

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA PUŠNIK

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM
KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MOJCA PUŠNIK

**PROUČEVANJE VPLIVA RAZLIČNIH VRST
NANOMATERIALOV IN NJIHOVIH KONCENTRACIJ
NA ADSORPCIJO IN ZAVIRANJE
ACETILHOLINESTERAZE, IZOLIRANE IZ
ELEKTRIČNE JEGULJE**

**EFFECT OF DIFFERENT NANOMATERIALS AND
THEIR CONCENTRATIONS ON ADSORPTION AND
DISABLING OF ACETYLCHOLINESTERASE,
ISOLATED FROM ELECTRIC EEL**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, na Fakulteti za farmacijo ter na Biotehniški fakulteti pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom prof. dr. Damjane Drobne.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc za priložnost izdelave diplomske naloge pod njenim mentorstvom, vse strokovne nasvete in pomoč pri celotnem poteku izdelave diplomske naloge ter izredno dostopnost. Zahvaljujem se tudi somentorici prof. dr. Damjani Drobne za priložnost sodelovanja s skupino Bionanoteam in izvedbe eksperimentalnega dela diplome. Iskrena hvala tudi mladi raziskovalki Neži Rugelj in Barbari Drašler za vse nasvete, pomoč pri izvedbi določenih metod ter za strokovne diskusije glede primerjave rezultatov.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom prof. dr. Damjane Drobne.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
1 UVOD	1
1.1 NANOTEHNOLOGIJA	1
1.1.1 VPLIV NANOMATERIALOV NA ENCIME	1
1.1.2 LASTNOSTI OGLJIKOVIH NANOMATERIALOV IN NJIHOVA BIOLOŠKA REAKTIVNOST	3
1.1.3 LASTNOSTI KOVINSKIH NANOMATERIALOV IN NJIHOVA BIOLOŠKA REAKTIVNOST	4
1.1.4 OKSIDNI NANOMATERIALI IN NJIHOVA BIOLOŠKA REAKTIVNOST ..	5
1.2 HOLINESTERAZE	7
1.2.1 GENETSKO ODZADJE HOLINESTERAZ	7
1.2.2 ACETILHOLINESTERAZA	7
1.3 PRIMERJAVA ACETILHOLINESTERAZE IN BUTIRILHOLINESTERAZE	9
1.4 INHIBITORJI HOLINESTERAZ	10
2 NAMEN	13
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 MATERIALI	14
3.1.1 REAGENTI IN KEMIČALIJE	14
3.1.2 NANOMATERIALI	14
3.1.3 APARATURE IN LABORATORIJSKI PRIBOR	15
3.2 METODE	16
3.2.1 PRIPRAVA REAGENTOV IN KEMIČALIJE	16
3.2.2 PRIPRAVA NANOMATERIALOV	16
3.2.3 UGOTAVLJANJE AKTIVNOSTI ACETILHOLINESTERAZE Z	

ELLMANOVO METODO.....	16
3.2.4 UGOTAVLJANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE ENCIMA ZA TEST ADSORPCIJE IN INHIBICIJE	17
3.2.5 INHIBICIJA ACETILHOLINESTERAZE.....	18
3.2.6 ADSORPCIJA ACETILHOLINESTERAZE	18
3.2.7 PRIKAZ REZULTATOV	18
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	19
4.1 VPLIV NANOMATERIALOV NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZE ...	19
5 SKLEP.....	31
6 VIRI.....	33

KAZALO SLIK

Slika 1: Katalizna aktivnosti acetilholinesteraze (prirejeno po (32))	8
Slika 2: Struktura živčnega prenašalca acetilholina (prirejeno po (35)).	8
Slika 3: Inhibicija AChE z organofosfatom: živčnim bojnim strupom sarinom (prevzeto po (31))	11
Slika 4: Aktivno mesto AChE (prevzeto od (32))	11
Slika 5: Ellmanova metoda za ugotavljanje aktivnosti AChE; a) hidroliza tioestra, b) reakcija redukcije (Prevzeto po (44)).....	17
Slika 6: Inhibicija AChE v odvisnosti od koncentracije amorfnega ogljika	19
Slika 7: Adsorpcija AChE na CB in inhibicija AChE v odvisnosti od koncentracije CB.	20
Slika 8: Primerjava inhibicije AChE z grafenovim oksidom in amorfnim ogljikom.....	21
Slika 9: Adsorpcija AChE na GO in inhibicija AChE v odvisnosti od koncentracij GO.....	22
Slika 10: Adsorpcija AChE na obložen in neobložen GO in inhibicija AChE v odvisnosti od koncentracije nanomaterialov: grafenovega oksida	22
Slika 11: Vpliv BSA na aktivnost AChE.....	23
Slika 12: Vpliv MWCNT obloženih z BSA na aktivnost AChE.....	24
Slika 13: Adsorpcija AChE na Ag in inhibicija AChE v odvisnosti od koncentracije srebra ..	25
Slika 14: Vpliv TiO ₂ obloženega s PVP na aktivnost AChE.....	26
Slika 15: Vpliv TiO ₂ na aktivnost AChE.	26
Slika 16: Vpliv silike, silike, funkcionalizirane s karboksilno oz. aminske skupino, na inhibicijo AChE.....	27
Slika 17: Vpliv silike, silike, funkcionalizirane s karboksilno oz. aminske skupino, na adsorpcijo AChE.	27
Slika 18: Vpliv AuC ₁₄ na aktivnost AChE.....	28
Slika 19: Vpliv AuC ₁₅ na aktivnost AChE.....	28
Slika 20: Primerjava inhibicij AChE z različnimi NM.	29
Slika 21: Primerjava adsorpcijske stopnje AChE na različne NM.....	29

POVZETEK

Kljub edinstvenim lastnostim nanomaterialov (NM) - lahko le ti v stiku s proteini in encimi delujejo toksično, saj so zmožni adsorpcije acetilholinesteraze (AChE), posledica česar je pogosto sprememba v strukturi in funkciji encima. Vloga AChE je hidroliza živčnega prenašalca acetilholina (ACh) v holinergičnih sinapsah, zato je AChE pomemben encim za živčni odziv. Nekateri toksini, zdravila in nanomateriali, ki bodo predmet diplome, vplivajo na aktivnost AChE, tako da jo inhibirajo. Inhibicija povzroči akumulacijo acetilholina, kar vpliva na delovanje živčnega sistema in sčasoma vodi v smrt. Ker je še vedno zelo malo znanega o učinkih nanomaterialov na aktivnost holinesteraz, smo proučevali vpliv različnih vrst inženirsko proizvedenih NM in njihovih koncentracij na adsorpcijo in inhibicijo AChE, izolirane iz električne jegulje. Nanomateriali, ki smo jih proučevali, so: silika in monodisperzna silika, funkcionalizirana z aaminsko oz. s karboksilno skupino (velikost 30 nm), titanov dioksid in titanov dioksid, obložen s polivinilpirolidonom (PVP) (velikost 10 nm), amorfni ogljik (CB) (velikost 13 nm), grafenov oksid (GO) in grafenov oksid, obložen z govejim serumskim albuminom (BSA) (velikost ≥ 500 nm), zlato-ogljikovi delci, srebro (77,8 nm) in večplastne ogljikove nanocевke obložene z BSA (velikost od 35 do 50 nm). Izbrane nanomateriale smo obložili z BSA, da bi primerjali njihov vpliv na aktivnost AChE z neobloženimi delci in prišli do ugotovitve, da BSA zniža toksične učinke NM. Adsorpcijo in inhibicijo AChE z različnimi NM smo proučili z modificirano fotometrično Ellmanovo metodo, ki temelji na merjenju katalizne aktivnosti AChE. Vpliv NM na aktivnost encima smo ocenili na podlagi znižane aktivnosti AChE v primerjavi s kontrolo, ki je namesto NM vsebovala kalij-fosfatni pufer. Največjo inhibicijo AChE so povzročili tisti NM, ki so adsorbirali AChE. Adsorpcija AChE na NM je v veliki meri odvisna od skupka fizikalno-kemijskih lastnosti NM, kot so struktura, oblika, velikost, površinske lastnosti, hidrofobnost/hidrofilnost itd. Največji vpliv na aktivnost AChE (el. jegulje) je imel CB, ki je pri 4 $\mu\text{g/mL}$ povzročil 90-odstotno inhibicijo encima, sledil mu je grafenov oksid, srebro in grafenov oksid obložen z BSA. NM, ki niso adsorbirali AChE, niso povzročili inhibicije encima. S to študijo smo pokazali vpliv različnih NM na aktivnost AChE in zaključili, da lahko tiste NM, ki povzročajo inhibicijo AChE, uvrstimo med kazalnike (nevro)toksičnosti. V našem primeru je z največjo povzročeno inhibicijo AChE glavni kazalnik toksičnosti CB.

Ključne besede: acetilholinesteraza, nanomateriali, adsorpcija, inhibicija, Ellmanova metoda

ABSTRACT

Nanomaterials can – despite their unique properties – be toxic when in contact with proteins and enzymes. Acetylcholine esterase (AChE) is one of most common enzymes in the human brain, blood and the nervous system, which can bind to nanomaterials (NM). The bond between AChE and NM affects functionality and structure of AChE. AChE is important for neurotransmission because of its capability to hydrolyze neurotransmitter acetylcholine in the cholinergic synapsis. Certain toxins, drugs and NM, that are included in the diploma, affect the activity of AChE with inhibition. Inhibition causes accumulation of acetylcholine – which weakens the nervous system and eventually leads to death. Because there is still little known of the effects of NM on the activity on cholinesterase, we observed and studied the effects of different kinds of engineered NM on the absorption and inhibition of AChE, isolated from the electric eel. The NM that were included in the study are following: silica and monodispersed silica, functionalized with amino/carboxyl group (30 nm), gold-carbon NM, carbon black (13 nm), graphene oxide and graphene oxide, coated with BSA (≥ 500 nm), titanium dioxide and titanium dioxide with PVP (10 nm), silver nanoparticles (77,8 nm) and multi-walled carbon nanotubes coated with BSA (35-50 nm). Certain NM were coated with BSA and then their effect on activity on enzymes was compared with particles that weren't coated with BSA. Results showed that BSA lowered toxic effect of NM. Adsorption and inhibition AChE with different NM were examined with a modified photometric Ellman's method, which is based on measuring catalytic activity of AChE. The effect of NM on the activity of enzymes were determined on the basis of the reduced activity of AChE, in comparison to the control sample which did not contain NM, but instead a potassium-phosphate buffer. The highest inhibition rate was caused by those NM, which adsorbed AChE. Adsorption AChE on NM depends mostly on structure, shape, size, surface properties of NM, hydrophilic/hydrophobic etc. The most noticeable inhibition from the studied NM was observed with CB, which caused 90 percent of inhibition at 4 $\mu\text{g/mL}$, which was followed by graphene oxide, silver and graphene oxide coated with BSA. NM which did not adsorb AChE, didn't cause inhibition of AChE. Based on the results, we can observe how NM affect the activity of AChE and if that parameter is suitable as a biomarker of neurotoxicity for earlier mentioned NM. In our case, carbon black was, due to its inhibitory potential, the most important biomarker of neurotoxicity

Key words: acetylcholinesterase, nanomaterials, adsorption, inhibition, Ellman's method

SEZNAM OKRAJŠAV

ACh - acetilholin

AChE – acetilholinesteraza

Ag – srebro

Au – zlato

BSA – goveji serumski albumin

BChE – butirilholinesteraza

CB – amorfni ogljik

CNT – ogljikove nanocevke

DNA - deoksiribonukleinska kislina

DTNB - 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojska kislina (Ellmanov reagent)

GIT - gastrointestinalni trakt

GO – grafenov oksid

MWCNT – večplastne ogljikove nanocevke

NM – nanomateriali

PVA – polivinil alkohol

PVP – polivinilpirolidon

ROS – reaktivne kisikove zvrsti

SNCNT – enoplastne ogljikove nanocevke

TiO₂ – titanov dioksid

1 UVOD

1.1 NANOTEHNOLOGIJA

Nanotehnologija je multidisciplinarno področje raziskav, načrtovanja in uporabe tehnologij na ravni atomov, molekul/makromolekul in danes sodi med najbolj aktualna znanstvena področja. Nanomateriali (NM) so skupki snovi, ki vsaj v eni dimenziji merijo med 1-100 nm in imajo posebne lastnosti v primerjavi z večjimi delci iste kemijske sestave: npr. velika površina glede na maso, spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti zaradi sprememb v razmerju med atomi na površini in v notranjosti delca oz. več atomov je na površini delca, večja je kemijska/biološka aktivnost, katere posledica je lahko tudi nastanek agregatov, lebdenje v zraku, biokompatibilnost, povečana toksičnost (1, 2).

Kljub njihovim specifičnim lastnostim pa je še vedno malo znanega o njihovem vplivu na biološke sisteme, v katere lahko vstopijo z dihanjem, zaužitjem, skozi kožo in z biomedicinskimi pripravki. Zaradi svoje velikosti lahko v celice vstopijo s pasivno difuzijo. Ko NM vdihnemo v respiratorni trakt, lahko le-ti preidejo v celice in tkiva ter krvni sistem. Nato s krvjo preidejo v različne organe; jetra, ledvice, lahko preidejo tudi krvno-možgansko pregrado v centralni živčni sistem. V možganih povzročajo vnetje, nastanek ROS in oksidativnega stresa ter apoptozo celic, zato lahko povečajo tveganje za nastanek nevrodegenerativnih bolezni (1, 3).

1.1.1 VPLIV NANOMATERIALOV NA ENCIME

Večina učinkov NM na biološke sisteme je posledica njihovih interakcij s proteini (npr. encimi). Dokazano je, da se ob stiku NM z biološkim sistemom (okoljem) na površini oblikuje proteinska plast, ki jo imenujemo proteinska korona. Le ta je ključnega pomena za biološko prepoznavnost NM, biokompatibilnost in njihovo reaktivnost. NM lahko encime stabilizirajo, inaktivirajo oz. inhibirajo ali pospešijo njihovo katalizno delovanje¹ (1, 4).

Acetilholinesteraza (AChE) je eden izmed glavnih encimov v možganih, krvi in živčnem sistemu, ki se lahko veže na NM. Posledice se lahko odražajo v spremenjeni encimski sestavi in funkciji (3). Inhibicija AChE povzroči akumulacijo acetilholina, kar vpliva na delovanje živčnega sistema in sčasoma vodi v smrt (3).

¹ Nekateri nanomateriali se adsorbirajo na encim, vendar ga ne inhibirajo.

Inhibicija butirilholinesteraze (BChE) prav tako povzroči akumulacijo acetilholina v nevronskih sinapsah, kar onemogoča normalno delovanje živčnega sistema, kot tudi motnje procesov razstrupljanja. Na podlagi študij *in vitro* adsorpcije in inhibicije AChE/BChE lahko ugotovimo (nevro)toksičnost NM(3, 5).

Adsorpcija encima na NM je pogosto povezana z inhibicijo encima oz. inhibicija encima je po mnenju nekaterih raziskovalcev (Wang in sodelavci) primarno posledica adsorpcije encima na površino NM (3). Adsorpcija encima na NM je odvisna od velikosti, strukture/oblike in površinskih lastnosti NM; zlasti površinske ukrivljenosti, zeta potenciala², funkcionalnih skupin, ki so vezane na NM, in tudi od narave proteina (encima) (4, 6).

Ko se encim adsorbira na NM, lahko pride do spremembe v konformaciji encima, kar v večini primerov vodi v izgubo funkcije proteina. Te spremembe so termodinamsko ugodne, če pride do interakcije med hidrofobnim³ ali ioniziranim zaporedjem proteina in hidrofobno oz. ionizirano površino NM. Če je NM hidrofobne narave, ali ima na svoji površini naboj, je velika verjetnost, da bo prišlo do konformacijskih sprememb proteina, ki so večinoma ireverzibilne. Večji kot je naboj, večja bo adsorpcija proteina na NM. NM s pozitivnim nabojem bolje adsorbirajo nabite proteine s $pI < 5.5$, kar pomeni, da se AChE z večjo afiniteto adsorbira na pozitivno nabite NM kot na negativno nabite NM. Neto naboj AChE je namreč negativen, vrednost pI AChE pa je 5,3 (6, 7).

Vezava proteina na planarne površine povzroči opazne spremembe v sekundarni strukturi proteina, medtem ko velika ukrivljenost površine nekaterih nanodelcev pripomore k ohranjanju osnovne strukture proteina (7, 8).

Toksičnost NM lahko znižamo z dodatkom govejega serumskega albumina (BSA), s katerim obložimo NM. BSA je globularni protein krvnega seruma, ki je ključen pri vzdrževanju onkotskega tlaka in prenašanju endogenih snovi. Gre za polipeptid z molekulsko maso 65 000 Da, ki ga sestavlja 21 tirozinskih, 2 triptofanska, 35 cisteinskih, 5 metioninskih in 17 histidinskih ostankov (8, 9, 10). Ob dodatku BSA se zmanjša inaktivacija AChE z različnimi NM (npr. s srebrovimi nanodelci), saj se BSA adsorbira na nanodelce (11). V primeru grafenovega oksida (GO) pride do vodikovih interakcij med hidrofilnimi ostanki BSA in GO (k adsorpciji pripomorejo zlasti številčne karboksilne skupine na površini GO), medtem ko so

² Ocena za neto naboj na površini NM.

³ Hidrofobnost je povezana z večjo adsorpcijo.

⁴ pI oz. izoelektrična točka je tisti pH , kjer je neto naboj proteina enak 0.

med aromatskimi ostanki BSA in GO hidrofobne vezi in π - π interakcije tiste, ki vplivajo na adsorpcijo BSA (12). BSA pogosto uporabljamo zaradi njegove velike stabilnosti in strukturne podobnosti s humanim serumskim albuminom ter majhne cene (10). NM, ki so obloženi z BSA, so manj toksični s povečano biokompatibilnostjo, zato jih lahko izkoriščamo v biomedicinske namene (npr. dostavni sistemi za učinkovine) (11).

1.1.2 LASTNOSTI OGLJIKOVIH NANOMATERIALOV IN NJIHOVA BIOLOŠKA REAKTIVNOST

Grafen je 2D⁵ mreža sp² hibridiziranih ogljikovih atomov, ki ga dobimo z razplastitvijo grafitu (13). Je aromatska molekula z veliko molekulsko maso iz obročev s šestimi ogljikovimi atomi. Gre za elastičen, prosojen in izjemen toplotni in električen material (13,14). Grafenov oksid je vodotopni derivat grafena, ki nastane z oksidacijo grafitu in je amfifilne narave zaradi prisotnosti karboksilne in hidroksilne ter epoksidne funkcionalne skupine na robovih molekule (2,12,15). Te skupine omogočajo preprosto dispergiranje GO v vodnem mediju in organskih topilih. Zaradi prisotnosti funkcionalnih skupin na površini GO pride do tvorbe vodikove vezi in do elektrostatskih interakcij med AChE in GO. GO lahko zaradi majhne površinske ukrivljenosti poruši α -vijačnico kratkih peptidov. Zhang in sodelavci ter Zuo in sodelavci poročajo, da je majhna površinska ukrivljenost povezana s strukturnimi spremembami nekaterih nekompleksnih proteinov (16,17). Mesarič in sodelavci so pokazali, da GO zaradi svoje amfifilne strukture ni povzročil strukturnih sprememb AChE, čeprav je prišlo do inhibicije AChE. Ker GO v primerjavi s CB ni povzročil tako izrazite inhibicije, so zaključili, da je interakcija med GO in AChE izven aktivnega mesta AChE. Spojina je zaradi svojih lastnosti potencialen proteinski oz. encimski inhibitor (4).

Amorfno oblikovane delce ogljika imenujemo amorfni ogljik (»carbon black« oz. CB). Gre za industrijsko pridobljene naravne saje, ki se od slednjih razlikuje po vsebnosti organskega materiala in policikličnih aromatskih ogljikovodikov. CB je zaradi masovne proizvodnje v industriji danes vseprisoten. Uporablja se v kozmetiki, barvilih, embalažah, gumah, kot aditiv v prehrani itd. Je v obliki črnega prahu, ki je zmes sferičnih delcev in agregatov različnih velikosti. (2, 18). Tudi CB povzroča inhibicijo AChE, vendar pa je v primerjavi z GO adsorpcija AChE na CB (in inhibicija AChE) odvisna le od hidrofobnih in van der Waalsovih interakcij (hidrofobne interakcije povzročijo strukturne deformacije encima ter od številnih aromatskih stikov med CB in AChE (2, 4) Le teh je mnogo več kot pri GO in AChE.

⁵ 2D materiali imajo veliko specifično površino.

V študiji Mesarič in sodelavci poročajo, da adsorpcija CB na nevretenčarsko AChE⁶ vodi do izgube deleža α -vijačnice AChE v bližini aktivnega mesta AChE. Posledica so strukturne spremembe in inhibicija AChE (4).

Ogljikove nanocevke (CNT) so grafitne plasti, ki so se zvile v obliko valja in so na koncu zaključene s polovico fullerena. Sestavljene so lahko iz ene (SWCNT), dveh ali več plasti (MWCNT). Nekatere raziskave kažejo, da lahko CNT prebijejo celično membrano in poškodujejo organe. Pri vdihavanju preidejo v pljuča, kjer povzročijo različne spremembe tkiva. Možen je razvoj bolezni, kot je azbestoza (13). Wang in sodelavci so ugotovili, da so NM (SWCNT in MWCNT) povzročili 90-odstotno inhibicijo encima pri koncentraciji 800 mg/L (3). V študiji Sopotnik in sodelavci (8) so pokazali, da imajo MWCNT največjo površinsko ukrivljenost, zato so MWCNT povzročili najmanjšo inhibicijo AChE v primerjavi z CB in GO, ki imata manjšo površinsko ukrivljenost. Posledica manjše površinske ukrivljenosti CB in GO je večje število atomskih stikov med CB oz. GO in AChE. Z računalniškimi simulacijami so ugotovili, da majhna površinska ukrivljenost ogljikovih NM poveča tveganje za porušev α -vijačnice AChE električne jegulje (8).

Navedeni ogljikovi NM imajo večji adsorpcijski potencial kot kovinski in bolj hidrofilni NM, kot je na primer TiO₂ (19).

1.1.3 LASTNOSTI KOVINSKIH NANOMATERIALOV IN NJIHOVA BIOLOŠKA REAKTIVNOST

Težke kovine reagirajo s proteini in imajo toksične učinke. Vežejo se na tiolne skupine encimov in jih inaktivirajo oz. povzročijo proteinsko denaturacijo. Nekateri avtorji trdijo, da sta takšna primera tudi zlato in srebro (20).

Srebrovi NM se zaradi svojih antibakterijskih⁷ lastnosti in zaradi sposobnosti odpravljanja neprijetnega vonja pogosto uporabljajo v raznih izdelkih (antiperspiranti itd.) in medicinskih proizvodih (operacijski instrumenti, obloge za rane itd.). Povečana izdelava NM postaja težava s toksikološkega in okoljskega vidika (20). Razne študije *in vitro* nakazujejo, da omenjeni nanodelci inhibirajo AChE kot tudi BChE (21). Namreč vstopijo lahko v krvni obtok, v nekaterih primerih pa preidejo krvno-možgansko pregrado v CZS in povzročajo nevronske degeneracije in nekrozo (rezultati po podkožni aplikaciji NM v podgane).

⁶ Nevretenčarska in vretenčarska AChE električne jegulje sta si strukturno zelo podobni.

⁷ Antibakterijske lastnosti Ag so lahko posledica interakcije Ag s tiolnimi skupinami proteinov (20).

Dosedanji rezultati nakazujejo, da vzrok za inhibicijo AChE v živih organizmih ni samo adsorpcija na Ag, ampak tudi učinki, ki jih povzročijo disociirani kovinski ioni v fiziološkem mediju. -Ioni povzročijo nastanek reaktivnih kisikovih spojin (ROS), ki lahko poškodujejo DNA, encime ter proteine (bakterijske in humane). Obseg same inhibicije pa je odvisen od površinskega plašča (»coatinga«) Ag nanodelcev na AChE, kar pomeni, da je inhibicija v glavnem posledica adsorpcije AChE na površino Ag. Namreč srebrovi NM, ki so jih uporabili v omenjeni študiji, so še vedno preveliki, da bi lahko vstopili in interagirali z aktivnim mestom holinesteraz, saj je le to široko 0,5 nm in globoko 2,5 nm, celoten premer posamezne molekule AChE pa je 8 nm (20, 21).

Koloidni zlati NM so zaradi sposobnosti vezave plazemskih proteinov potencialni kandidati pri terapiji zdravljenja raka. Kot velja za mnogo NM, se tudi zlati NM, potem ko jih injiciramo v krvni obtok, obložijo s serumskimi proteini. Po določenem času pride zaradi proteinskega plašča okoli NM - do biološkega odziva na NM (lahko pride do celičnega privzema, protivnetnega odziva). Zlati NM so toksični in povzročajo dermatitis, stomatitis, proteinurijo itd. (21).

Na podlagi kinetičnih študij so prikazali model interakcije med srebrovini oz. zlatimi ioni in holinesterazami. Najprej nastane reverzibilni kompleks med ioni in holinesterazo – ta je obstojen le kratek čas, kovalentne vezi med kovinskimi ioni in cisteini povzročijo rigidnost holinesterazne strukture, zato pride do inhibicije/inaktivacije katalizne aktivnosti encima. Inhibicija je torej posledica izgube proteinske strukturne dinamike, ki nastane z reakcijo med aminokislinskimi preostanki v proteinu in kovinskimi ioni (21).

1.1.4 OKSIDNI NANOMATERIALI IN NJIHOVA BIOLOŠKA REAKTIVNOST

Silicijev dioksid/silika je nekovinski oksid, ki se uporablja v raznovrstne namene (npr. aditiv v kozmetiki, zdravilih, hrani), v zadnjih letih pa se je uporaba silike razširila na biomedicinska in biotehnoška področja (npr. dostava zdravilnih učinkovin, dostava DNA, zdravljenje raka). Učinki silike so odvisni od velikosti;⁸ citotoksičnost je za določeno območje velikosti delcev značilna lastnost.

⁸ Izpostavljenost siliki na mikro nivoju je povezana z razvojem avtoimunskih bolezni (sistemska skleroza, revmatoidni artritis, lupus, kronična renalna bolezen), nekatere kristalne oblike silike pa so lahko vzrok pljučnega raka.

Rezultati študij na podganah kažejo (22, 23, 24), da SiO₂ nanodelci vplivajo na topoizomerozo 1 v nukleoplazmi v celicah, provnetno stimulacijo endotelijskih celic in fibrogenezo. Študija Waisheng Linga in sodelavcev je pokazala, da nano silika v koncentracijskem območju od 10-100 µg/mL povzroča citotoksičnost in zmanjšanje celične viabilnosti bronho-alveolarnih maligno spremenjenih celic (26). Prav tako je v teh celicah prišlo do tvorbe ROS in posledično oksidativnega stresa. Zaradi oksidativnega stresa je bila opazna povečana poraba antioksidantov oz. znižan nivo glutationa (GSH), prišlo pa je tudi do poškodbe membrane in lipidne peroksidacije (26). Po drugi strani pa so v študiji *in vivo* Xue in sodelavci pokazali, da nanodelci silike ne povzročajo toksičnosti in jih zato lahko uporabljamo *in vivo* (25). Wang in sodelavci poročajo, da SiO₂ sproščajo ione, vendar pa le ti niso imeli opaznega vpliva na aktivnost holinesteraz (3). Zaradi raznolikih rezultatov so nujne dodatne študije glede varnosti omenjenih nanodelcev (26).

Titanov dioksid je skoraj netopen anorganski oksid. V telo primarno vstopa z dihanjem in se iz pljuč in GIT lahko razširi v druge organe. Večina študij *in vivo* in *in vitro* poroča, da NM ne prehaja *stratum corneum*. Po intravenski izpostavitvi nano TiO₂ (pri velikih koncentracijah) lahko pride do nastanka patoloških lezij na jetrih, ledvicah, vranici in v možganih (27). Liao in sodelavci so objavili, da velike koncentracije TiO₂ (10-30 nm) v zraku na delovnem mestu povzročijo citotoksičnost, ker so delci dovolj majhni, da prodrejo v telo skozi kožo, dihala in GIT (28). Medina in sodelavci so mnenja, da nano TiO₂ lahko preide skozi krvno-možgansko bariero in vohalni epitelij v centralno živčni sistem, kjer povzroča oksidativni stres in adsorbira encime, kot je AChE ter spremeni encimsko aktivnost (29). Titanov dioksid, obložen s polivinilpirolidonom (PVP), ima nekoliko drugačne oz. izboljšane lastnosti zaradi vsebnosti PVP, vodotopnega polimera, ki je sestavljen iz monomerov *N*-vinilpirolidona. Namen oblaganja nanomaterialov s PVP in drugimi podobnimi polimeri (npr. PVA) je izboljšati koloidno stabilnost in biokompatibilnost nanomaterialov oz. zmanjšati njihovo toksičnost (30).

Wang in sodelavci so proučevali vpliv ogljikovih, kovinskih in oksidnih NM na aktivnost AChE in prišli do zaključka, da imajo oksidni NM najmanjši vpliv na AChE (3).

1.2 HOLINESTERAZE

Holinesteraze so skupina serinskih hidrolaz, katerih glavna naloga je hidroliza acetilholina (AChE) oz. butirilholina (BChE) v holinergičnih sinapsah. Gre za osnovni proces, ki omogoča obnovo delovanja holinergičnih nevronov (31, 32). Holinesteraze delimo na acetilholinesteraze (AChE), ki so v holinergičnih sinapsah v centralnem in perifernem živčevju in so vezane tudi na eritrocite in butirilholinesteraze (BChE), ki so v živčnem sistemu (hipokampus, belina v velikih možganih), srcu, trebušni slinavki, v jetrih, koži, gladki mišičnini v prebavi, v krvni plazmi itd. Primarna vloga BChE ni popolnoma poznana. Predvidoma pa nadomešča pomanjkanje aktivnosti AChE pri hidrolizi acetilholina zaradi inhibicije ali odsotnosti encima in sodeluje pri razstrupljanju raznih snovi z estrskimi vezmi, kot so kokain, salicilna kislina in heroin (31, 32).

1.2.1 GENETSKO ODZADJE HOLINESTERAZ

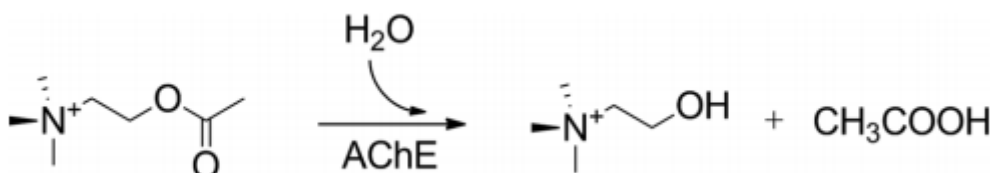
Gen, ki kontrolira sintezo holinesteraz, lahko obstaja v več alelnih oblikah. Štiri najpogostejše oblike so označene kot E^a , E^u , E^f , E^s . Ti štirje aleli lahko tvorijo en normalen in devet abnormalnih genotipov. Normalni najpogostejši fenotip je E^uE^u ali UU (u za usual). Gen E^a se navezuje na atipični gen. E^f gen (f za fluorid rezistenten) nam daje šibko aktiven encim, ki je odporen proti inhibiciji s fluoridom. E^s gen (s je za silent) pomeni odsotnost encima ali prisotnost proteina z minimalno oziroma nekatalizno vlogo. Mutacije, ki povzročajo atipične in na fluorid rezistentne holinesteraze, vključujejo strukturno spremembo aktivnega encima. Pri kavkazijski populaciji homozigoti, AA in FF predstavljajo 0,3 do 0,5 %, kar pomeni, da ima 0,3 do 0,5 % (kavkazijske) populacije znižano aktivnost AChE (33).

1.2.2 ACETILHOLINESTERAZA

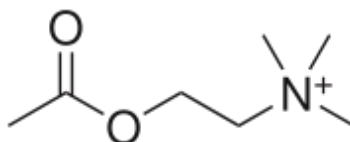
AChE sodeluje v holinergičnem živčnem prenosu s hitro hidrolizo acetilholina (na holin in očetno kislino) (Slika 1) in obnovo holinergičnega živca. Je v holinergičnih nevronih v centralnem in perifernem živčnem sistemu, na stiku živčne in mišične celice ter v krvnih celicah (eritrocitih)⁹(31). Holinergično živčevje je del vegetativnega živčevja, v katerem je v končnih sinapsah živčni prenašalec acetilholin. Acetilholin (Slika 2) je živčni prenašalec, ki se sprošča iz veziklov holinergičnih nevronov. Pri prenosu živčnega dražljaja se acetilholin sprosti iz presinaptičnega živca v sinaptično špranjo in se veže na acetilholinski receptor na membrani postsinaptičnega živca. Tako se prenese signal iz enega na drug živec.

⁹ AChE je v krvi vezana na eritrocite in je odgovorna za razgradnjo plazemskega acetilholina.

Na postsinaptični membrani je tudi acetilholinesteraza, ki s hidrolizo acetilholina prekine prenos signala. Sproščeni holin se ponovno privzame v presinaptični živec, kjer s pomočjo encima holin-acetiltransferaza veže acetatno skupino preko acil koencim A ter ponovno tvori acetilholin (32, 33). AChE je poznana kot eden izmed najhitrejših encimov v človeškem telesu, saj hidrolizira 25 000 molekul acetilholina na sekundo (34).



Slika 1: Katalizna aktivnosti acetilholinesteraze (prirejeno po (32))



Slika 2: Struktura živčnega prenašalca acetilholina (prirejeno po (35)).

Posamezniki z blokirano AChE (npr. zaradi inhibitorjev) ali miši z izbitim genom za AChE imajo preveč stimulirane acetilholinske receptorje. Acetilholin se akumulira, kar privede do nenadzorovanega in podaljšanega vzbujenja v nevronu. Čeprav so te miši še vedno viabilne, imajo manj mišičja, ki ima spremenjeno morfologijo in za šestdetkrat višji nivo acetilholina kot normalno (36).

1.2.2.1 STRUKTURA ACETILHOLINESTERAZE

Struktura AChE je bila prvič raziskana šele 1990. Prvi poskusi so bili izvedeni na električni jegulji (*Electrophorus electricus*). Pri raziskavah še danes pogosto uporabljamo AChE električne jegulje, zaradi številčnosti encima v električnih organih. AChE, izolirana iz električne jegulje, je tetramerni glikoprotein, ki vsebuje heksoamine. Sestavljen je iz štirih enakih podenot (vsaka obsega 70 kDa). Vsaka podenota obsega eno aktivno mesto. Tako aktivno mesto kot tudi celotna struktura AChE vsebuje podobne regije, kot jih najdemo pri drugih serinskih hidrolazah (38, 39).

Holinesteraze so tipa α/β -hidrolaze, sestavljene iz α -vijačnic povezanih z β -strukturami, ki vsebujejo katalizno domeno sestavljeno iz Ser-His-Glu. Podobno strukturo lahko najdemo pri karboksiesterazah, kjer je glutamat zamenjan z aspartatom (31). Aktivni del AChE vsebuje katalizno estrski del in anionski del. Estrski del hidrolizira estrsko vez - acetilholin se hidrolizira na acetat in holin, medtem ko je anionski del odgovoren za pravilno orientacijo same molekule. Estrski del je sestavljen iz treh aminokislin: serina, histidina in glutaminske kisline. Periferni anionski del je na površini same molekule AChE. Ta del je tarča za številne toksine in zdravila ter ima najverjetneje pomembno vlogo pri nastanku Alzheimerjeve bolezni.¹⁰Tako BuChE kot AChE sta v večini tatramera G4. Najdemo ju tudi v obliki dimera G2 (vodotopna molekula) (31, 32).

Večina molekul AChE v centralnem živčnem sistemu vsebuje tako hidrofobni kot tudi hidrofilni del. To pomeni, da so nekatere molekule AChE amfifilne. Obstaja razlika med amfifilnimi in ne-amfifilnimi holinesterazami. Amifilne vsebujejo G4 katalizni tetramer in ne-katalizno podenoto P (fosfor). Podenota P ima molekulsko maso 20 kDa in je asimetrično vezana na dve podenoti G (31, 32).

1.3 PRIMERJAVA ACETILHOLINESTERAZE IN BUTIRILHOLINESTERAZE

AChE in BChE sta si precej podobni, vendar se njuna pomena in lokalizacija v telesu povsem razlikujeta. BChE je poznana kot plazemska holinesteraza in AChE kot eritrocitna holinesteraza (AChE po centrifugiranju krvi ostane v krvnih celicah, zato bomo največjo aktivnost AChE izmerili v eritrocitih. Aktivnost AChE v krvni plazmi pa bo zelo nizka). Pomembna razlika med AChE in BChE je, da ima AChE naraven substrat: acetilholin, medtem ko BuChE nima naravnega substrata.

BChE in AChE različno cepita substrate. AChE ne more hidrolizirati estrov z veliko molekulsko maso, ampak ima večjo afiniteto do acetilholina in BChE do butirilholina. Do razlik za afiniteto (do različnih substratov) najverjetneje pride zaradi razlik v postavitvi aromatskih aminokislin. Razlika v strukturi BChE in AChE je bila odkrita s huperzinom A, ki je zdravilo za Alzheimerjevo bolezen in je močan AChE inhibitor, ki se veže na periferni anionski del molekule, medtem ko BChE ob prisotnosti huperzina ostane nespremenjen.

¹⁰ Amiloidni plaki, značilni za Alzheimerjevo bolezen bi naj nastali z interakcijo β -amiloida s perifernim anionskim mestom AChE.

Pri Alzheimerjevi bolezni se velike količine amiloda beta ($A\beta 1$) nabirajo v možganih, kar povzroči poškodbo možganskega tkiva (nastanejo beljakovinski plaki, beljakovinske nitke – neurofibrilarni pentlje). Zelo so prizadete tiste živčne celice, ki uporabljajo kot živčni prenašalec acetilholin, katerega sinteza se posledično zmanjša. Te spremembe so najizrazitejše v predelu možganov, ki je pomemben za tvorbo spomina. Za bolezen je prav tako značilna zmanjšana aktivnost acetilholinesteraz v holinergičnih in neholinergičnih nevronih, medtem ko je aktivnost acetilholinesteraz v okolici amiloidnih plakov povečana, zato se pri terapiji uporabljajo inhibitorji acetilholinesteraz: takrin, rivastigmin in galantamin. Navedene učinkovine inhibirajo acetilholinesterazo in tako okrepijo nevrottransmisijo. Na tak način upočasnijo napredovanje bolezni in omilijo nekatere simptome (40).

1.4 INHIBITORJI HOLINESTERAZ

Holinesteraze so pomembni biomarkerji v telesu, saj so tarča različnih drog in toksinov. Kot biomarkerji lahko prepoznajo substrat ali pa inhibitor (32). *In vitro* študije adsorpcije in inhibicije AChE (z npr. NM) nam lahko služijo pri raziskavah nevrotoksičnosti NM. Na tak način lahko ugotovimo, ali preiskovane spojine vplivajo na živčni sistem oz. če lahko inhibicijo AChE uporabimo kot biomarker za inhibitorje (32).

Inhibitorji holinesteraz so snovi (lahko so naravne ali umetne), ki vplivajo na cepitev acetilholina in podaljšajo njegovo delovanje (31, 32). Inhibitorji AChE inhibirajo encim na štirih različnih mestih. Vežejo se lahko na estrski del in α -anionski del aktivnega mesta encima, na aromatski predel¹¹ in na periferno anionsko mesto¹² (Slika 4) (41, 42). Na α -anionski del aktivnega mesta AChE se vežejo reverzibilni inhibitorji, kot npr. takrin¹³ in galantamin,¹⁴ ki sta učinkovini za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni. Na estrski del aktivnega mesta AChE se večinoma vežejo organofosfati¹⁵ in karbamatni derivati. To so zlasti pesticidi in živčni bojni strupi, ki se s serinom v aktivnem mestu kovalentno povežejo v stabilne estre. Organofosfati, potem ko se povežejo s serinom, tvorijo stabilne, kovalentno vezane adukte, ki zelo počasi disociirajo. Nekatere spojine, ki vsebujejo oksimsko skupino (npr. trimedoksim) lahko cepijo organofosfatni del od aktivnega mesta AChE in reaktivirajo AChE.

¹¹ Na aromatski predel se običajno vežejo inhibitorji α -anionskega mesta AChE.

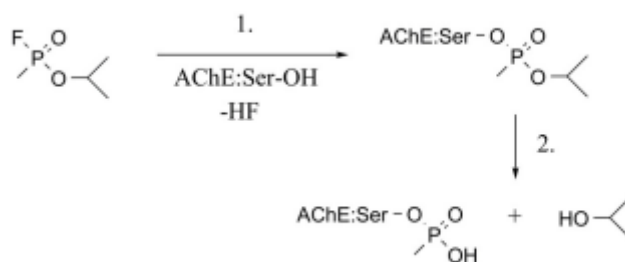
¹² Periferno anionsko, mesto kamor se vežejo alfatoksini in močno inhibirajo AChE.

¹³ Zelo toksičen za hepatocite.

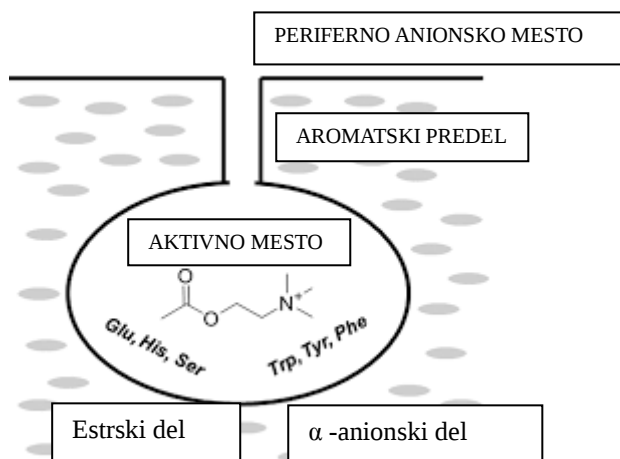
¹⁴ Alkaloid izoliran iz kavkazijskega zvončka (*Galanthus woronowii*, Amaryllidaceae), ki se veže še na aromatski predel AChE. Se uporablja za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni.

¹⁵ Ireverzibilni inhibitorji.

Za vsak organofosfatni (ireverzibilni) inhibitor velja, da po določenem času pride do dealkilizacije vezanega organofosfatnega inhibitorja, kar pa ne vpliva na AChE, ki ostane še vedno neaktivna. Slika 3 prikazuje mehanizem inhibicije AChE z organofosfati (v estrskem delu aktivnega mesta AChE). V primerjavi z organofosfatnimi inhibitorji se karbamatni del s spontano hidrolizo odcepi od aktivnega mesta AChE in regenerira AChE, ki je ponovno aktivna (32).



Slika 3: Inhibicija AChE z organofosfatom: živčnim bojnim strupom sarinom (prevzeto po (31))



Slika 4: Aktivno mesto AChE (prevzeto od (32))

Primeri zelo toksičnih organofosfatov so živčni bojni plini (npr. sarin), ki se po vseh možnih poteh hitro razširijo po telesu. Manj toksični organofosfatni živčni agensi so organofosfatni pesticidi.¹⁶ Sledijo karbamatni pesticidi, ki niso zmožni preiti skozi krvno-možgansko bariero zdravega organizma. Zaradi množične uporabe pesticidov je inhibicija aktivnosti holinesteraz z npr. organofosfati pogosto uporabljen biomarker za spremljanje okoljske onesnaženosti (32).

¹⁶ Veliko organofosfatnih pesticidov so modificirali, tako da so manj toksični za toplokrvne organizme z ohranjenimi toksičnimi učinki za insekte.

2 NAMEN

Naravnim nanomaterialom smo izpostavljeni že od začetka evolucijskega razvoja. V 21. stoletju so postali vedno bolj pomembna in nepogrešljiva komponenta v različnih vejah znanosti, zato se je njihova proizvodnja kot tudi izpust v okolje znatno povečala. Kljub njihovim pozitivnim lastnostim, zaradi katerih so MN koristni, lahko po drugi strani delujejo toksično na organizem, saj še vedno vemo zelo malo o njihovem vplivu na živa bitja. V toksikoloških študijah so dokazali, da nekateri NM lahko prodrejo in delujejo toksično na bakterije, rastline, živali in ljudi, saj zaradi svojih lastnosti in zlasti velike reaktivnosti zlahka interagirajo s proteini in povzročijo strukturne in funkcionalne spremembe. Glede na dokazane učinke nas je zanimal vpliv raznovrstnih NM na AChE električne jegulje.

Namen našega dela bo:

- Spektrofotometrično ugotoviti aktivnost AChE, inkubirane z različnimi inženirsko proizvedenimi NM.
- Ugotoviti vpliv različnih NM in njihovih koncentracij na katalizno aktivnost AChE (električne jegulje).
- Ugotoviti vpliv NM, obloženih z BSA, na aktivnost AChE električne jegulje.
- Ugotoviti, ali je inhibicija encima posledica adsorpcije AChE na NM.
- Ugotoviti kateri NM so potencialni biomarkerji nevrotoksičnosti.

Naše hipoteze so:

- Na stopnjo adsorpcije AChE na NM vpliva skupek fizikalno-kemijskih lastnosti NM (velikost, površinski naboj v suspenziji, struktura /oblika, hidrofobnost/hidrofilnost, koncentracija NM, itd.), zato bomo največjo stopnjo adsorpcije opazili pri CB in GO.
- Inhibicija AChE bo vsaj delno izvirala iz adsorpcije AChE na NM.
- Oglikovi NM, imajo po podatkih iz literature velik adsorpcijski potencial, zato predpostavljamo, da bodo interagirali z BSA. Posledica vezave bo znižana adsorpcija/inhibicija AChE oz. zmanjšana toksičnost NM.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 REAGENTI IN KEMIČALIJE

- encim: acetilholinesteraza, izolirana iz električne jegulje (*Electrophorus electricus*)
- substrat: acetiltioholinijev klorid
- Ellmanov reagent s pH 7,4
- BSA
- fizostigmin
- K_2HPO_4 in KH_2PO_4 (Merck KGaA, Dramstadt, Nemčija)
- voda prečiščena z Mili-Q sistemom za ultračisto vodo (Millipore Corp., Billerica, MA, USA)

Encim, substrat, Ellmanov reagent, fizostigmin in BSA smo kupili v Sigma-Aldrich Co. (USA). Čistota reagentov za merjenje aktivnosti AChE z različnimi NM je bila več kot 98 %.

3.1.2 NANOMATERIALI

Amorfni ogljik (CB) smo kupili v podjetju PlasmaChem GmbH (Berlin, Nemčija). Velikost primarnih¹⁷ delcev je 13 nm. Čistost je po navedbah proizvajalca >99 % in oblika amorfna. Vodno suspenzijo grafenovega oksida (GO) v miliQ vodi smo kupili v podjetju Graphene Supermarket (ZDA). Po navedbah proizvajalca GO sestavlja 79 % ogljika in 20 % kisika. Primarna velikost ploščic je ≥ 500 nm. Oblika/struktura GO je kristalna. Večplastne ogljikove nanocevke (MWCNT) smo dobili v okviru FP7 EU projekta NanoValid. Primarna velikost cevk je med 35 in 50 nm. Oblika/struktura MWCNT je prav tako kristalna. MWCNT in GO smo obložili z BSA, ki smo ga kupili v Sigma-Aldrich Co. (USA). Izvorna koncentracija vodnih suspenzij CB, GO in MWCNT obloženih z BSA je 1000 $\mu\text{g/mL}$, uporabljene koncentracije pri merjenju aktivnosti AChE pa so: 0,095; 0,19; 0,29; 0,38; 0,48; 0,95; 1,91; 2,86; 3,81; 4,76; 9,52; 19,05; 28,57; 38,10; 47,62 $\mu\text{g/mL}$. Izvorna koncentracija vodne suspenzije GO, obloženega z BSA, je 2000 $\mu\text{g/mL}$, uporabljene koncentracije pa so bile 19,05; 38,09; 57,14; 76,19; 95,24 $\mu\text{g/mL}$.

¹⁷ Primarna velikost je velikost NM, ki je v obliki prahu.

Vodne suspenzije NM TiO₂ 110 in TiO₂ obložene s PVP 111 smo prejeli v okviru FP7 EU projekta NanoMILE. Primarna velikost nanomaterialov, ki so v kristalni obliki (rutil¹⁸), je 10 nm. Izvorna koncentracija vodne suspenzije TiO₂ 110 je 17000 µg/mL, uporabljene koncentracije pa so 161,9; 323,81; 485, 71; 647,62; 809,52 µg/mL. Izvorna koncentracija vodne suspenzije TiO₂, obloženega s PVP (111), je 20 µg/mL uporabljene koncentracije pa so 0,19; 0,38; 0,57; 0,76; 0,95 µg/mL.

Nanomateriale monodisperzne silike 98 in monodisperzne silike, funkcionalizirane z aminsko (99) oz. s karboksilno skupino (100), smo prav tako prejeli v okviru FP7 EU projekta NanoMILE. Njihova primarna velikost je 30 nm. Izvorna koncentracija vodne suspenzije silike 98 je 1000 µg/mL, uporabljene koncentracije pa so: 9,52; 19,05; 28,57; 38,1; 47,62 µg/mL. Izvorna koncentracija vodne suspenzije monodisperzne silike, funkcionalizirane z aminsko oz. s karboksilno skupino, je 500 µg/mL, uporabljene koncentracije pa 4,76; 9,52; 14,29; 19,05; 23,81 µg/mL.

Zlato ogljikove delce (AuC 14 in AuC 15) smo dobili v Zlatarni Celje in so glede karakterizacije poslovna tajnost, ampak se v biološkem smislu lahko primerjajo z drugimi NM. Izvorna koncentracija vodne suspenzije AuC 14 je 1000 µg/mL uporabljene koncentracije pa 0,19; 0,38; 0,57; 0,76; 0,95 µg/mL. Izvorna koncentracija vodne suspenzije AuC 15 je 500 µg/mL uporabljene koncentracije pa so 1,905; 3,81; 5,714; 7,61; 9,524 µg/mL.

3.1.3 APARATURE IN LABORATORIJSKI PRIBOR

- VIS čitalec mikrotitrnih plošč (Anthos, UK)
- palični sonikator (Sonics Vibra Cell, Newtown, ZDA)
- ultrazvočna vodna kopel (250 W, 50 Hz; Sonis 2GT, Iskra Pio d.o.o)
- centrifuga (Eppendorf centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Nemčija)
- mikrotitrna plošča s 96 vdolbinicami (NUNC)
- mikrocentrifugirke: 1,5 mL
- centrifugirka: 30 mL
- pipete: avtomatske, multikanalne
- štoparica
- osnovni nabor steklovine, ki smo jih uporabili za pripravo suspenzij in raztopin (bučke, čaše, itd.)

¹⁸ Z veliko katalizno aktivnostjo, kar pomeni, da ob vzbujanju s svetlobo tvori elektronske pare

3.2 METODE

3.2.1 PRIPRAVA REAGENTOV IN KEMIČALI

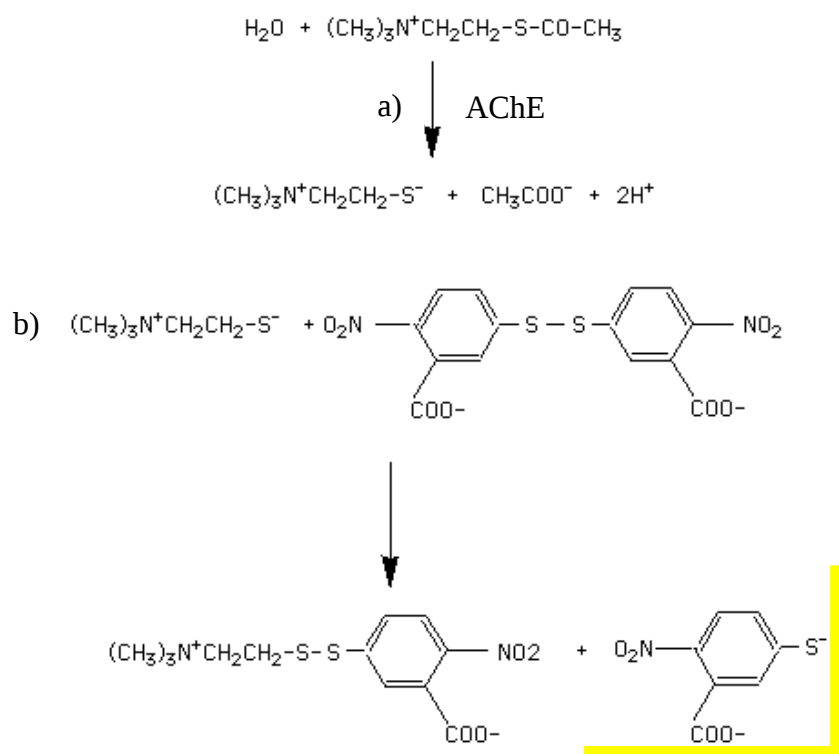
- 100 mM K-fosfatni pufer (K-P) s pH 8,0 je bil že pripravljen, in sicer iz K_2HPO_4 in KH_2PO_4 .
- Izhodiščna koncentracija AChE (izolirane iz električne jegulje) je bila 5 encimskih enot/mL. Pripravili smo jo z redčenjem, tako da smo 5 μ L AChE s koncentracijo 500 encimskih enot/mL zmešali s 495 μ L K-P pufra.
- Substrat - 2 mM acetiltioholinjev klorid smo pripravili tako, da smo v centrifugirko odpipetirali 5 mL ultračiste vode in 10 μ L 1M substrata (acetiltioholinjevega klorida).
- BSA s koncentracijo 1,5 mg/mL smo pripravili tako, da smo 15 mg BSA zmešali z 10 mL ultračiste vode.
- Fizostigmin s koncentracijo 0,2 mmol/mL smo pripravili tako, da smo 4 μ L 25 M fizostigmina zmešali s 500 μ L ultračiste vode. Ko je 25 M fizostigmina zmanjkalo, smo pripravili 1 mL 0,2 mM fizostigmina, tako da smo 0,5507 mg fizostigmina v prahu z molekulsko maso 275,35 g/mol dodali 1 mM K-P pufra s pH 8.

3.2.2 PRIPRAVA NANOMATERIALOV

Suspencijo CB in GO ter MWCNT smo pripravili v ultračisti vodi (1 mg/mL) in sonicirali s paličnim sonikatorjem (Sonics Vibra Cell, Newtown, ZDA) 60 min pri amplitudi 39 % in ciklu 15 s vklop/15 s izklop. Med soniciranjem smo vzorce hladili na ledu. Založne suspencije nanodelcev TiO_2 (20 μ g/mL in 17000 μ g/mL) smo pripravili v vodi in jih sonicirali v ultrazvočni vodni kopeli (250 W, 50 Hz; Sonis 2GT, Iskra Pio d.o.o., Slovenija; 10 minut). Druge vodne suspencije NM so bile pripravljene za ugotavljanje aktivnosti AChE.

3.2.3 UGOTAVLJANJE AKTIVNOSTI ACETILHOLINESTERAZE Z ELLMANOVO METODO

Aktivnost AChE smo ugotovili z modificirano Ellmanovo metodo (Ellman in sodelavci) (44), prilagojeno za izvajanje testov na mikrotitrski plošči po protokolu Mesarič s sodelavci (4) z uporabo VIS čitalca mikrotitrnih plošč (Anthos, UK). Potek Ellmanove reakcije je prikazan na Sliki 5. Pri tej metodi uporabimo acetiltioholin, ki ga AChE hidrolizira na tioholin in acetat. Tioholin nato reducira 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojsko kislino do 5-merkapt-2-nitrobenzojske kisline, ki je rumene barve (43, 44). Količino nastalega produkta merimo spektrofotometrijsko pri valovni dolžini 405 nm.



Slika 5: Ellmanova metoda za ugotavljanje aktivnosti AChE; a) hidroliza tioestra, b) reakcija redukcije (Prevzeto po (44))

3.2.4 UGOTAVLJANJE OPTIMALNE KONCENTRACIJE ENCIMA ZA TEST ADSORPCIJE IN INHIBICIJE

Pred začetkom testa inhibicije in adsorpcije smo v mikrotitrski plošči s 96 vdolbinicami preverili aktivnost AChE. V vsako mikrotitrsko vdolbinico smo odpipetirali 10 µL K-fosfatnega pufru s pH 8,0, 100 µL Ellmanovega reagenta s pH 7,4, 50 µL 2 mM substrata acetiltioholinijevega klorida in 50 µL AChE z različnimi koncentracijami (v posamezne mikrocentrifugirke smo odpipetirali 1 mL K-fosfatnega pufru in določene volumne (od 2 – 14 µL) encima, s koncentracijo 5 encimskih enot/mL). V treh mikrotitrskih vdolbinicah smo imeli negativno kontrolo, kamor smo dodali vse zgoraj opisane reagentne, namesto encima pa smo dodali K-P pufer. Test, pri katerem smo spremljali absorbanco pri 405 nm, je trajal 20 minut. Pri nadaljnjih poskusih inhibicije in adsorpcije smo uporabili encim z optimalno koncentracijo, kjer se je absorbanca reakcijske zmesi po 20 minutah približala 0,8. Test inhibicije in test adsorpcije smo za posamezen NM ponovili trikrat.

3.2.5 INHIBICIJA ACETILHOLINESTERAZE

V označene mikrocentrifugirke smo odpipetirali: 10, 8, 6, 4, 2 μL suspenzije nanodelcev (ND) in v enaki smeri dodali 0, 2, 4, 6, 8 μL K-fosfatnega pufra. V 2-4 mikrocentrifugirke smo odpipetirali samo 10 μL K-fosfatnega pufra, brez ND (negativna kontrola). Naredili smo tudi pozitivno kontrolo, tako da smo v mikrocentrifugirko dodali 10 μL 0,2 mM fizostigmina. V mikrocentrifugirke smo z multikanalno pipeto dodali 50 μL AChE ($A = 0,8$) in inkubirali 10 minut. Po 10-ih minutah smo z multikanalno pipeto v vsako mikrocentrifugirko dodali 100 μL Ellmanovega reagenta in 50 μL 2 mM substrata (5 mL ultračiste vode smo dodali 10 μL 1M acetilholinijevega klorida). Pustili smo, da reakcija teče 5 min. Sledilo je 5 min centrifugiranje napri 12.000g. Po centrifugiranju smo v naslednjih petih minutah iz vsake mikrocentrifugirke odpipetirali 210 μL supernatanta in vzorce nanесли na mikrotitrsko ploščo. Od začetka reakcije do začetka testa na mikročitalcu je moralo miniti 15 minut. Nato smo začeli meriti absorbanco na mikročitalcu in jo merili 5 minut. Meritve aktivnosti AChE so bile opravljene na sobni temperaturi 20 °C.

3.2.6 ADSORPCIJA ACETILHOLINESTERAZE

V označene mikrocentrifugirke smo odpipetirali: 10, 8, 6, 4, 2 μL ND in v enaki smeri dodali 0, 2, 4, 6, 8 μL K-fosfatnega pufra. V 3-4 mikrocentrifugirke smo odpipetirali samo 10 μL K-fosfatnega pufra (negativna kontrola). Naredili smo tudi pozitivno kontrolo, tako da smo v mikrocentrifugirko dodali 10 μL 0,2 mM fizostigmina. V mikrocentrifugirke smo z multikanalno pipeto dodali 50 μL AChE ($A = 0,8$). Sledila je 2 min inkubacija in 4 min centrifugiranje na 13.000 obratih. V še naslednjih 4 min smo supernatante odpipetirali v mikrotitrsko ploščo in v vsako vdolbinico dodali 100 μL Ellmanovega reagenta in 50 μL 2 mM substrata (5 mL ultračiste vode smo dodali 10 μL 1M acetilholinijevega klorida). Sledila je 15 minutna inkubacija in 5 minutna meritev absorbance.

3.2.7 PRIKAZ REZULTATOV

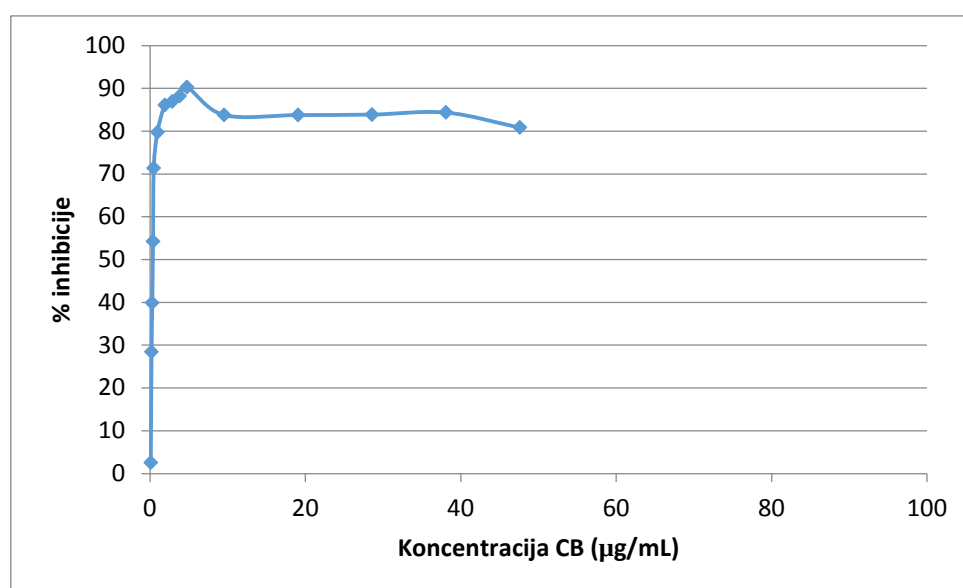
Po tem, ko smo izmerili absorbance, smo le te prenesli in analizirali v Excelovem (Excel, Microsoft) dokumentu (2013). Iz izmerjenih absorbanc smo izračunali odstotek aktivnosti encima (posamezno izmerjeno absorbanco, smo delili z absorbanco negativne kontrole) in nato iz posameznega procenta aktivnosti preračunali % adsorpcije in inhibicije $(= (1 - \text{aktivnost encima}) \cdot 100)$ in rezultat podali grafično kot odstotek treh povprečnih testov adsorpcij/inhibicij v odvisnosti od koncentracije NM ($\mu\text{g/mL}$).

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

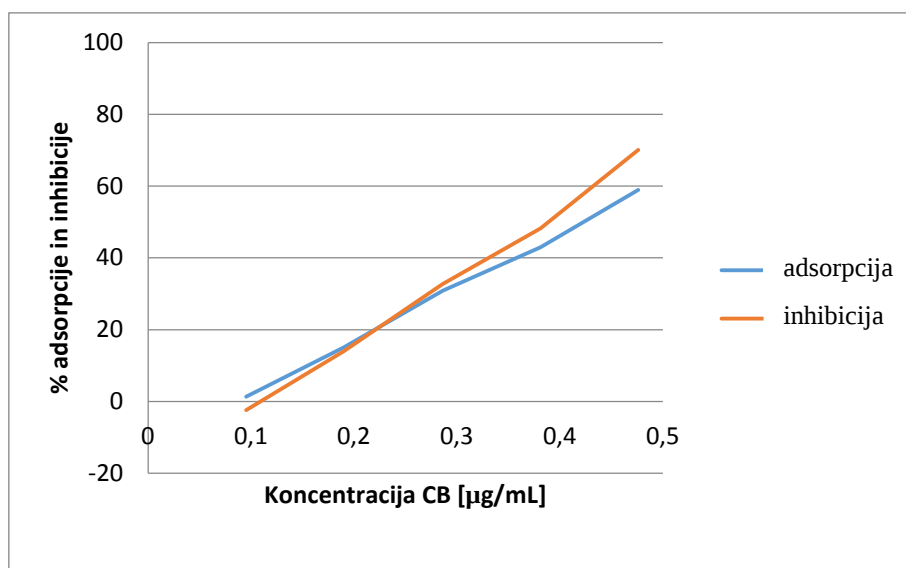
4.1 VPLIV NANOMATERIALOV NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZE

Adsorpcija proteinov ali encimov na površino nanomaterialov je kompleksen proces, ki je odvisen od narave proteina in fizikalno-kemijskih lastnosti NM. Rezultati izvedenih poskusov kažejo, da izbrani NM in njihove koncentracije različno vplivajo na adsorpcijo in inhibicijo AChE izolirane iz električne jegulje. Vpliv NM, ki so povzročili adsorpcijo in inhibicijo encima, je bil opažen v znižani aktivnosti (absorbanci) AChE pri 405 nm v primerjavi z negativno kontrolo (brez dodanega NM). Namreč absorbanca je bila sorazmerna (zmanjšani) aktivnosti AChE.

Rezultati kažejo, da je CB dosegel največjo stopnjo adsorpcije in inhibicije AChE v danem koncentracijskem območju (Slika 6, 7, 8). Prišlo je namreč do 90-odstotne inhibicije encima AChE. Pri koncentraciji 0,35 $\mu\text{g/mL}$ je prišlo do 50-odstotne inhibicije, pri 4 $\mu\text{g/mL}$ pa do 90-odstotne inhibicije (Slika 6 in 7).



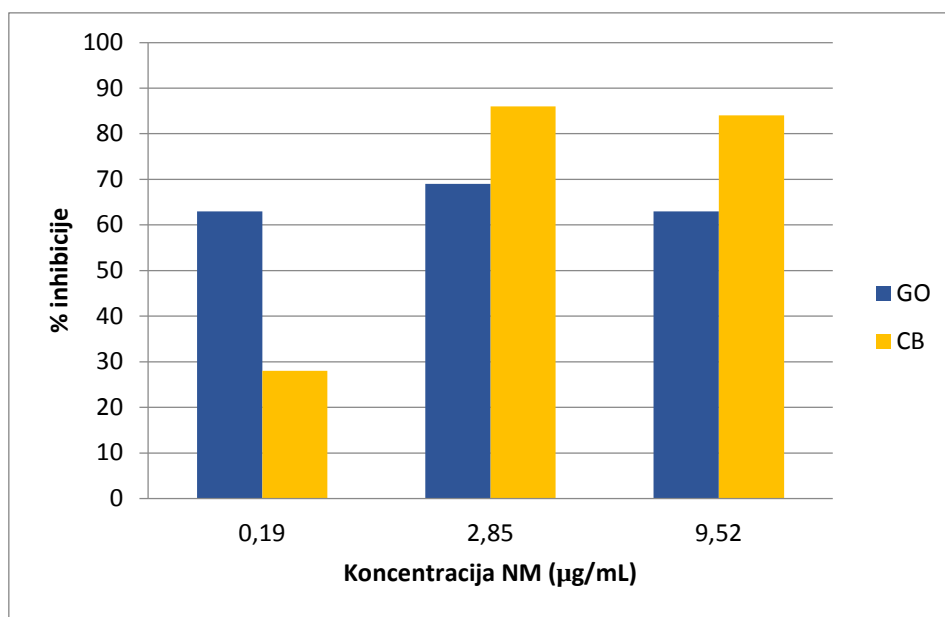
Slika 6: Inhibicija AChE v odvisnosti od koncentracije amorfnega ogljika



Slika 7: Adsorpcija AChE na CB in inhibicija AChE v odvisnosti od koncentracije CB.

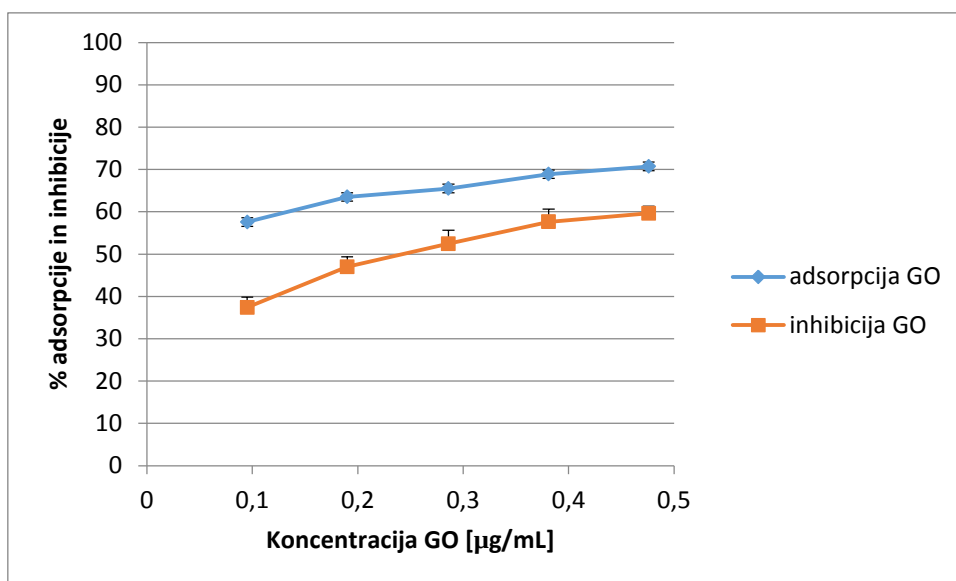
Iz Slike 7 vidimo, da se stopnji adsorpcije in inhibicije skoraj prekrivata, kar pomeni, da inhibicija vsaj delno izvira iz adsorpcije AChE na NM in da je adsorpcija povzročila izgubo aktivnosti AChE. Razne študije nakazujejo, da je do adsorpcije AChE na CB in posledično inhibicije AChE prišlo zaradi hidrofobne strukture CB (2, 4). Prav tako je možno, da je zaradi majhne površinske ukrivljenosti CB prišlo do delne porušitve α -vijačnice AChE, ki je v bližini površine adsorbiranega CB. Ta predel je povezan z aktivnim mestom encima, zato vse strukturne spremembe v tem predelu preprečijo pravilno delovanje encima. Inhibitorni učinek CB lahko pripišemo tudi velikosti delcev (13 nm). Ker so delci CB zelo majhni, imajo večjo specifično površino in posledično večjo kemijsko/biološko aktivnost. V študiji Mesarič in sodelavci so proučevali vpliv CB, GO in fullerena (CB in GO delci so imeli enake fizikalno-kemijske lastnosti in enake izvirne koncentracije (1 mg/mL) kot v našem primeru) na aktivnost vretenčarske in nevretenčarske AChE in prišli do podobnih zaključkov (4).

Inhibitorni učinek CB na aktivnost AChE smo primerjali z GO. Slika 8 prikazuje naraščanje inhibicije GO in CB v odvisnosti od koncentracije. Pri koncentraciji 0,19 $\mu\text{g/mL}$ pride do 63-odstotne inhibicije (pri GO), medtem ko je % inhibicije CB pri isti koncentraciji le 29. Vendar pa pri večjih koncentracijah CB doseže večjo inhibicijo (skoraj 100 %) kot GO. V obeh primerih je opazna nelinearna odvisnost med aktivnostjo AChE in koncentracijo NM. Iz Slike 8 lahko povzamemo, da CB povzroči večji odstotek inhibicije v primerjavi z GO.



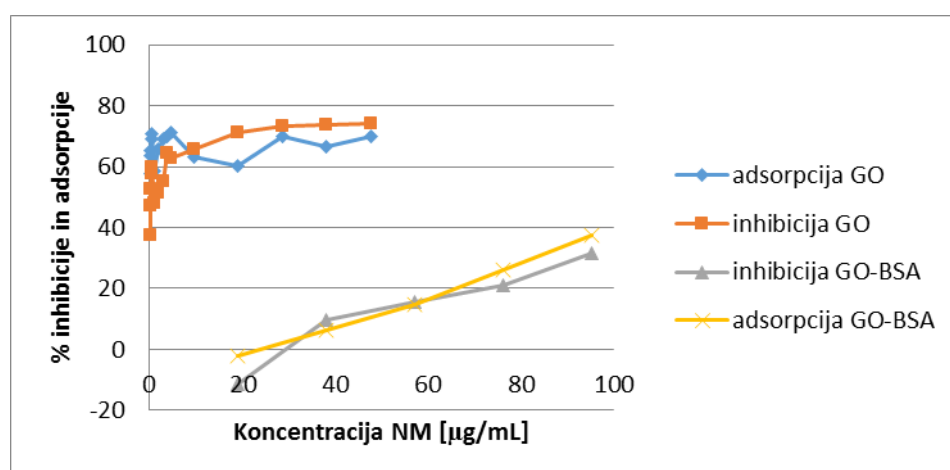
Slika 8: Primerjava inhibicije AChE z grafenovim oksidom in amorfnim ogljikom.

Kot že omenjeno, je tudi pri amfifilnem GO prišlo do signifikantne adsorpcije in inhibicije, vendar je v primerjavi z amorfnim ogljikom, večina adsorbiranega encima ostalo aktivnega (in posledično strukturno nespremenjenega), saj je razlika med vrednostmi adsorpcije in inhibicije GO (Slika 9) v primerjavi s CB (Slika 7) večja. Vzrok za adsorpcijo AChE na GO so elektrostatske in vodikove vezi med funkcionalnimi kisikovimi skupinami GO in AChE. Ker GO ob adsorpciji ni povzročil tako velike inhibicije encimske aktivnosti, lahko sklepamo, da interakcija GO z AChE poteka daleč stran od aktivnega mesta encima in da vodikove in elektrostatske vezi stabilizirajo strukturo encima. Ugotovitve so podobne študiji Mesaričeve in sodelavcev, ki so proučevali vpliv ogljikovih NM (z enakimi specifikacijami NM) na aktivnost vretenčarske in nevretenčarske AChE (4).

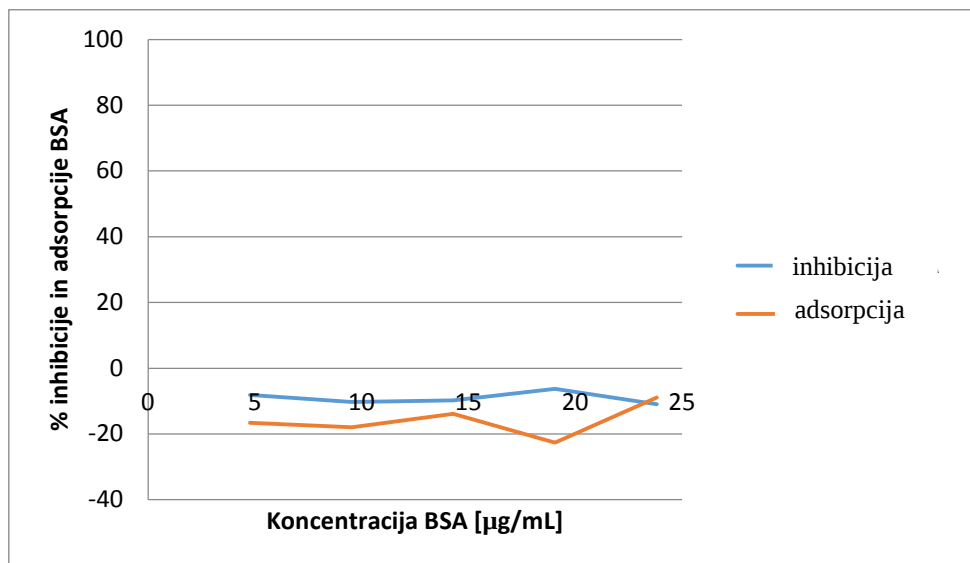


Slika 9: Adsorpcija AChE na GO in inhibicija AChE v odvisnosti od koncentracij GO.

Rezultate adsorpcije in inhibicije GO smo primerjali z GO obloženim z BSA. V tem primeru se je stopnja adsorpcije in inhibicije pričakovano znižala (Slika 10) in sicer zaradi adsorpcijskih sposobnosti albumina. Sklepamo, da je albumin zaradi vezave na GO zmanjšal število vodikovih in elektrostatskih vezi med GO in AChE. Tako obloženi nanodelci so posledično manj toksični in bolj biokompatibilni. Kljub zmanjšani toksičnosti je GO, obložen z BSA, povzročil od koncentracije odvisno adsorpcijo in inhibicijo. Stopnja adsorpcije je večinoma večja kot stopnja inhibicije, kar pomeni, da inhibicija vsaj delno izhaja iz adsorpcije AChE na GO (Slika 10).



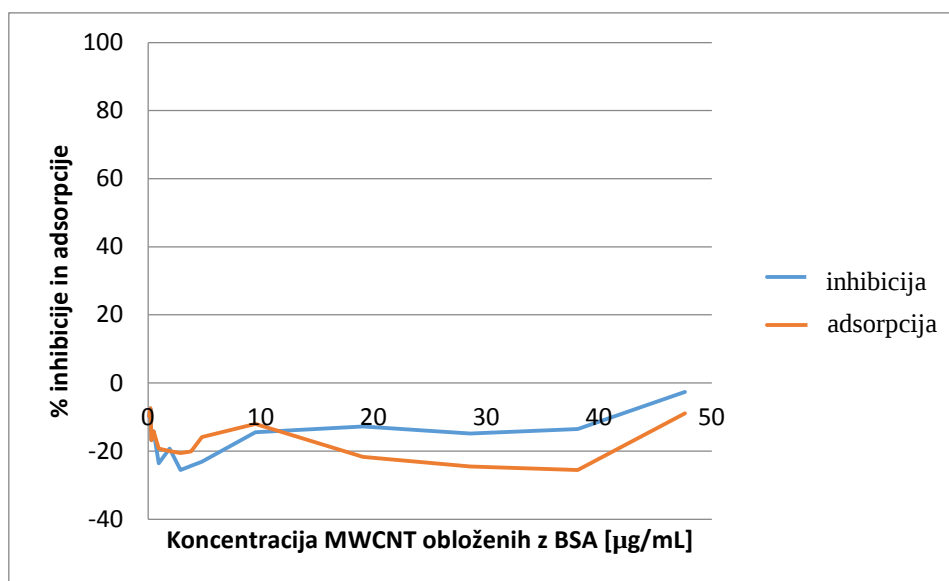
Slika 10: Adsorpcija AChE na obložen in neobložen GO in inhibicija AChE v odvisnosti od koncentracije nanomaterialov: grafenovega oksida



Slika 11: Vpliv BSA na aktivnost AChE.

Na Grafu 11 je prikazan vpliv BSA na aktivnost AChE. Povzamemo lahko, da v koncentracijskem območju od 5-25 µg/mL BSA nima vpliva na aktivnost AChE oz. se ne adsorbira na encim in ne povzroča inhibicije.

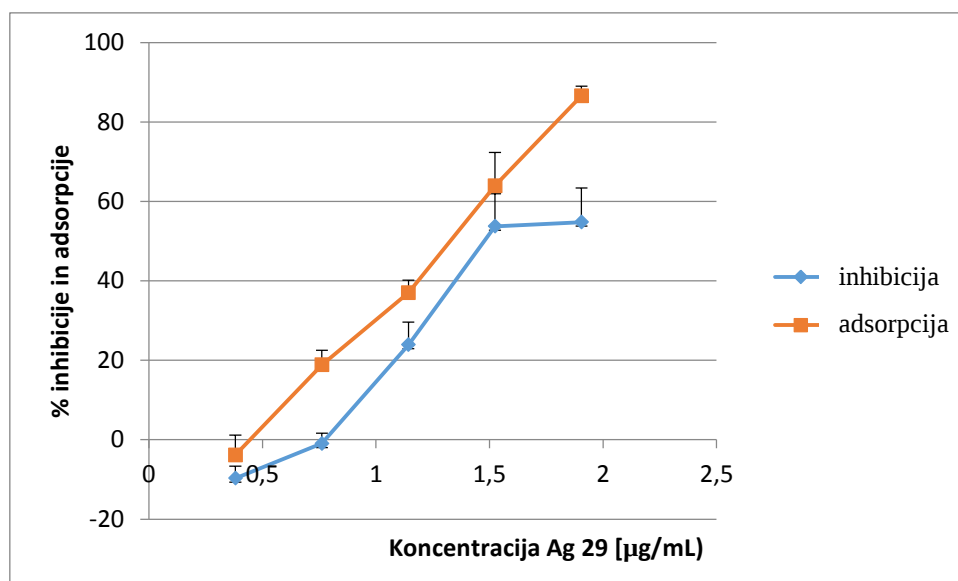
Z BSA smo obložili tudi večplastne ogljikove nanocевke (MWCNT) in ugotovili, da MWCNT obložene z BSA v koncentracijskem območju od 0,095-47,62 µg/mL nimajo vpliva na aktivnost AChE (Slika 12). Vzrok za to je lahko v premajhni dodani koncentraciji NM. Wang in sodelavci poročajo (3), da neobloženi MWCNT, ki imajo povprečno velikost delcev 71 nm, povzročajo inhibicijo AChE (neznan izvor). Omenjeni nanodelci, ki niso bili obloženi z BSA, so povzročili 76-odstotno inhibicijo AChE pri koncentraciji 800 mg/mL, v našem primeru pa je bila minimalno uporabljena koncentracija le 50 µg/mL. Prav tako je velika verjetnost, da je dodatek BSA znižal inhibitorne učinke MWCNT. Če primerjamo MWCNT (obložene z BSA) (Slika 12) z GO (obloženim z BSA) (Slika 10) vidimo, da je v primeru GO, obloženega z BSA, prišlo do inhibicije AChE. Vzrok za to razliko so nakazali v študiji Sopotnikove in sodelavcev (8), kjer so proučevali ogljikove NM z enako karakterizacijo kot v našem primeru in prišli do sklepa, da imajo MWCNT večjo afiniteto do BSA kot GO, zato lahko GO bolje adsorbira AChE in povzroča inhibicijo katalizne aktivnosti encima. Prav tako so v študiji nakazali, da imajo MWCNT največjo površinsko ukrivljenost v primerjavi z GO in CB in posledično manjšo inhibicijsko sposobnost AChE (el. jegulje).



Slika 12: Vpliv MWCNT obloženih z BSA na aktivnost AChE.

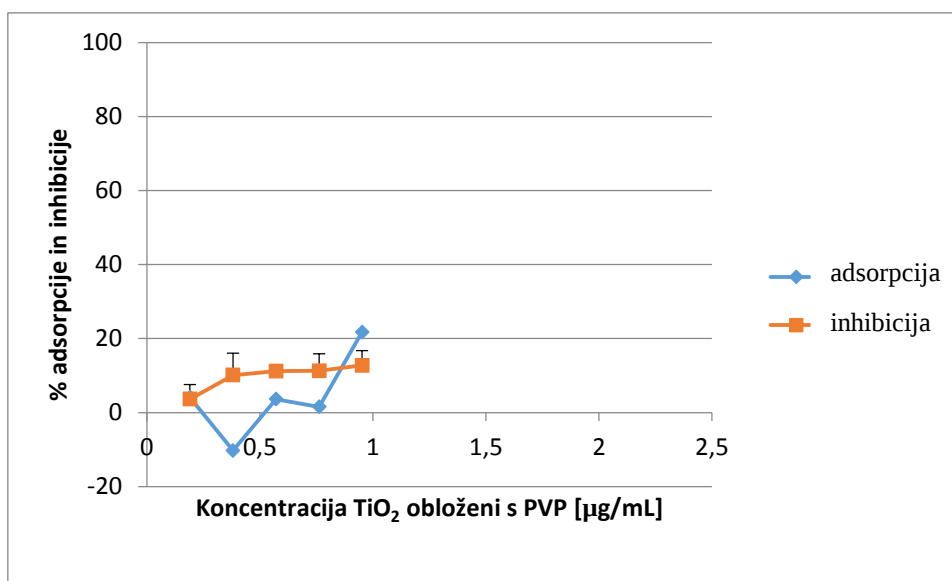
Tudi srebrovi nanodelci so povzročili od koncentracije odvisno adsorpcijo in inhibicijo. Iz Slike 13 vidimo, da odstotek inhibicije z naraščajočo koncentracijo nanodelcev Ag 29 narašča, medtem ko pri adsorpciji vidimo skoraj linearno naraščanje adsorpcije s koncentracijo NM. Ag 29 z naraščajočo koncentracijo vpliva na aktivnost encima; ga inhibira. Razne študije *in vitro* so pokazale, da srebrovi NM¹⁹ inhibirajo humano AChE kot tudi BuChE in da je inhibicija odvisna zlasti od adsorpcije AChE na površino srebra. Prav tako zaključujejo, da lahko inhibicijo povzročajo tudi disociirani kovinski ioni v fiziološkem mediju. Ioni povzročijo nastanek reaktivnih kisikovih spojin (ROS), ki lahko poškodujejo DNA, encime ter proteine (bakterijske in humane) (20).

¹⁹ NM niso imeli enakih specifikacij kot v našem primeru.



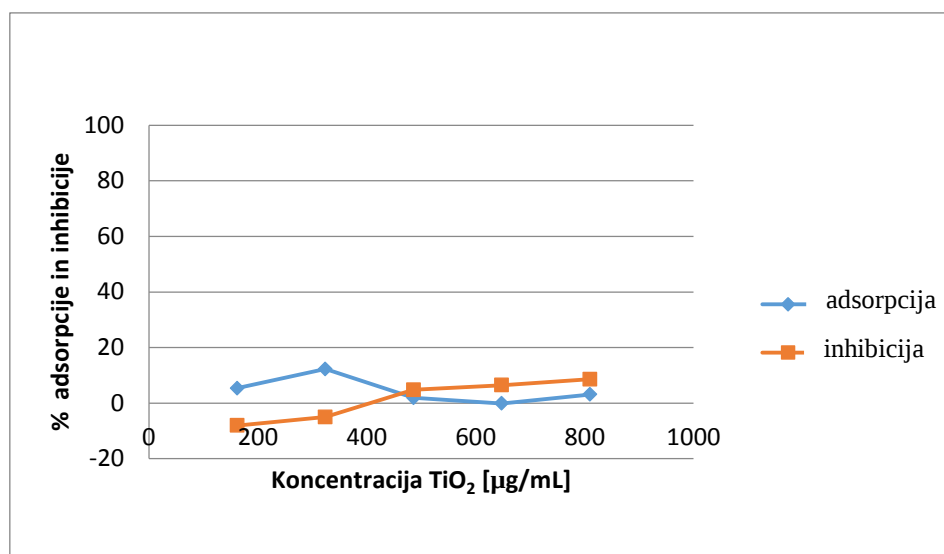
Slika 13: Adsorpcija AChE na Ag in inhibicija AChE v odvisnosti od koncentracije srebra

NM, ki niso imeli pomembnega vpliva na aktivnost encima, so bili: MWCNT obložene z BSA, AuC, TiO₂, silika, silika, funkcionalizirana s karboksilno skupino (Slika 14, 15, 16, 17, 18 in 19). Silika, funkcionalizirana z aminske skupino, ima v primerjavi s siliko in siliko, funkcionalizirano s karboksilno skupino, največji učinek na aktivnost AChE, saj iz Slike 16 vidimo, da odstotek inhibicije pri koncentraciji večji od 20 µg/mL nekoliko narašča - verjetno zaradi pozitivno nabite NH₂ skupine, kamor se najbolj učinkovito veže AChE, katere neto naboj je negativen. Poskus bi bilo treba ponoviti z večjo koncentracijo SiO₂, obloženega z NH₂. Tega nismo storili, zaradi omejenih zalog NM. Tudi pri nanodelcih TiO₂, obloženih s PVP (Slika 14), smo dobili nekoliko nezanesljive rezultate. Prišlo je do nepričakovane inhibicije AChE. Pričakovali smo, da bo oblaganje TiO₂ s PVP znižalo toksičnost TiO₂. Vzroki, zakaj ni prišlo do vpliva drugih NM na aktivnost AChE, so v majhnem adsorpcijskem potencialu NM, ki je posledica večje površinske ukrivljenosti (MWCNT so zaradi večje površinske ukrivljenosti v primerjavi z GO in CB manj učinkoviti adsorbenti), hidrofilnosti (anorganski oksidi in kovinski NM so bolj hidrofilni kot ogljikovi), premajhne dodane koncentracije NM, manjšega zeta potenciala, ki je ocena za naboj na površini delcev in velikosti NM (manjši delci so zaradi večje specifične površine bolj kemijsko/biološko aktivni in imajo večjo afiniteto do bioloških molekul, kot je AChE).



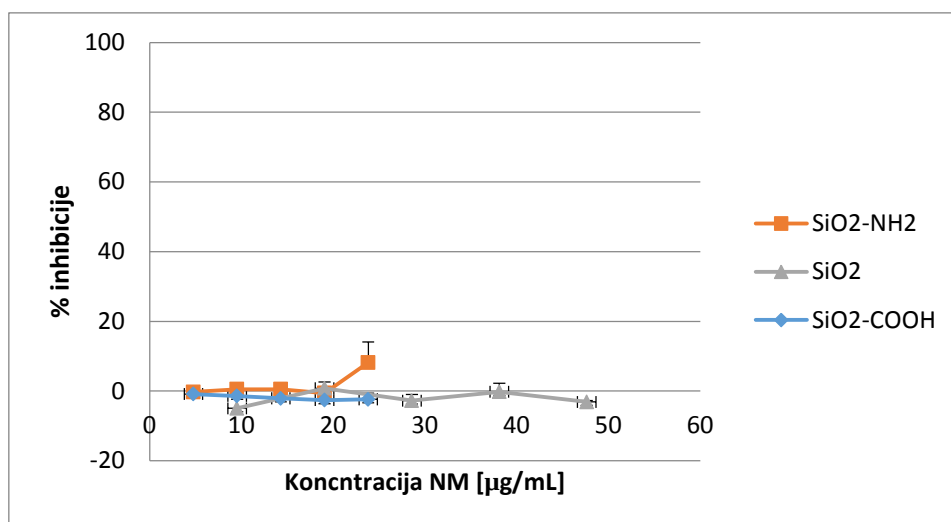
Slika 14: Vpliv TiO₂ obloženega s PVP na aktivnost AChE.

Iz Slike 14 vidimo, da odstotek inhibicije in adsorpcije z naraščajočo koncentracijo TiO₂, obloženega s PVP, nekoliko narašča.



Slika 15: Vpliv TiO₂ na aktivnost AChE.

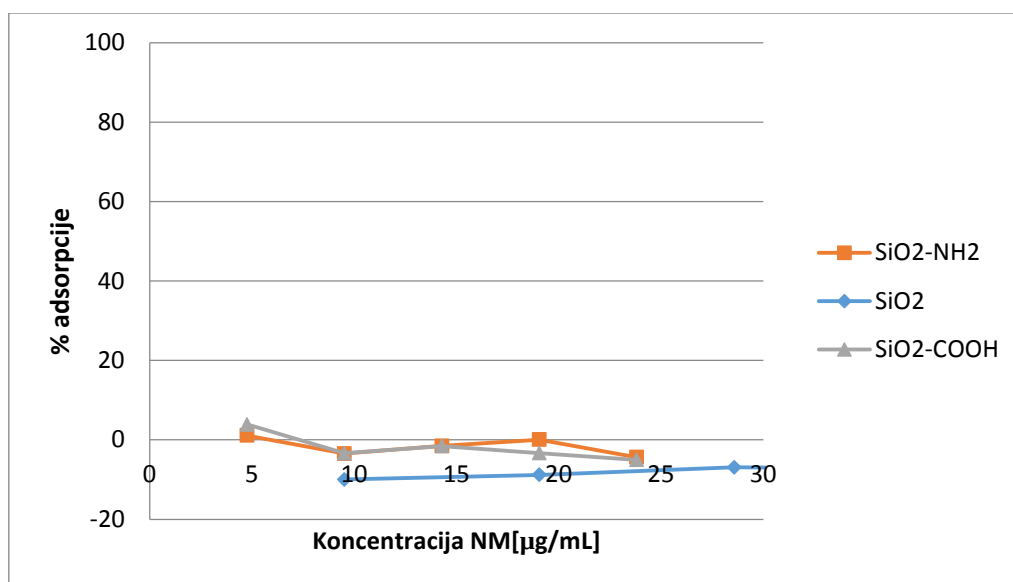
Iz Slike 15 vidimo, da odstotek inhibicije s naraščanjem koncentracije TiO₂ nekoliko narašča, vendar pa lahko povzamemo, da TiO₂ v koncentracijskem območju od 161,9 - 809,52 µg/mL nimajo opaznega vpliva na aktivnost encima (povečan odstotek inhibicije je lahko posledica napake pri delu).



Slika 16: Vpliv silike, silike, funkcionalizirane s karboksilno oz. amsko skupino, na inhibicijo AChE.

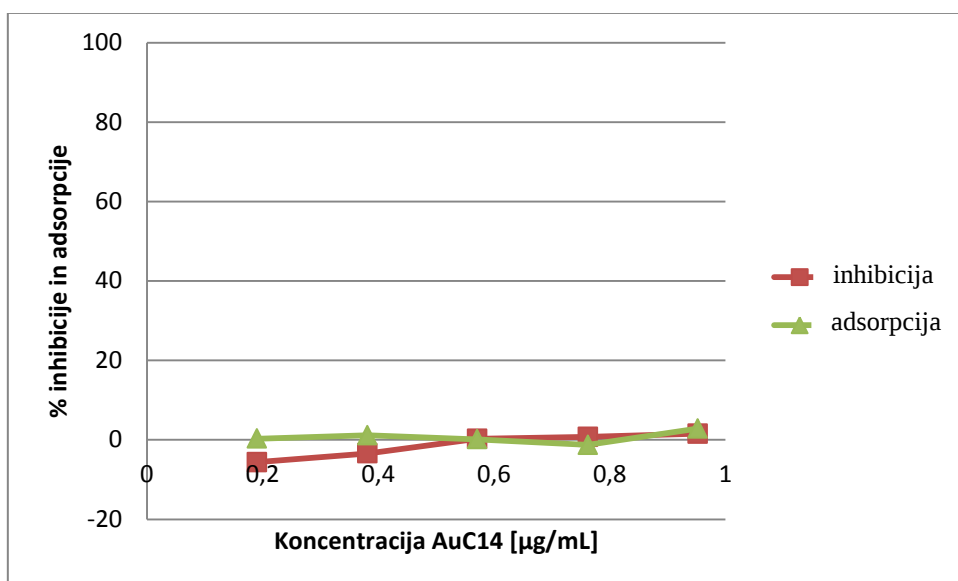
Iz Slike 16 vidimo, da v koncentracijskem območju od 4.37-39,1 $\mu\text{g/mL}$, silika in silika, funkcionalizirana s karboksilno skupino, nimata pomembnega vpliva na adsorpcijo in inhibicijo AChE.

Tudi silika, funkcionalizirana z amino skupino, pri koncentracijah od 0 do 20 $\mu\text{g/mL}$ nima opaznega vpliva na aktivnost encima (Slika 16).

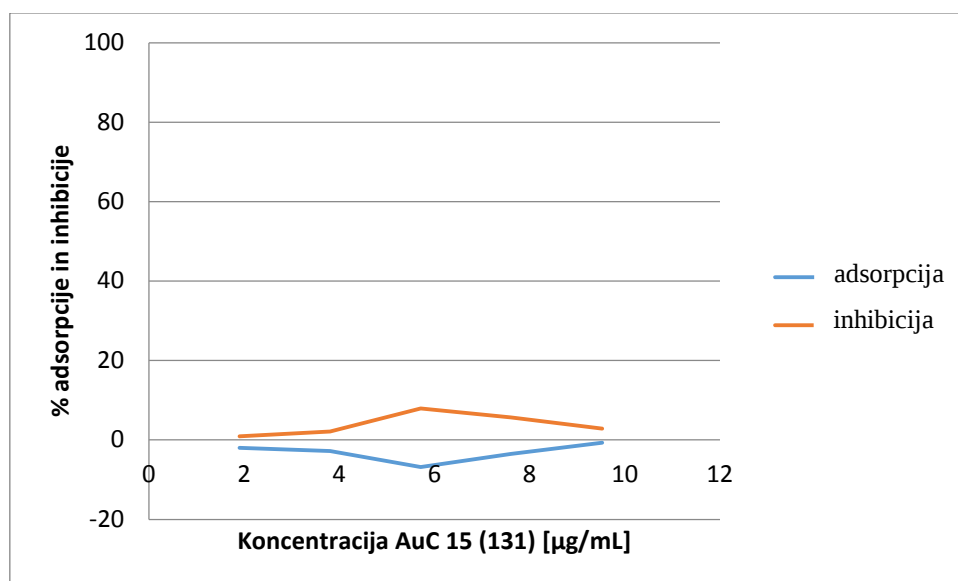


Slika 17: Vpliv silike, silike, funkcionalizirane s karboksilno oz. amsko skupino, na adsorpcijo AChE.

Slika 17 prikazuje, da NM silike, silike, funkcionalizirane s karboksilno oz. amsko skupino, v izbranem koncentracijskem območju ne adsorbirajo AChE.

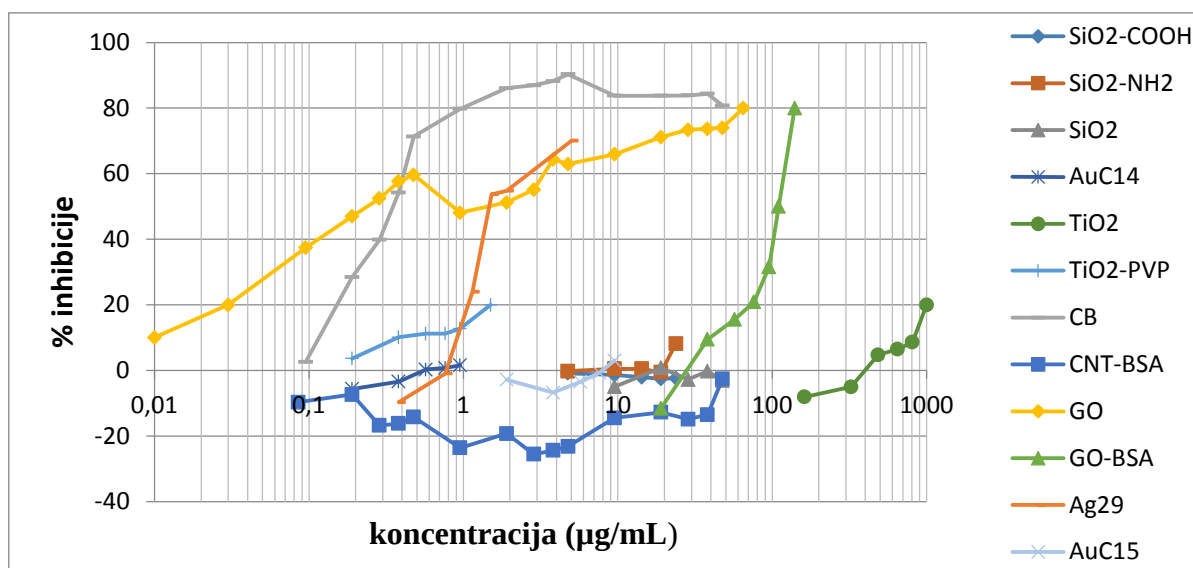


Slika 18: Vpliv AuC14 na aktivnost AChE.

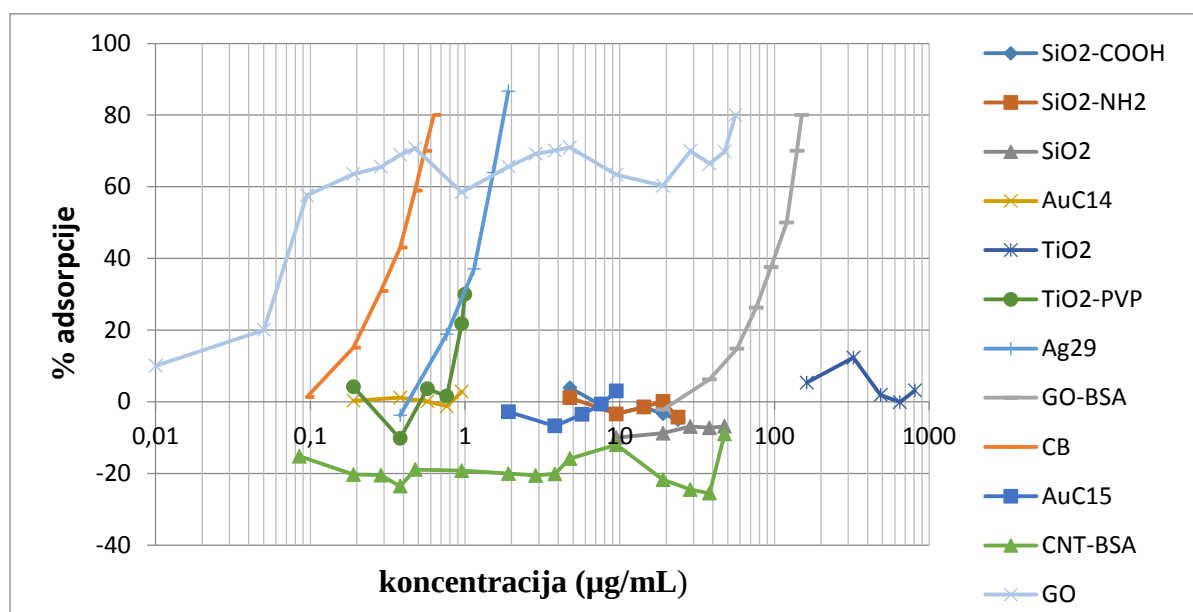


Slika 19: Vpliv AuC15 na aktivnost AChE.

Sliki 18 in 19 prikazujeta, da AuC 14 in 15 v koncentracijskem območju od 0,19-9,52 µg/mL nimata vpliva na aktivnost AChE. Vzrok, zakaj ni prišlo do adsorpcije AChE na AuC 14 in 15, je težko opredeliti, saj so delci glede karakterizacije poslovna tajnost.



Slika 20: Primerjava inhibicij AChE z različnimi NM.



Slika 21: Primerjava adsorpcijske stopnje AChE na različne NM.

Vpliv NM na aktivnost AChE, prikazan na Sliki 20 in 21, je posledica skupka vseh lastnosti NM (površinska ukrivljenost, struktura, zeta-potencial, velikost, hidrofobnost/hidrofilnost, koncentracija, število NM, itd.). Povzamemo lahko, da imajo proučevani NM različne učinke na inhibicijo katalizne aktivnosti AChE. Prav tako je razvidno, da so inhibicijo AChE povzročili tisti NM, ki so adsorbirali AChE. To so po vrstnem redu bili: CB > GO > Ag > GO obložen z BSA. NM, ki niso adsorbirali AChE, niso povzročili inhibicije encima.

Na podlagi teh ugotovitev, lahko potrdimo predpostavko, ki so jo navedli številni avtorji (2, 3, 17), in sicer, da inhibicija AChE (z NM) vsaj delno izvira iz adsorpcije AChE na površino NM.

Čebela je v svoji diplomski raziskoval vplive ogljikovih NM in NM TiO₂ (NM z enakimi specifikacijami, kot jih imajo delci, ki smo jih proučevali) na celice sesalcev in prišel do ugotovitve, da so zgradba in struktura (npr. amorfna, kristalna) NM ter inhibicija AChE (el. jegulje) z NM najpomembnejši dejavniki, ki vplivajo na to, kako bo NM toksičen za sesalske celice (zeta potencial in velikost NM nista imela pomembnega vpliva) (45). Na podlagi rezultatov njegove študije je prišel do sklepa, da je zmanjšana aktivnost AChE z NM dober napovednik za toksičnost istega NM na celice oz., da lahko inhibicijo in adsorpcijo AChE uporabimo kot biološki deskriptor za napovedovanje toksičnosti NM. Tudi študija Wanga in sodelavcev navaja, da lahko tisti NM, ki povzročajo inhibicijo AChE, uvrstimo med kazalnike (biomarkerje) (nevro)toksičnosti (3). V našem primeru je z največjo povzročeno inhibicijo AChE glavni kazalnik (nevro)toksičnosti CB.

5 SKLEP

V preteklih desetih letih je nanotehnologija zaradi specifičnih fizikalno-kemijskih lastnosti nanomaterialov (NM) postala ena izmed vodilnih tehnologij. Čeprav obstaja veliko objavljenih člankov o učinkih nanomaterialov na biološke sisteme, je za zdaj le malo znanega o interakcijah ogljikovih, kovinskih in oksidnih NM s proteini in encimi živih sistemov. Zaradi neraziskanih lastnosti omenjenih NM smo s pomočjo Ellmanove metode raziskali vpliv izbranih inženirsko proizvedenih NM na aktivnost AChE, izolirane iz električne jegulje in iz literature ter rezultatov sklepali, na kakšen način vplivajo na aktivnost encima.

- Največji vpliv na katalizno aktivnost AChE, izolirane iz električne jegulje, je bil opazen pri ogljikovih NM (CB in GO), sledili so kovinski (Ag) in nato oksidni NM (NM silike in titanovega dioksida).
- Potrdili smo hipotezo, da je CB zaradi velike adsorpcijske sposobnosti, ki je posledica hidrofobne amorfne strukture, majhne velikosti in majhne površinske ukrivljenosti, izmed vseh uporabljenih NM, povzročil največjo stopnjo inhibicije AChE, izolirane iz električne jegulje. Namreč že pri zelo majhni koncentraciji (4 $\mu\text{g/mL}$) je povzročil 90-odstotno inhibicijo AChE.
- Pri GO je bila razlika med vrednostmi adsorpcije in inhibicije GO v primerjavi s CB večja, kar pomeni, da je AChE po vezavi na GO ohranila večino katalizne aktivnosti.
- Iz rezultatov lahko potrdimo hipotezo, da se je ogljikovim delcem, ki smo jih obložili z BSA, znižal inhibitorni učinek na AChE, ker se je BSA vezal na nanodelce in s tem znižal njihov adsorpcijski potencial. NM, ki smo jih obložili z BSA, imajo različno afiniteto do BSA. Podobno, kot so ugotovili v študiji Sopotnikove in sodelavcev (8), smo tudi v našem primeru prišli do zaključka, da ima GO manjšo afiniteto do BSA kot CNT, ker je ob adsorpciji AChE na GO, obložen z BSA, prišlo do največ 40-odstotne inhibicije, medtem ko v primeru CNT, obloženih z BSA, do inhibicije AChE ni prišlo.
- Čeprav je mehanizem interakcije NM s holinesterazami še vedno predmet mnogih raziskav, lahko iz rezultatov kot tudi iz številnih študij sklepamo, da adsorpcija encima na NM pogosto vodi v konformacijske spremembe oz. inaktivacijo/inhibicijo encimov, kot je AChE. Ta parameter bi lahko uporabili kot biomarker izpostavljenosti in nevrotoksičnosti nanomaterialov. AChE je namreč eden izmed glavnih encimov v krvi,

živčnem sistemu in možganih in je pogosto tudi tarča nekaterih NM, ki lahko z inhibicijo encima znatno oslabijo delovanje živčnega sistema.

6 VIRI

- (1) Remškar M: Nanodelci in nanovarnost. Ministrstvo za zdravje, Urad RS za kemikalije, Ljubljana 2009;1-30.
- (2) Mesarič T, Sepčič K, Drobne D: Vplivi ogljikovih nanomaterialov na izbrane biološke sisteme. Ekolist 2014; 26-30.
- (3) Wang Z, Zhao J, Li F, Xing B: Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. Chemosphere 2009; 77: 67-73.
- (4) Mesarič T, Lokesh B, Drašler B, Drobne D, Makovec D, Dušak P, Dhawan A, Sepčič K: Effects of surface curvature and surface characteristics of carbon-based nanomaterials on the adsorption and activity of acetylcholinesterase 2013;62:222-224.
- (5) Wang Z, Zhang K, Zhao J, Liu X, Xing B: Adsorption and inhibition of butyrylcholinesterase by different engineered nanoparticles. Chemosphere 2010; 79: 86-92.
- (6) Shafferman A, Ordentlich A, Barak D, Kronman C, Ber R, Bino T, Ariel N, Osman R, Velan B: Electrostatic attraction by surface charge does not contribute to the catalytic efficiency of acetylcholinesterase. EMBO journal 1994; 13(15): 3448-3449.
- (7) Rahman M, Laurent S, Tawil N, Yahia L, Mahmoudi M: The Bio-Nano Interface. Protein-Nanoparticle Interactions. Springer Berlin Heidelberg, 2013; Chapter 2: 29-33.
- (8) Sopotnik M, Leonardi A, Mesarič T, Dušak P, Križaj I, Urlih Poklar N, Sepčič K, Drobne D: Comparative study of serum protein binding to three different carbon-based nanomaterials. Carbon 2015; 95: 560-572
- (9) Fu R, Wang C, Zhuang J, Yang W: Adsorption and desorption of DNA on bovine serum albumin modified gold nanoparticles. Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp. 2014; 444: 326–329.
10. Afsharan H, Hasanzadeh M, Shadjou N, in sod. Interaction of some cardiovascular drugs with bovine serum albumin at physiological conditions using glassy carbon electrode. A new approach. Materials Science and Engineering: C 2016; 65: 97-108.
11. Ravindran A, Singh A. in sod.: Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA). Colloids Surf B Biointerfaces. 2010; 76(1):32-7.
12. Kuchlyan J, Kundu N, Banik D in sod.: Spectroscopy and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy To Probe the Interaction of Bovine Serum Albumin with Graphene Oxide. Langmuir 2015; 31(51): 13793-13801.
13. Huskić M: Hibridni materiali in polimerni nanokompoziti. Visoka šola za tehnologijo polimerov, Slovenj Gradec 2014; 19-33.
14. http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.graphenomenon.com/&gws_rd=cr&ei=xzuGV7erG4ata6bxkpgO (22. 7. 2016).

15. Putri K L, Tan L L in sod.: Graphene oxide: Exploiting its unique properties toward visible-light-driven photocatalysis. *Applied materials today* 2016; 4: 9-16.
16. Zhang C, Luo S, Chen W: Activity of catalase adsorbed to carbon nanotubes: Effects of carbon nanotube surface properties. *Talanta* 2013; 113: 142–147.
17. Zuo G, Zhou X, Huang Q, Fang H, Zhou R: Adsorption of villin headpiece onto graphene, carbon nanotube and C60: effect of contacting surface curvatures on binding affinity. *Journal of Physical Chemistry* 2011; 115(47): 23323–23328.
18. Hussain S., Boland S., Baeza-Squiban A., Hamel R., Thomassen L. C. J., Martens J. A., Billon-Galland M. A., Fleury-Feith J., Moisan F., Pairon J. C., Marano F. 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*, 260, 1-3: 142-149.
19. Ruh H., Kuhl B., Brenner-Weiss G., Hopf C., Diabate S., Weiss C. 2012. Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials. *Toxicology Letters*, 208, 1: 41-50.
20. Šinko G, Vinkovič I, Goessler W in sod.: Alteration of cholinesterase activity as possible mechanism. *Environ Sci Pollut Res* 2014; 21:1391–1400.
21. Šinko G, Vinkovič I: Inactivation of cholinesterases by silver and gold ions in vitro. *Central European Journal of Chemistry* 2013; 11(6): 935-944.
22. Chen Y, Chen J, Dong J, Jin Y: Comparing study of the effect of nanosized silicon dioxide and microsized silicon dioxide on fibrogenesis in rats. *Toxicol. Ind. Health* 2004; 20: 21–27.
23. Peters K, Unger R.E, Kirkpatrick C J, Gatti A M, Monari E: Effects of nano-scaled particles on endothelial cell function in vitro: Studies on viability, proliferation and inflammation. *J. Mater. Sci., Mater. Med.* 2004; 15: 321–325.
24. Chen, M, von Mikecz A: Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO₂ nanoparticles. *Exp. Cell Res.* 2005; 305: 51–62.
25. Xue Z G, Zhu S H, Pan Q, Liang D S, Li Y M, Liu X H, Xia K, Xia J H: Biotoxicology and biodynamics of silica nanoparticle. *Journal of Central South University. Medical Science* 2006; 31: 6–8.
26. Weisheng Lin, Yue-wern Huang, Xiao-Dong Zhou, Yinfu Ma: In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006; 217: 252–259.
27. Shi H, Magaye R, Castranova V in Zhao J: Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Journal list particle fibre toxicology* (2013); 10: 15.
28. Liao C M, Chiang Y H, Chio C P: Assessing the airborne titanium dioxide

- nanoparticle-related exposure hazard at workplace. *J. Hazard. Mater* 2009; 162: 57-65.
29. Medina C, Santos-Martinez, M J, Radomski A, Corrigan O I, Radomski M W: Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *Br. J. Pharmacol.* 2007; 150: 552–558.
 30. Jaberolansar E, Kameli P, Ahmadvand H in Salamati H: Synthesis and characterization of PVP-coated $\text{Co}_0.3\text{Zn}_0.7\text{Fe}_2\text{O}_4$ ferrite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 2016; 404: 21-23.
 31. Pohanka M: Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers* 2011; 155(3): 219-223.
 32. Pohanka M: Cholinesterases in Biorecognition and Biosensors Construction: A review. *Analytical Letters* 2013; 46(12):1849-1868.
 33. Burtis C A, Ashwood E R., Bruns D E, Tietz: *Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. Elsevier Saunders 2005; 22. poglavje: 592-594.
 34. http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://neuroscience.uth.tmc.edu/s1/chapter11.html&gws_rd=cr&ei=O_OUV6OSGsHzaMS1m8gI (24. 7. 2016)
 35. Zimmermann M: Neuronal AChE splice variants and their non-hydrolytic functions: redefining a target of AChE inhibitors? *British Journal of Pharmacology* 2013; 170: 953–967.
 36. <https://de.wikipedia.org/wiki/Acetylcholin> (24. 7. 2016).
 37. Worek F, Reiter G, Eyer P, Szinicz L: Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species organophosphates. *Arch. Toxicol.* 2002; 76: 523–529.
 38. Simon S, Massoulie J: Cloning and Expression of Acetylcholinesterase from *Electrophorus*. Splicing pattern of 3'exons in vivo and in transfected mammalian cells. *The Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 33045.
 39. http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.thomassci.com/Chemicals/Reagent-A/ /Acetylcholinesterase-from-Electrophorus-electricus-electric-eel-Type-V-S-lyophilized-powder-1000-units/mg-protein&gws_rd=cr&ei=MO2HV8boF8GwatruueAJ (23. 7. 2016).
 40. Alzheimer's, Memory, And Acetylcholine. Datum vpogleda: 4. 1. 2016. <http://www.psyweb.com/Documents/00000003.jsp>
 41. Weiner L, V L Shnyrov, L Konstantinovskii, E Roth, Y Ashani, and I Silman: Stabilization of *torpedo californica* acetylcholinesterase by reversible inhibitors. *Biochemistry* 2009; 48: 563–574.

42. Macdonald I R, E Martin, T L Rosenberry, S Darvesh: Probing the peripheral site of human butyrylcholinesterase. *Biochemistry* 2012; 51: 7046–7053.
43. Holas O, Musilek K, Pohanka M, Kuca K: The progress in the cholinesterase quantification methods. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2012.
44. Ellman G L, Courtney D, Andres V, Featherstone R M: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 1961; 7: 88-95.
45. Čebela J: Urejanje podatkov o vplivu nanomaterialov na encime za statistično obdelavo in računalniško modeliranje. Katedra za zoologijo. Oddelek za biologijo Biotehniška fakulteta. Univerze v Ljubljani 2016.