Nanodelci so bili veliki 15 nm, površina delcev pa naj bi znašala od 190 do 290 m²/g. Slika 9 prikazuje nanodelce TiO₂, posnete s transmisijskim elektronskim mikroskopom.

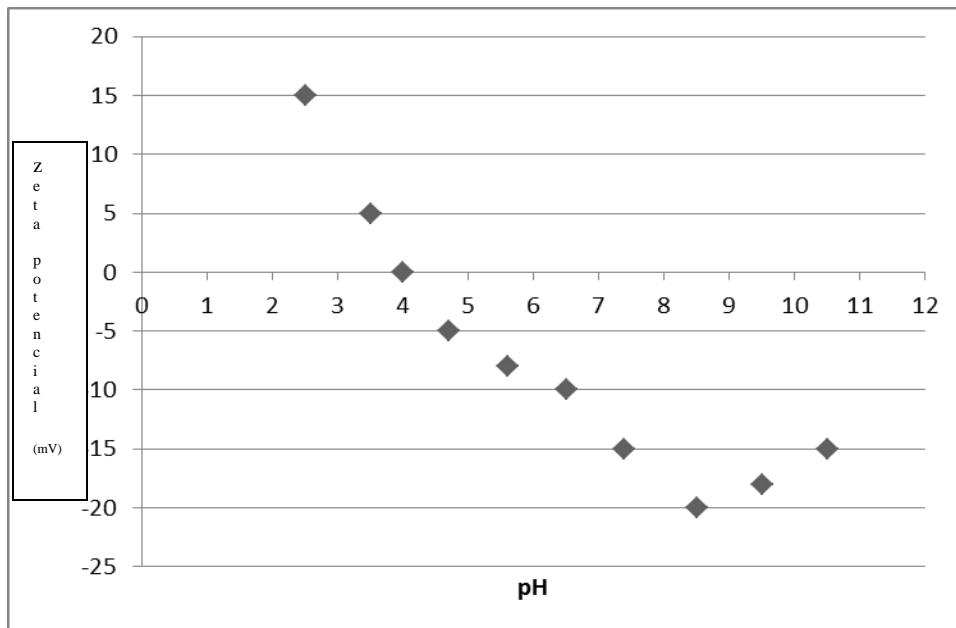


Slika 9: Slika nanodelcev TiO₂ (Novak n sod., 2012)

Slika prikazuje obliko in velikost nanodelcev. Posneta je s transmisijskim elektronskim mikroskopom.

Velikost nanodelcev, ki smo jo izmerili hidrodinamično, ko so bili delci suspendirani v RG (pH=7,4), je bila izmerjena z metodo dinamičnega sipanja svetlobe in je znašala 820 nm. Povprečne velikosti delcev v suspenziji z makrodelci ni bilo mogoče izmeriti zaradi formacije večjih aglomeratov.

Zeta potenciala nanodelcev TiO₂ (1000 µg/mL) smo merili v RG s pH vrednostjo 7,4 in je znašal -15 mV. Grafično je prikazan na sliki 10.

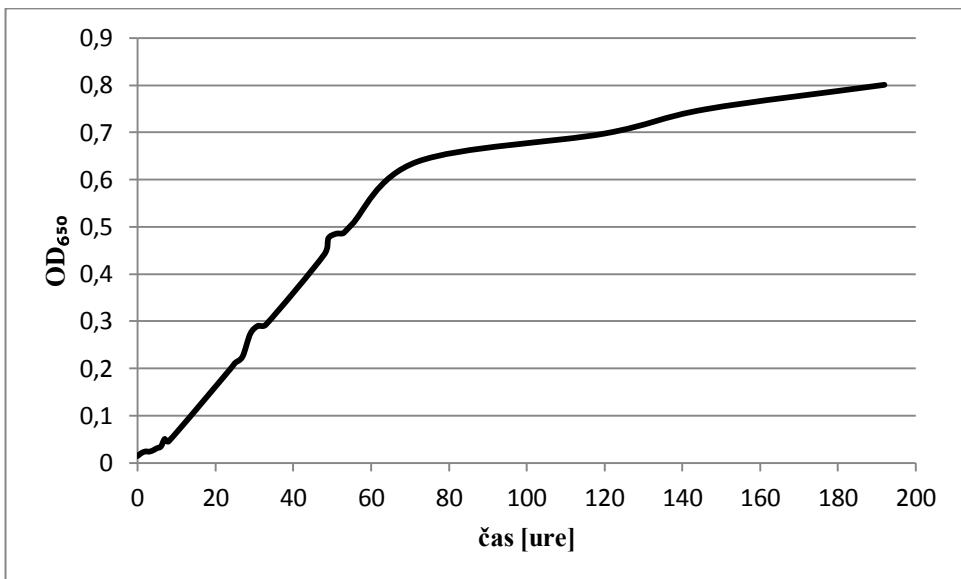


Slika 10: Zeta potencial nanodelcev TiO₂ (1000 µg/mL) glede na pH izmerjen v revnem gojišču

4.2 RASTNA KRIVULJA *Tetrahymena thermophila*

Rastno krivuljo praživali *Tetrahymena thermophila* smo izrisali na podlagi spremeljanja treh neodvisnih kultur, ki so rastle pri enakih pogojih (3 biološke ponovitve). Iz vsake kulture smo vzeli dva vzorca in vsakega posebej izmeri (2 tehnični ponovitvi).

Optična gostota kulture v gojišču je sorazmerna s številom praživali. Rastna krivulja, ki je prikazana na sliki 11 je izrisana na podlagi meritev optične gostote (OD_{650}). Že po nekaj urah kultura preide v logaritemsko fazo rasti, stacionarno fazo pa doseže 3. dan, čeprav se št. celic še vedno nekoliko povišuje. Po devetih dneh gojenja, kultura še vedno ne preide v fazo odmiranja.



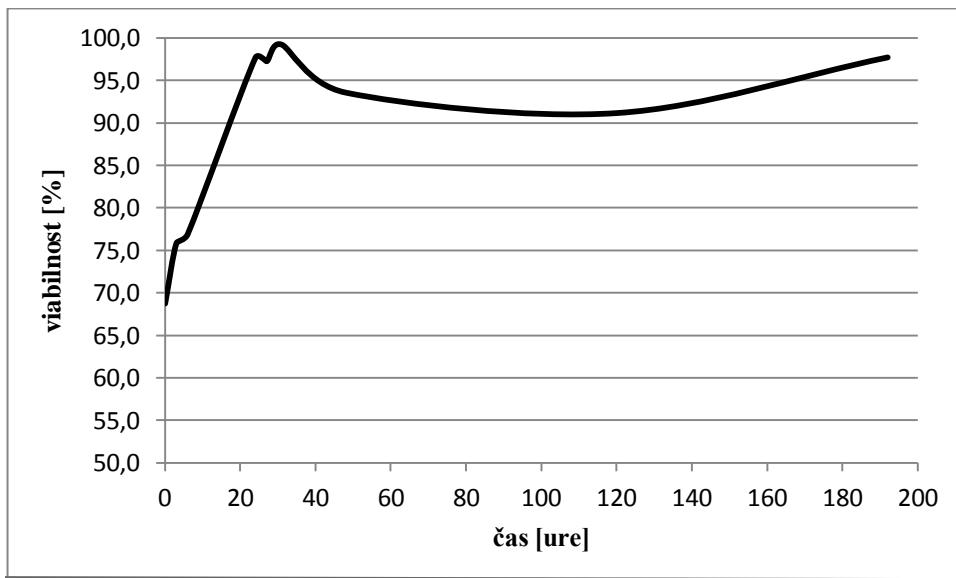
Slika 11: Rastna krivulja praživali *T. thermophila*

Krivulja je nastala na podlagi merjenja OD_{650} v časovnem okvirju devetih dni.

4.3 VIABILNOST *Tetrahymena thermophila*

Kriviljo viabilnosti praživali *T. thermophila* smo izrisali na podlagi spremeljanja treh neodvisnih kultur, ki so rastle pri enakih pogojih (3 biološke ponovitve). Iz vsake kulture smo vzeli dva vzorca in vsakega posebej izmeri (2 tehnični ponovitvi). Viabilnost smo ugotavljali z metodo barvanja s tripanskim modrilom.

Odstotek viabilnosti (slika 12) nam pove, koliko celic v kulturi je živih in aktivnih (ne v dormantni obliki). Na začetku je bila viabilnost nekoliko nižja, vendar je že v prvem dnevu dosegla skoraj 100 %. Odstotek viabilnosti drastično ni upadel niti po devetih dneh gojenja kulture v istem gojišču.



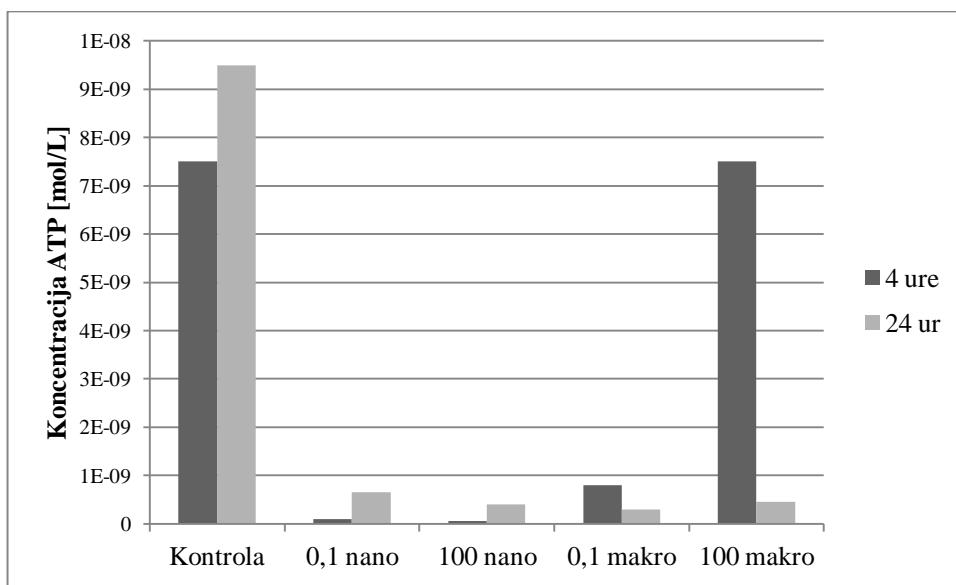
Slika 12: Časovni prikaz viabilnosti praživali *T. thermophila*
Viabilnost je izražena v odstotkih, v časovnem okvirju devetih dni.

4.4 VPLIV IZPOSTAVITVE *Tetrahymena thermophila* NANO- IN MAKRODELCEM TiO₂ NA KONCENTRACIJO ATP V CELICAH

Grafični prikaz koncentracije ATP v celicah *T. thermophila* po izpostavitvah posameznim delcem smo pripravili na podlagi spremeljanja treh neodvisnih kultur, ki so rastle pri enakih pogojih (3 biološke ponovitve). Iz vsake kulture smo vzeli dva vzorca in vsakega posebej izmeri (2 tehnični ponovitvi).

Na sliki 13 je grafični prikaz povprečne koncentracije ATP v kulti *T. thermophila*, ki je bila 4 ure tretirana z delci TiO₂ različnih velikosti in koncentracij. Koncentracijo ATP smo merili po 4 urah izpostavitve delcem in nato še po 24 urah.

Iz grafikona je razvidno, da pri obeh opazovanih časih vrednost koncentracije ATP v prisotnosti TiO₂ močno upade. Le pri dodanih makrodelcih koncentracije 100 µg/mL po 4 urah ne pride do upada koncentracije ATP.



Slika 13: Koncentracija ATP v kulti praživali *T. thermophila* po izpostavitvi različnim koncentracijam in velikostim delcev TiO₂, merjene po 4 in 24 urah

Z oznako nano so označena tretiranja z nanodelci TiO₂, z oznako makro pa tretiranja z makrodelci TiO₂.

4.5 VPLIV IZPOSTAVITVE *Tetrahymena thermophila* NANO- IN MAKRODELCEM TiO₂ NA LIPIDNO PEROKSIDACIJO

Lipidno peroksidacijo praživali *T. thermophila* smo merili pri treh neodvisnih kulturah, ki so rastle pri enakih pogojih (3 biološke ponovitve). Iz vsake kulture smo vzeli dva vzorca in vsakega posebej izmeri (2 tehnični ponovitvi).

Rezultati teh meritev, so bili delno objavljeni v članku, ki so ga napisali Rajapakse in sodelavci (2013).

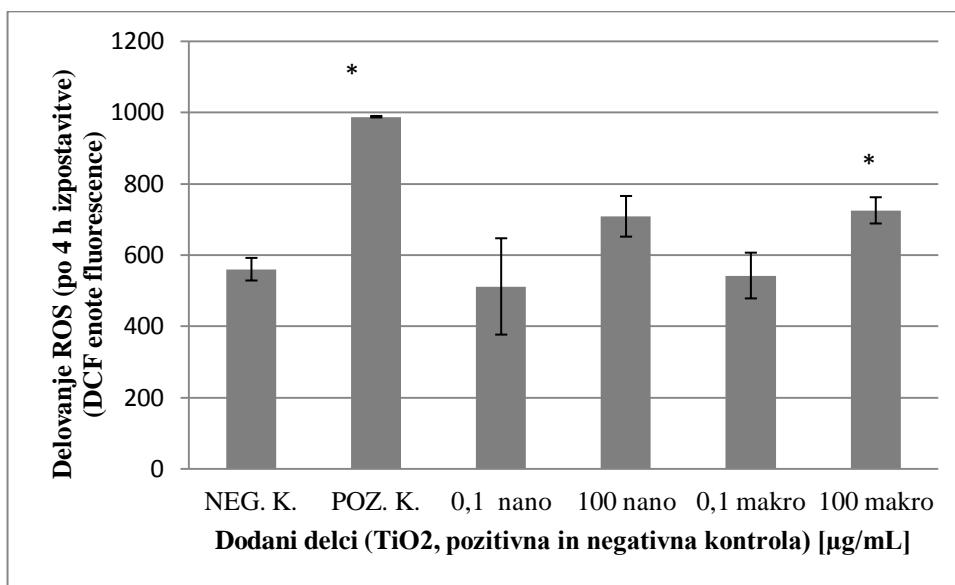
Povprečna vsebnost malondialdehida v kontrolnih vzorcih kulture *T. thermophila* brez dodanih delcev je bila 140 ± 23 nM MDA na mg proteinov. Pri kulturah, ki smo jih izpostavili katerikoli obliki in koncentraciji TiO₂, ni prišlo do povečane lipidne peroksidacije niti po štirih urah inkubacije.

4.6 VPLIV IZPOSTAVITVE *Tetrahymena thermophila* NANO- IN MAKRODELCEM TiO₂ NA PRODUKCIJO REAKTIVNIH KISIKOVIH SPOJIN (ROS)

Delovanje reaktivnih kisikovih spojin na praživali *T. thermophila* smo merili pri treh neodvisnih kulturah, ki so rastle pri enakih pogojih (3 biološke ponovitve). Iz vsake kulture smo vzeli dva vzorca in vsakega posebej izmeri (2 tehnični ponovitvi).

Rezultati meritev, ki smo jih opravili, so bili objavljeni v članku, ki so ga napisali Rajapakse in sodelavci (2013).

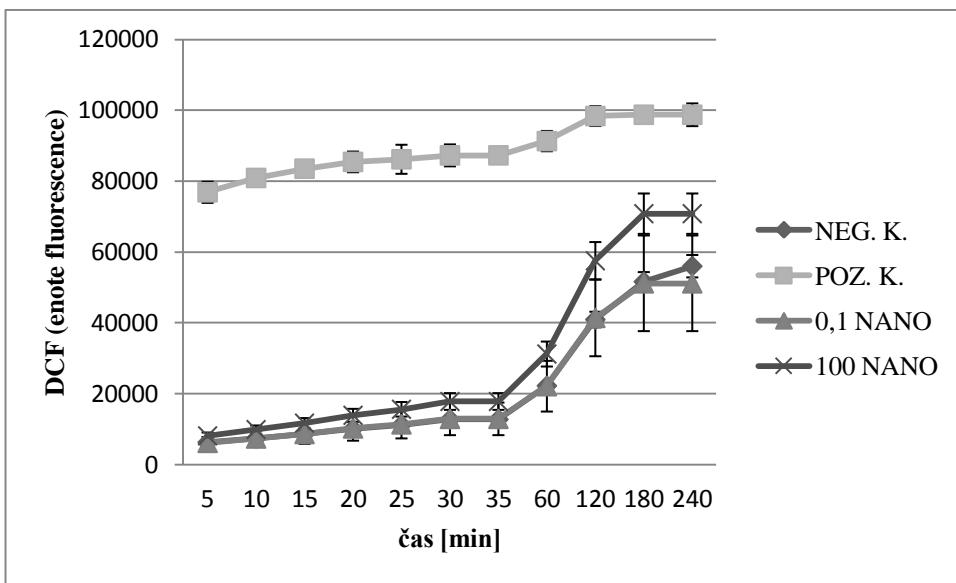
Kot negativna kontrola nam je služilo RG brez dodanih delcev, za pozitivno kontrolo pa smo uporabili vodikov peroksid. Po štirih urah inkubacije z delci TiO₂, pri nižji koncentraciji delcev (0,1 µg/mL) nismo zaznali povečane produkcije ROS. Pri višjih koncentracijah delcev (100 µg/mL) je prišlo do statistično značilne intracelularne produkcije ROS samo pri makrodelcih, pri nanodelcih pa nismo opazili znatne produkcije ROS (slika 14).



Slika 14: Formacija ROS po 4 urah izpostavitve suspenzijam delcev TiO₂

Z oznako nano so označena tretiranja z nanodelci TiO₂, z oznako makro pa tretiranja z makrodelci TiO₂. Do statistično značilne produkcije ROS je prišlo le pri pozitivni kontroli in makrodelcih višje koncentracije. Merjeno v DCF – enotah fluorescence.

Spremljali pa smo tudi kinetiko tvorbe ROS, da bi ugotovili, ali delci TiO₂ povzročijo oksidativni stres že med samo izpostavitvijo celic, ali se poškodbe pokažejo šele po štirih urah. Primerjava kontrol in testnih vzorcev po Studentovem t testu ($p < 0,05$) ni pokazala statistično značilnih sprememb pri tvorbi ROS (Slika 15).



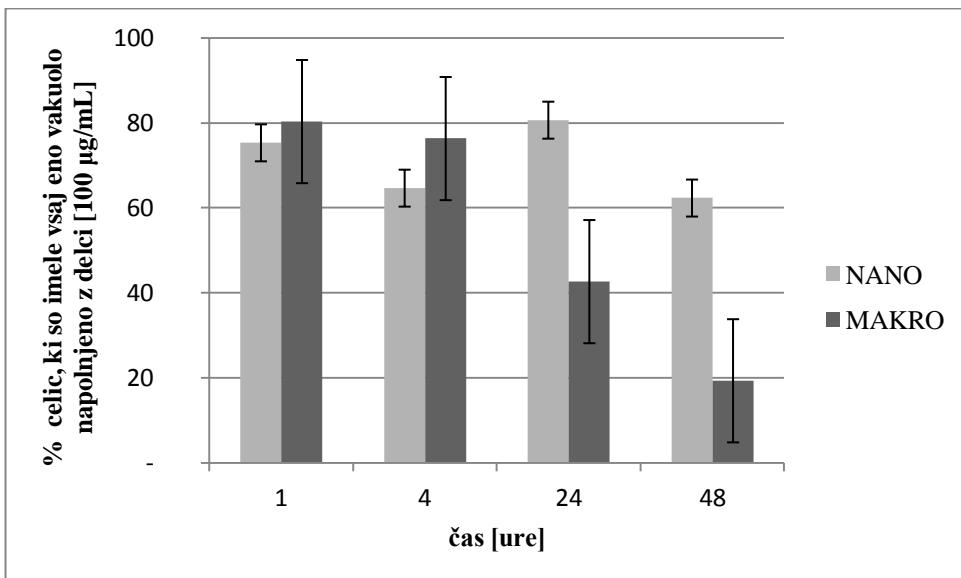
Slika 15: Kinetika nastajanja ROS med štiriurno izpostavitvijo delcem TiO₂

Z oznako nano so označena tretiranja z nanodelci TiO₂. Grafični prikaz nam ne pokaže statistično značilnih razlik med negativno kontrolo in testiranimi vzorci. Merjeno v DCF – enotah fluorescence.

4.7 POLNJENJE VAKUOL *Tetrahymena thermophila* Z DELCI TiO_2

Polnjenje vakuol z delci TiO_2 smo spremljali pri praživali *T. thermophila* pri treh neodvisnih kulturah, ki so rastle pri enakih pogojih (3 biološke ponovitve). Iz vsake kulture smo vzeli dva vzorca in vsakega posebej pregledali (2 tehnični ponovitvi).

Slika 16 prikazuje deleže celic, ki so vsebavale vsaj eno obarvano vakuolo, ki je vsebovala delce. Celice so bile izpostavljene suspenzijam delcev (nano in makro) TiO_2 s koncentracijo 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Pri nižji koncentraciji nismo opazili nobene obarvane vakuole, ki bi kazala aktiven prevzem delcev. Pri višji koncentraciji pa smo v celicah opazili prevzem delcev TiO_2 in njihovo akumulacijo v prebavnih vakuolah.



Slika 16: Deleži celic praživali, ki so imele vsaj eno prebavo vakuolo napolnjeno z delci TiO_2

Koncentracija suspenzij delcev je bila 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, obarvane vakuole pa smo šteli po 1, 4, 24 in 48 urah izpostavitve delcem.

Iz slike 16 je razvidno, da je prvi dan opazovanja večji delež celic v kulti prevzel makrodelce kot nanodelce, naslednja dva dne pa je bil v celicah odstotek makrodelcev precej nižji kot odstotek nanodelcev. Po 48 urah izpostavitve delcem je upadel delež celic, ki so vsebavale delce obeh velikostnih razredov, vendar je upad deleža pri markodelcih večji.

4.8 MORFOLOŠKE SPREMEBE CELIC *Tetrahymena thermophila* PO IZPOSTAVITVI DELCEM TiO₂

Med opazovanjem polnjenja prebavnih vakuol z delci TiO₂ s svetlobnim mikroskopom, smo opazili, da je prišlo pri nekaterih celicah do morfoloških sprememb. Pri manj kot 5 % celic smo opazili, da so počile in da se je njihova vsebina izlila v okolico. Razlitje se je pojavilo na območju celičnih ustec. Nekatere celice so postale bolj okrogle, kot je običajno za *T. thermophila*.



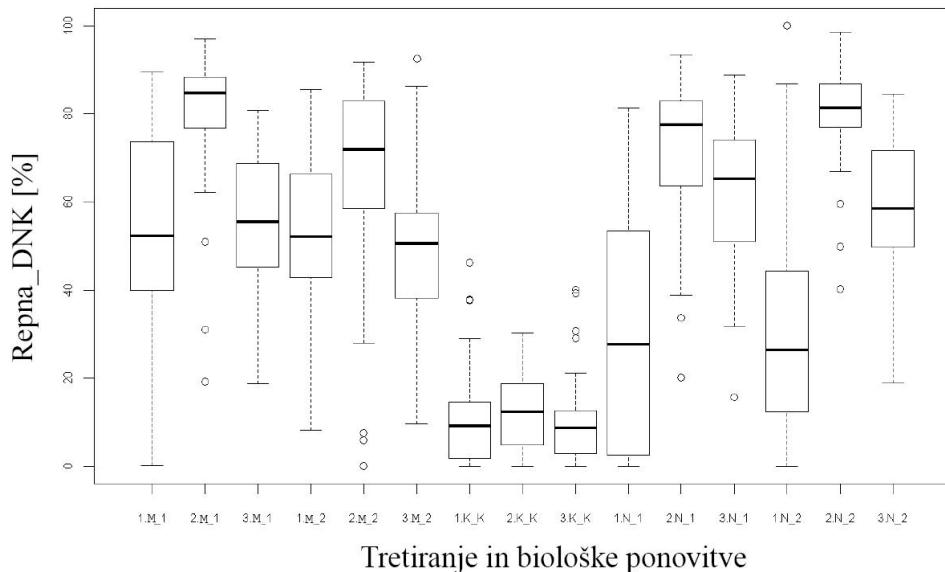
Slika 17: Celica *T. thermophila* z razlito celično vsebino ter spremenjeno morfologijo (foto: Dobelšek T.)
Celica je fotografirana s svetlobnim mikroskopom pri povečavi 200×.

4.9 VPLIV IZPOSTAVITVE *Tetrahymena thermophila* NANO- IN MAKRODELCEM TiO₂ NA REZULTATE RAZLIČNIH VARIANT KOMETNEGA TESTA

Kometni test na praživali *T. thermophila* smo izvedli pri treh neodvisnih kulturah, ki so rastle pri enakih pogojih (3 biološke ponovitve). Iz vsake kulture smo vzeli dva vzorca in vsakega posebej izmeri (2 tehnični ponovitvi). Za vsak vzorec posebej smo analizirali približno 60 posamičnih jeder.

Rezultati meritev, so bili delno objavljeni v članku, ki so ga napisali Rajapakse in sodelavci (2013).

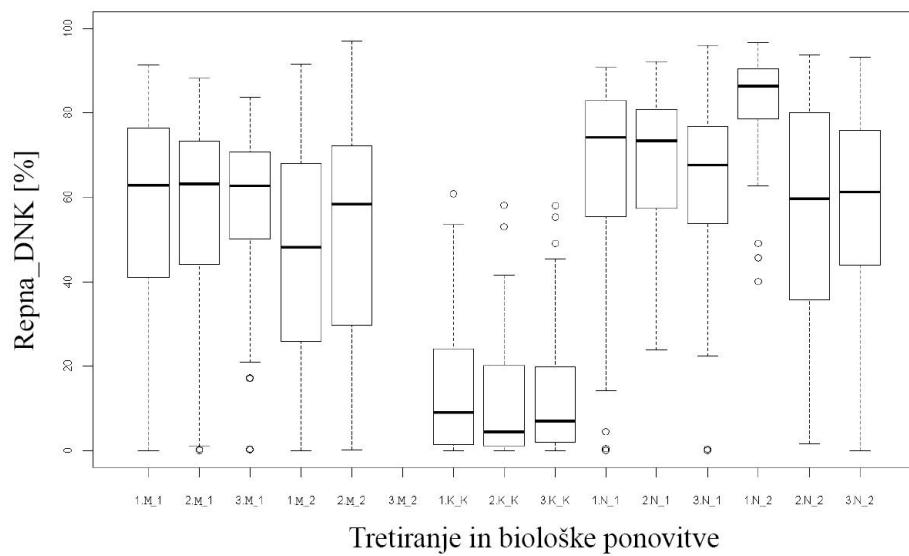
4.9.1 Rezultati kometnega testa z alkalno lizo *in vivo*



Slika 18: Odstotki repne DNK glede na biološko ponovitev, velikost in koncentracijo delcev pri celicah, ki so bile tretirane z delci v gojišču (alkalna liza)

Jedra *T. thermophila* so bila tretirana s suspenzijami nanodelcev (N) in makrodelcev (M) dveh različnih koncentracij (1 = 0,1 µg/mL in 2 = 100 µg/mL)

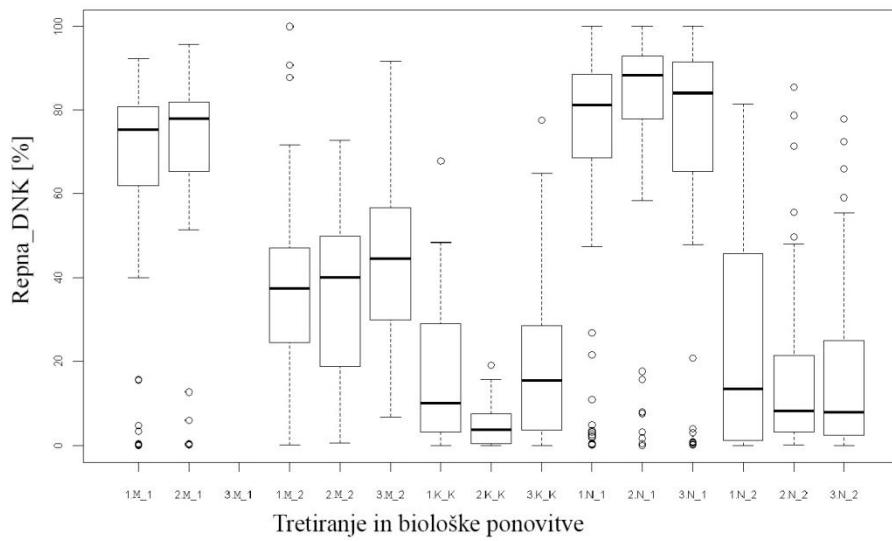
4.9.2 Rezultati kometnega testa z alkalno lizo *in vitro*



Slika 19: Odstotki repne DNK glede na biološko ponovitev, velikost in koncentracijo delcev pri celicah, ki so bile tretirane z delci, ko so bile vklopljene v gel (alkalna liza)

Jedra *T. thermophila* so bila tretirana s suspenzijami nanodelcev (N) in makrodelcev (M) dveh različnih koncentracij (1 = 0,1 µg/mL in 2 = 100 µg/mL)

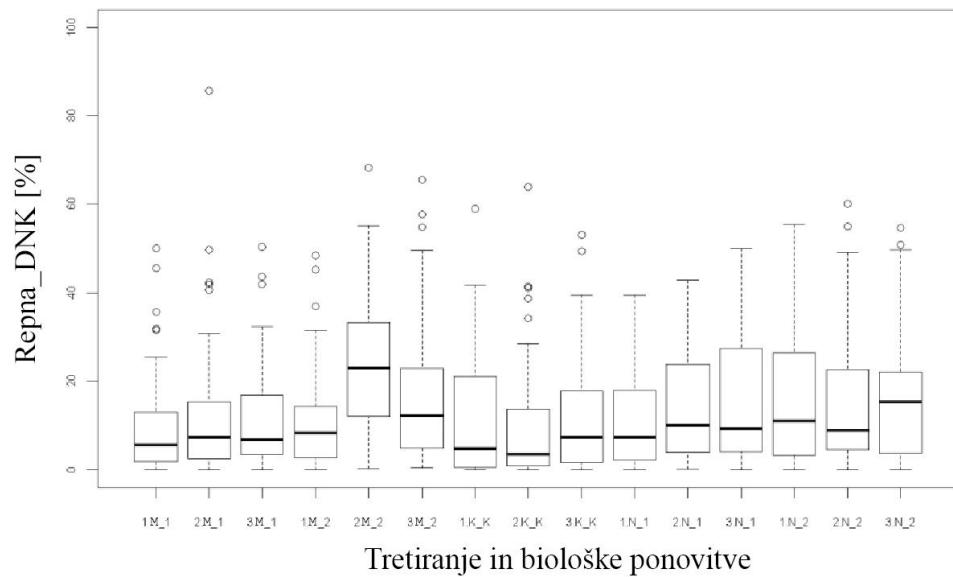
4.9.3 Rezultati acelularnega kometnega testa z alkalno lizo



Slika 20: Odstotki repne DNK glede na biološko ponovitev, velikost in koncentracijo delcev pri acelularnem tretiraju z delci (alkalna liza)

Jedra *T. termophila* so bila tretirana s suspenzijami nanodelcev (N) in makrodelcev (M) dveh različnih koncentracij (1 = 0,1 µg/mL in 2 = 100 µg/mL)

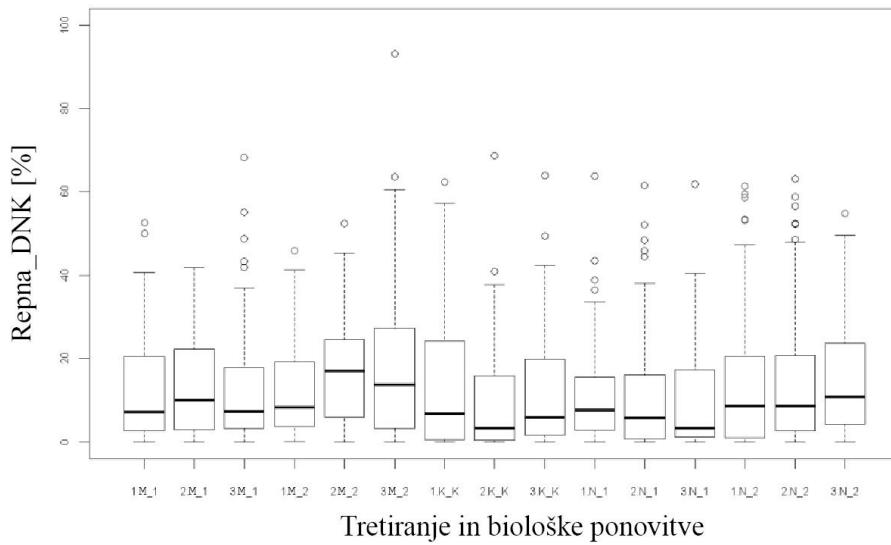
4.9.4 Rezultati kometnega testa z nevtralno lizo *in vivo*



Slika 21: Odstotki repne DNK glede na biološko ponovitev, velikost in koncentracijo delcev pri celicah, ki so bile tretirane z delci v gojišču (nevtralna liza)

Jedra *T. termophila* so bila tretirana s suspenzijami nanodelcev (N) in makrodelcev (M) dveh različnih koncentracij (1 = 0,1 µg/mL in 2 = 100 µg/mL)

4.9.5 Rezultati kometnega testa z nevtralno lizo *in vitro*

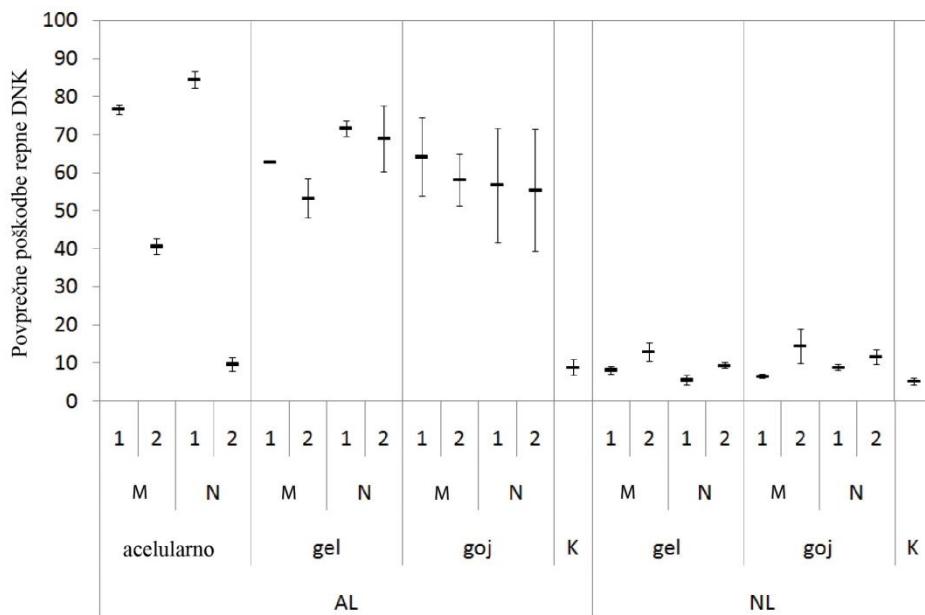


Slika 22: Odstotki repne DNK glede na biološko ponovitev, velikost in koncentracijo delcev pri celicah, ki so bile tretirane z delci, ko so bile vklopljene v gel (nevtralna liza)

Jedra *T. termophila* so bila tretirana s suspenzijami nanodelcev (N) in makrodelcev (M) dveh različnih koncentracij (1 = 0,1 µg/mL in 2 = 100 µg/mL)

4.9.6 Končni rezultat ratličnih variant kometnega testa

Končni rezultati kometnih testov so prikazani na sliki 23. *T. termophila* je bila tretirana s suspenzijami nanodelcev (N) in makrodelcev (M) dveh različnih koncentracij ($1 = 0,1 \mu\text{g/mL}$ in $2 = 100 \mu\text{g/mL}$) v petih različicah kometnega testa (alkalna liza: acelularno, *in vivo* ter *in vitro* in nevtralna liza: *in vivo* ter *in vitro*). Na ordinatni osi grafikona na sliki 23 je prikazan povprečni odstotek DNK, ki se je nahajala v repu kometa, na absicni osi pa način izvajanja kometa, velikost in koncentracijo delcev.



Slika 23: Povprečni odstotek repne DNK za vse izvedene različice kometnega testa, izvedene po različnih postopkih, z različnimi koncentracijami in velikostmi delcev

T. termophila je bila tretirana s suspenzijami nanodelcev (N) in makrodelcev (M) dveh različnih koncentracij ($1 = 0,1 \mu\text{g/mL}$ in $2 = 100 \mu\text{g/mL}$) v petih različicah kometnega testa (alkalna liza (AL): acelularno, *in vivo* (goj) ter *in vitro* (gel) in nevtralna liza (NL): *in vivo* (goj) ter *in vitro* (gel)).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V zadnjih letih je najpogosteje uporbljena metoda z ugotavljanje genotoksičnosti nanodelcev kometni test (Magdalenova in sod., 2014), zato smo se tudi mi odločili, da jo preizkusimo na vodnem mikroorganizmu *Tetrahymena thermophila*. Dobljene rezultate pa smo podprli še z nekaterimi metodami.

Za izvajanje poskusov smo prilagodili medij v katerem smo gojili celice tako, da bi se čim bolj izognili interakcijam medija in delcev TiO₂. Običajno bogato gojišče (Schultz, 1997) smo prilagodili tako, da smo pustili v gojišču le komponente, ki so zagotavljale zadovoljive pogoje za rast. Murdock in sod. so namreč dokazali, da se v gojišču, ki vsebuje veliko organskih molekul, velikost nanodelcev močno poveča in delci še hitreje aglomerirajo, temu pa smo se želeli čim bolj izogniti (Murdock in sod., 2008). Revno gojišče smo oblikovali tako, da ni vsebovalo nobenih proteinskih sestvin.

Nanodelci TiO₂, ki smo jih uporabili so bili okarakterizirani glede na njihovo velikost in obliko. Karlsson (2010) poudarja, da je pomemben podatek pri karakterizaciji tudi obnašanje delcev v vodnem okolju oz. v mediju, kjer gojimo celice (v našem primeru RG), saj marsikateri delci stremijo k tvorjenju večjih aglomeratov, kar smo ugotovili tudi v našem primeru, ko smo uporabili metodo DLS (dinamično sipanje svetlobe). Ravno tako pa smo med samim izvajanjem poskusov opazili aglomerate v gojišču s prostim očesom.

Tudi zeta potencial je priporočljivo določiti za nanodelce, v našem primeru je znašal -15 mV. Pri karakterizaciji smo ugotovili, da smo imeli med poskusom v suspenziji, kjer bi morali biti nanodelci, prisotne tudi delce, ki so bili večji od 100 nm, čeprav je bila povprečna velikost delcev 15 nm. Makrodelci so še posebej močno aglomerirali. K temu pa so pripomogle še celice praživali, ki so pri višjih koncentracijah suspenzij v okolje sprostile večje količine mukusa, ki je dodatno pripomogel k aglomeraciji. Predvidevamo, da je takšen odziv celic obrambne narave za preprečevanje vstopa visokih koncentracij delcev.

Podatke o rastni krivulji praživali smo potrebovali, da smo pravilno sestvili postopek za izvajanje kometnega testa. Da smo lahko določili dolžino tretiranja kulture z delci TiO₂, smo morali določiti, kdaj kultura zapusti lag fazo (fazo prilaganja novemu gojišču) in preide v logaritemsko fazo (faza eksponentne rasti). To se v našem primeru zgodi že po nekaj urah. V eksperimentu za izvajanje kometnega testa, smo dodali delce po prekonočni inkubaciji celic, tako da so celice že prišle v logaritemsko fazo rasti, tretirali pa smo jih 4 ure. Karlsson (2010)

priporoča, da celic ne tretiramo z delci daljše obdobje (npr. 24 -72 ur), saj se v takšem primeru lahko zgodi, da se večina celic že podvoji. Med podvajanjem celic pa bi delci TiO₂ lažje dostopali do DNK, saj jedrni ovoj razpade. Tega pa v našem primeru nismo želeli, saj nas je zanimalo kako na celice vplivajo delci pri kratkoročni izpostavitvi.

Opazili smo, da po devetih dneh gojenja, kultura še vedno ni prešla v fazo odmiranja celic. To lahko pojasnimo z dejstvom, da celice *Tetrahymena thermophila* poznajo kanibalizem in se kultura lahko vzdržuje tako, da se prehranjuje z odmrlimi celicami. Kanibalizem smo opazili tudi v našem primeru, ko smo celice opazovali s svetlobnim mikroskopom.

Na začetku je bila viabilnost nekoliko nižja, vendar je že v prvem dnevu dosegla skoraj 100 %. Odstotek viabilnosti drastično ni upadel niti po devetih dneh gojenja kulture v istem gojišču. Pri merjenju viabilnosti smo tako ugotovili, da imamo opravka s kulturo, ki raste dobro in ni izpostavljena večjemu stresu, saj smo imeli odstotek viabilnosti ves čas nad 90 %. To pa je bil za nas zelo pomemben podatek, saj smo za izvajanje kometnega testa potrebovali visok odstotek viabilnosti. Test viabilnosti smo tako izvedli vedno pred začetkom izvajanja kometnega testa in če je bil odstotek živih celic manjši od 90 %, poskusa nismo izvedli. S tem smo zagotovili, da na samih mikrogelih ni bilo veliko mrtvih celic iz izhodne kulture, ki bi nam lahko prikazale bolj poškodovano DNK kot je bila v primeru višjega odstotka živih celic. Sicer pa se v literaturi priporoča odstotek viabilnosti vsaj 80 % ali več (Tice in sod., 2000).

Iz slike 13, ki prikazuje koncentracijo ATP v odvisnosti od koncentracij in velikosti delcev, je razvidno, da pri obeh opazovanih časih (po 4 in 24 urah izpostavitve delcem TiO₂) koncentracija ATP v prisotnosti TiO₂ močno upade. Le pri dodanih makrodelcih koncentracije 100 µg/mL po 4 urah ne pride do upada koncentracije ATP. Po 24 urah pa je tudi pri makrodelcih višjih koncentracij opazen močan upad koncentracije ATP. To nakazuje, da je v sami kulturi močno znižana celična aktivnost. Ne moremo pa z gotovostjo trditi, ali je to neposredna posledica delcev TiO₂ v gojišču. Morda je zmanjšana metabolna aktivnost zgolj posledica prilaganja *T. thermophila* na novo okolje (gojišče z delci TiO₂). V našem primeru lahko potrdimo hipotezo, da delci TiO₂ vplivajo na zmanjšano koncentracijo ATP v kulturi, ne moremo pa z gotovostjo trditi, da je vpliv na koncentracijo ATP različen pri različnih velikostih delcev.

V dosedaj objavljenih znanstvenih člankih namigujejo na genotoksičnost TiO₂ kot posledico oksidativnega stresa. To so opazili že pri različnih celičnih tipih kot so npr. pljučne epitelne celice, fibroblasti in mikroglia celice (Johnston in sod., 2009). Reaktivne kisikove spojine naj bi v celicah izzvale vnetni odziv, ki naj bi privедel do genotoksičnosti ali pa same ROS vplivajo na poškodbe DNK (Trouiller in sod., 2009). Ker pa smo imeli v naši študiji opravka z

enoceličnimi organizmi, do vnetnih odzivov ne more priti. Vseeno pa nas je zanimalo, kakšna je stopnja oksidativnega stresa, ki ga povzročijo delci TiO₂ v nano in makro obliki.

Najprej smo opravili test lipidne oksidacije. Pri celicah, ki smo jih izpostavili katerikoli obliki in koncentraciji TiO₂, ni prišlo do nobenih sprememb pri lipidni peroksidaciji v primerjavi s kontrolo niti po štirih urah inkubacije. V naši študiji torej nismo zaznali peroksidne oksidacije.

Pri merjenju ROS po štirih urah inkubacije z delci TiO₂, pri nižji koncentraciji delcev (0,1 µg/mL) nismo zaznali povečane produkcije ROS. Pri višjih koncentracijah delcev (100 µg/mL) je prišlo do statistično značilne intracelularne produkcije ROS samo pri makrodelcih, pri nanodelcih pa nismo opazili znatne produkcije ROS (slika 14). Naši rezultati so tako v nasprotju z vsesplošno uporabljeno trditvijo, da so makrodelci TiO₂ inertni in neškodljivi (Remškar, 2009). Je pa nekoliko presenetljivo, da pri nanodelcih nismo zaznali statistično značilne produkcije ROS.

Pri opazovanju polnjenja vakuol z delci TiO₂ pri nižji koncentraciji nismo opazili nobene obarvane vakuole, ki bi kazala aktiven prevzem delcev. Pri višji koncentraciji pa smo v celicah opazili prevzem delcev TiO₂ in njihovo koncentriranje v prebavnih vakuolah. Prvi dan je večji delež celic v kulturi prevzel makrodelce kot nanodelce, naslednja dva dni pa je bil v celicah odstotek makrodelcev precej nižji kot odstotek nanodelcev. Po 48 urah izpostavitve delcem je upadel delež celic, ki so vsebavale delce obeh velikostnih razredov, vendar je upad delež pri markodelcih večji. Ti rezultati sovpadajo z ugotovitvijo, da makrodelci višjih koncentracij povzročijo nastanek ROS. Celice najverjetneje kot obrambni mehanizem aktivno izločajo makrodelce, kar naj bi bil tipičen mehanizem *T. thermophila* za detoksifikacijo (Kahru in sod., 2008). Tudi Mortimer in sod. so opazovali polnjenje vakuol, vendar so opazovali polnjenje z nanodelci in makrodelci CuO. Opazili so, da so se vakuole hitreje napolnile z nanodelci kot makrodelci, kar je ravno obratno kot pri našem opazovanju (Mortimer in sod., 2010). Dejstvo, da celice *T. thermophila* aktivno prevzemajo delce TiO₂ iz gojišča in jih shranjujejo v prebavnih vakuolah, nam predstavi pot, po kateri lahko nanodelci pridejo do dednega materiala, kjer lahko vplivajo genotoksično. Potrdimo lahko hipotezo, da celice *T. thermophila* aktivno zaužijejo delce TiO₂, ki se koncentrirajo v prebavnih vakuolah in so vidni s svetlobnim mikroskopom.

Med opazovanjem polnjenja prebavnih vakuol z delci TiO₂ s svetlobnim mikroskopom, smo opazili, da je prišlo pri nekaterih celicah do morfoloških sprememb. Pri manj kot 5 % celic smo opazili, da so počile in da se je njihova vsebina izlila v okolico. Sayes in sod. (2008) so pri *T. thermophila* opazili »počene« prebavne vakuole, ki so sprostile vsebino v okolje. To naj bi se zgodilo, ker naj bi nanodelci TiO₂ vplivali na stabilnost celične membrane in zmanjšanje

mitochondrijskega membranskega potenciala. Ta pojav so pojasnili kot možnost obrambnega mehanizma celic, kjer citoplazemska membrana poči zato, ker je prepeljena z visokimi koncentracijami delcev. Drugi znanstveniki pa pojav počenih celic opisujejo kot rezultat direktnega fizičnega kontakta delcev z membrano ali kot rezultat lipidne peroksidacije, ki naj bi bila posledica oksidativnega stresa, ki ga inducirajo nanodelci (Gurr in sod., 2005). Vendar pa v našem primeru nismo izmerili ne lipidne peroksidacije niti statistično značilnega povišanja ROS, zato ne moremo trditi, da je tudi v našem primru prišlo do razlitja celic zaradi enakih razlogov.

Statistična analiza rezultatov, ki smo jih pridobili s kometnimi testi po alkalni lizi, nam je pokazala očitne razlike poškodb DNK praživali *T. thermophila* tako pri *in vivo* kot tudi pri *in vitro* tretiranju celic s suspenzijami TiO₂ v primerjavi s kontrolami. Poškodbe DNK so se pojavile ne glede na koncentracijo ali velikost delcev.

Pri kometnem testu, kjer smo celice vklopili v gel, jih izpostavili alkalni lizi in nato jedrno DNA izpostavili TiO₂ (acelularni kometni test), je prav tako prišlo do statistično značilnih poškodb DNA ne glede na koncentracijo ali velikost delcev, razen pri tretiranju s 100 µg/mL nano TiO₂. Statistično značilnost razlik smo izračunali z Duncanovim testom večkratne primerjave med DNA poškodbo pri dveh koncentracijah delcev pri acelularnem postopku. Možna razloga za dobljene rezultate bi bila, da se delci pri višjih koncentracijah v suspenziji združijo v večje agregate, ki pa zaradi velikosti ne morejo penetrirati v gel.

Statistična analiza rezultatov, ki smo jih pridobili s kometnim testom po nevtralni lizi, nam ni pokazala očitne razlike poškodb DNA praživali *T. thermophila*, tretiranih z delci TiO₂ v primerjavi s kontrolami. Razlika povprečne DNA v repu tretiranih celic in kontrole ni bila statistično značilna. Dobljeni rezultati nakazujejo, da pri izpostavitvi celic delcem TiO₂ ne pride do dvojnih prelomov DNA. Dvojni prelomi se niso pojavili pri *in vivo* niti pri *in vitro* tretiranju celic s suspenzijami TiO₂, ne glede na koncentracijo ali velikost delcev. Ko pa smo celice tretirali s pozitivno kontrolo za dvojne prelome (100 µM MMS; pozitivna kontrola), smo dobili statistično značilne poškodbe DNA.

Ker smo v isti študiji uporabili aknalno in nevtralno lizo in prišli do različnih rezultatov med njima, lahko rečemo, da delci TiO₂ povzročajo predvsem enojne prelome DNA. Dvojnih prelomov DNA nismo zaznali.

Rezultati, ki smo jih pridobili z acelularnim postopkom kometnega testa, so nam razkrili, da so delci TiO₂ povzročili enojne prelome DNA, medtem ko so interagirali s celičnimi jedri, vklopljenimi v gel. To nam pove, da delci lahko interagirajo s samo jedrno DNA, če ostanejo

prisotni v mediju med samo izvedbo kometnega testa. V tem primeru obstaja verjetnost, da delci, ki ostanejo v mediju, vplivajo na končni rezultat kometnega testa, ki je tako lahko lažno pozitiven in lahko privede do precenjevanja dejanske genotoksičnosti.

Zmožnost delcev TiO₂, da poškodujejo DNK je bila že večkrat dokazana (Gurr in sod., 2005; Wang in sod., 2007; Trouiller in sod., 2009), vendar so vsi namigovali na mehanizem genotoksičnosti, ki je posledica oksidativnega stresa. Naši rezultati pa nakazujejo na statistično značilno produkcijo samo pri visokih koncentracijah makrodelcev, pri nanodelcih pa ne pride do povišanja koncentracij ROS, tudi lipidna peroksidacija, ki bi lahko bila kazalec za citotoksičnost nanodelcev, je ostala nespremenjena v primerjavi s kontrolami. Glede na dobljene rezultate lahko trdimo, da je genotoksičnost, ki smo jo s kometnim testom zaznali, nastala po neki drugi poti, neodvisno od oksidativnega stresa, ali pa so naši rezultati lažno pozitivni. Obstaja samo ena študija, kjer jim je uspelo z alkalnim kometnim testom dokazati, da TiO₂ ni povzročil genotoksičnosti (Bhattacharya in sod., 2009). Predvidevamo lahko, da jim je v tem primeru uspelo odstraniti vse nanodelce pred izvajanjem kometnega testa. Pri nas bi namreč lahko prišlo do lažno pozitivnih rezultatov zato, ker delci ostanejo ujeti v gelu ali pa se po lizi celic sprostijo delci, ki so se prej nahajali v prebavnih vakuolah. Na to, da sproščeni delci lahko pridejo do DNK po alkalni lizi in povzročijo poškodbe sta opozorila že Stone in sod. (2009) in Karlsson (2010).

Pravilnost dobljenih rezultatov oz. genotoksičnost bi najverjetnejo morali preveriti še s kakšnim testom genotoksičnosti kot je npr. mRNA ekspresija tumorskega supresorja gena p53 (Petković in sod., 2011b) ali z DNK delečijami (Trouiller in sod., 2009). Samo z rezultati kometnega testa pa ne moremo z gotovostjo trditi, da je izmerjena genotoksičnost zanesljiv podatek, ker obstaja verjetnost za lažno pozitivne rezultate. V prihodnosti bi bilo treba postopek izpopolniti tako, da bi se zagotovo znebili vseh delcev in da bi jim onemogočili genotoksično delovanje *post festum* in ga kombinirati z drugimi testi.

5.2 SKLEPI

- Delci TiO₂ zmanjšajo koncentracijo ATP v kulturi, ne moremo pa z gotovostjo trditi, da je vpliv odvisen od velikosti delcev.
- Delci TiO₂ lahko interagirajo z jedrno DNK, če ostanejo prisotni v mediju med izvajanjem postopka kometnega testa. To lahko privede do lažno pozitivnih rezultatov ali do precenjevanja dejanske genotoksičnosti.
- Celice *Tetrahymena thermophila* aktivno zaužijejo delce TiO₂, ki se koncentrirajo v prebavnih vakuolahin in jih nato tudi aktivno izločjo, celoten proces pa lahko spremljamo s svetlobnim mikroskopom.
- Kometni test lahko prilagodimo testnemu organizmu, vendar rezultat genotoksičnosti nanodelcev in makrodelcev TiO₂ niso zanesljivi zaradi velike verjetnosti lažno pozitivnih rezultatov. Kometni test je potrebno kombinirati z drugimi testi citotoksičnosti in genotoksičnosti.
- *T. thermophila* ni primeren organizem za študije genotoksičnosti nanodelcev.
- TiO₂ v nobeni obliki in koncentraciji ni povzročil lipidne peroksidacije na celicah *T. thermophila*, oksidativni stres zaradi produkcije ROS pa smo zaznali samo pri makrodelcih višjih koncentracij.
- Delci TiO₂ povzročijo predvsem enojne prelome DNK. Dvojnih prelomov DNK nismo zaznali.

6 POVZETEK

Nanodelci so postali del vsakodnevnega življenja, nanotehnologija hitro napreduje, delci pa se proizvajajo v več tisoč tonah letno. Tako se pojavlja potreba po ustremnem ocenjevanju in ovrednotenju škode, ki jo nanodelci lahko predstavljajo za ekosisteme in zdravje ljudi. Z leti se pojavlja čedalje več študij, ki so povezane s toksičnostjo nanodelcev, vendar pa so podatki še vedno pomanjkljivi in nekateri med sabo niso primerni za medsebojne primerjave zaradi slabe karakterizacije delcev, različnih koncentracij, različnih testnih organizmov, različnih metod itd. Pojavlja se potreba po standardizaciji nabora testov, ki bi omogočili enostavnejšo interpretacijo toksikoloških učinkov nanodelcev.

Med nezanemarljivimi negativnimi učinki, ki jih prinaša nanotehnologija je genotoksičnost, možnost poškodbe DNK, ki niso takoj opazne, vendar lahko vodijo v nastanek raka, kronične bolezni ali težave s plodnostjo. Med pogosto uporabljenimi testi za testiranje genotoksičnosti je metoda kometnega testa, ki smo se je poslužili tudi v naši študiji.

Testirani nanodelci, ki smo jih izbrali, so bili delci titanovega dioksida, ki se pojavljajo v hrani, oblačilih, kozmetičnih izdelkih... Z njimi se srečujemo precej pogosteje, kot se morda zdi na prvi pogled. Večina teh delcev pa na koncu svoje poti konča v vodnih ekosistemih. Zato se nam je zdel primeren testni organizem *Tetrahymena thermophila*, ki je vodni mitetalkar. *T. thermophila* se velikokrat uporablja kot modelni organizem za toksikološke študije in je nezahtevna za gojenje.

Ugotovili smo, da celice *T. thermophila* aktivno prevzemajo delce iz gojišča in jih skladiščijo v prebavnih vakuolah, ki bi lahko bile poleg celične membrane izvorna pot nanodelcev do genoma.

V nasprotju z vsesplošno razširjenim prepričanjem, da TiO₂ povzroča genotoksičnost preko oksidativnega stresa, nismo izmerili povišanih vrednosti ROS v primerjavi s kontrolo (razen pri makrodelcih višjih koncentracij), zaznali pa smo občutno zmanjšanje metabolne aktivnosti (zmanjšanje koncentracije ATP v kulturi, ki je bila inkubirana z delci TiO₂).

Statistično značilnih razlik med toksičnostjo nanodelcev in makrodelcev v študiji nismo dokazali

Ker pozitivnih rezultatov kometnega testa v več različicah nismo mogli podpreti s citotoksičnimi markerji kot so lipidna peroksidacija in produkcija ROS, predvidevamo, da so dobljeni rezultati kometnega testa verjetno lažno pozitivni. Vzrok je verjetno v nezmožnosti,

da bi vse delce odstranili iz minigelov po sami izpostavitvi celic in so delovali na jedrno DNK *post festum*.

V prihodnosti predlagamo, da se postopek kometnega testa izpopolni ter da se rezultati dopolnijo še s kakšnim drugim testom genotoksičnosti. Ni namreč znanstveno upravičeno, da bi delali dokončne zaključke o genotoksičnosti nanomaterialov samo na podlagi analize genotoksičnosti s kometnim testom.

7 VIRI

- Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonalda S., Robards K. 2002. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127: 183-198
- Aruoja V., Dobourguier H.C., Kasemets K., Kahru A. 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, 407, 4: 1461-1468
- Banaszak Holl M. M. 2009. Nanotoxicology: a personal perspective. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1: 353–359
- Betteridge D.J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*, 49, 2: 3-8
- Bhattacharya K., Davoren M., Boertz J., Schins R. P., Hoffmann E., Dopp E. 2009. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, 6: 17, doi: 10.1186/1743-8977-6-17: 11 str.
- Chen F., Cushion M.T. 1994. Use of ATP bioluminescent assay to evaluate viability of *Pneumocystis carmii* from rats. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 11: 2791-2800
- Collins A.R. 2004. Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*, 26, 3: 249-261
- Corlis J. O. 1984. The kingdom protista and its 45 phyla. *Biosystems*, 17: 87-126
- Corlis J. O. 1994. An interim utilitarian (user-friendly) hierarchical classification and characterisation of the protists. *Acta Protozoologica*, 33: 1-51
- Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25: 5-32
- 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
- Gonzalez L., Lison D., Kirsch-Volders M. 2008. Genotoxicity of engineered nanomaterials: A critical review. *Nanotoxicology*, 2, 4: 252-273

- Gou N., Onnis-Hayden A., Gu A. Z. 2010. Mechanistic toxicity assessment of nanomaterials by whole-cell-array stress genes expression analysis. *Environmental Science & Technology*, 44, 15: 5964-5970
- 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
- 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
- Johnston H. J., Hutchison G. R., Christensen F. M., Peters S., Hankin S., Stone V. 2009. Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. *Particle and Fibre Toxicology*, 6: 33, doi: 10.1186/1743-8977-6-33: 27 str.
- Ju-Nam Y., Lead J. R. 2008. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of The Total Environment*, 400, 1–3: 396–414
- Kahru A., Dubourguier H.-C., Blinova I., Ivask A., Kasemets K. 2008. Biotests and Biosensors for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles: A minireview. *Sensors*, 8: 5153-5170
- Kahru A., Dubourguier H.-C. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269, 2–3: 105–119
- Karlsson H.L. 2010. The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 2: 651-666
- Kononenko V. 2012. Prilagoditev kometnega testa s kvasovkami *Saccharomyces cerevisiae* in izopodi *Porcellio scaber* za testiranje genotoksičnosti nanodelcev. Diplomsko delo. Ljubljana Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije: 80 str.
- Lah B. 2001. Razvoj novega biotesta za kontrolo genotoksičnosti onesnaženih voda. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota

medoddelčnega dodiplomskega študija mikrobiologije: 48 str.

Lah B., Gorjanc G., Nekrep F.V., Marinšek-Logar R. 2004a. Comet assay assessment of wastewater genotoxicity using yeast cells. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 72, 3: 607-616

Lah B., Malovrh S., Narat M., Cepeljnik T., Marinšek-Logar R. 2004b. Detection and quantification of genotoxicity in wastewater-treated *Tetrahymena thermophila* using the comet assay. *Environmental Toxicology*, 19: 545-553

Landsiedel R. Kapp M.D., Schulz M., Wiench K., Oesch F. 2009. Genotoxicity investigations on nanomaterials: Methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations-Many questions, some answers. *Mutation Research*, 681, 2-3: 241-258

LeBel C.P., Ischiropoulos H., Bondy S.C. 1992. Evaluation of the probe of 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chemical Research Toxicology*, 5: 227-231

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

Magdolenova Z., Collins A., Kumar A., Dhawan A., Stone V., Dusinska M. 2014. Mechanisms of genotoxicity. A review of *in vitro* and *in vivo* studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* 8, 3: 233-278

Murdock R.C., Braydich-Stolle L., Schrand A. M., Schlager J. J., Hussain S. M. 2008. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to *in vitro* exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological Sciences*, 101, 2: 239-253

Novak S., Drobne D., Valant J., Pipan-Tkalec Ž., Pelicon P., Vavpetič P., Grlj N., Mazej D., Remškar M. 2012. Cell membrane integrity and internalization of ingested TiO₂ nanoparticles by digestive gland cells of a terrestrial isopod. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 5: 1083-1090

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

Ortega-Villasante C., Rellan-Alvarez R., Del Campo F. F., Carpena-Ruiz R. O., Hernandez L. E. 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. Journal of Experimental Botany, 56: 2239-2251

Osojnik Črnivec I. G. 2006. Analiza toksičnosti in genotoksičnosti tal in jezer v Šaleški dolini. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko: 43 str.

Petković J., Kuzma T., Rade K., Novak S., Filipic M. 2011a. Pre-irradiation of anatase TiO₂ particles with UV enhances their cytotoxic and genotoxic potential in human hepatoma HepG2 cells. Journal of Hazardous Materials, 196: 145-152

Petković J., Zegura B., Stevanovic M., Drnovsek N., Uskokovic D., Novak S., Filipic M. 2011b. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. Nanotoxicology, 5: 341-353

Rajapakse K., Drobne D., Valant J., Vodovnik M., Levart A., Marinšek-Logar R. 2012. Acclimation of *Tetrahymena thermophila* to bulk and nano-TiO₂ particles by changes in membrane fatty acids saturation. Journal of Hazardous Materials, 221-222: 199-205

Rajapakse K., Drobne D., Kastelec D., Marinšek-Logar R. 2013. Experimental evidence of false-positive Comet test results due to TiO₂ particle – assay interactions. Nanotoxicology, 7, 5: 1043-1051

Remškar M. 2009. Nanodelci in novovarnost. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje in Urad Republike Slovenije za kemikalije: 103 str.

Russel W. M. S., Burch R. L. 1959 The principles of humane experimental technique. London, Methuen: 238 str.

http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/addendum (5. maj 2014)

- Schultz T. W. 1997. Influence of the energy relationship of organic compounds on toxicity to the cladoceran *Daphnia magna* and the fish *Pimephales promelas*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 38: 336-338
- Sathya T. N., Vardhini N. V., Balakrishnamurthy P. 2010. Revolution of ‘nano’ in *in-vitro* genetic toxicology. Journal of Cell and Tissue Research, 10: 2389-2396
- Sayes M. C., Warheit D. B. 2008. An *in vitro* investigation of the differential cytotoxic responses of human and rat lung epithelial cell lines using TiO₂ nanoparticles. International Journal of Nanotechnology, 5, 1: 15-29
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research, 175, 1: 184-191
- Stone V., Johnston H., Schins R. P. 2009. Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. Critical Reviews in Toxicology, 39: 613-626
- Stover N. A., Krieger C. J., Binkley G., Dong Q., Fisk D. G., Nash R., Sethuraman A., Weng S., Cherry J. M. 2006. *Tetrahymena* Genome Database (TGD): a new genomic resource for *Tetrahymena thermophila* research. Nucleic Acids Research, 34, Database issue: doi: 10.1093/nar/gkj054: 7 str.
- Stopar D., Čadež P., Mahne I. 2005. Fiziologija mikrobov – laboratorijske vaje. Ljubljana. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 21 str.
- Subramanian A. 2009. Save the last dance for me. Miami, Miami University: 1 str.
<http://miamioh.edu/news/media/1588.jpg> (5. maj 2014)
- 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
- 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: 8784-8799

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

Wiesner M.R., Lowry G.V., Alvarez P., Dionysiou D., Biswas P. 2006. Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental Science & Technology*, 40: 4336–4345

Wojewódzka M., Buraczewska I., Kruszewski M., 2002. A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single stranded DNA antibody. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 518, 1: 9–20

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, doi: 10.1186/1743-8977-6-3: 13 str.

ZAHVALA

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

Posebna zahvala gre tudi moji delovni mentorici dr. Katarini Rajapakse, ki me je vodila skozi eksperimentalni del naloge ter me spodbujala, ko stvari niso šle po planu.

Zahvaljujem se recenzentki prof. dr. Damjani Drobne za strokovni pregled naloge. Hvala tudi za eno leto, ki sem ga preživelka kot sodelovka v ekipi Bionanoteam. V tem letu sem pridobila ogromno praktičnega znanja ter stkala nekaj prijateljskih vezi.

Celotnemu osebju Katedre za mikrobiologijo in mikrobiološko biotehnologijo se zahvaljujem za prijaznost, za pomoč in nasvete pri delu v laboratoriju ter za prijetno delovno okolje.

Hvala doc. dr. Damijani Kastelec za statistično analizo rezultatov kometnih testov.

Hvala staršem in mojim bližnjim za potrpežljivost ter finančno in moralno podporo tekom študija.

Hvala Katri Toplak za pomoč pri grafičnem oblikovanju schem in fotografij.

Hvala Kasandri Štebe, ki mi je priskočila na pomoč, ko je računalnik zatajil.

Hvala Neji Frank, Kristini Šijanec, Metki Mikuletič, Manci Primožič, Katri Toplak in Maji Žust za nepozabna študijska leta in nebroj dogodivščin.

Nenazadnje pa hvala tudi mojim kolegicam mikrobiologinjam. Brez vas študij ne bi bil tako zabavna izkušnja. Hvala Maja Blatnik, Petra Čuk, Nežka Kavčič, Andreja Movrin, Pavlina Müller Kroupa, Daniela Petek, Sara Pirnar, Tjaša Perić in Ana Velikonja! Zaradi mikrobiologije smo postale prave prijateljice.