

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEJA BREZOVAR

**OPTIMIRANJE IZDELAVE DISPERZIJE NANODELCEV  
TiO<sub>2</sub> IN UGOTAVLJANJE VARNOSTI NA CELIČNI LINIJI  
KERATINOCITOV**

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, junij 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TEJA BREZOVAR

**OPTIMIRANJE IZDELAVE DISPERZIJE NANODELCEV  
TiO<sub>2</sub> IN UGOTAVLJANJE VARNOSTI NA CELIČNI LINIJI  
KERATINOCITOV**

**OPTIMIZATION OF TiO<sub>2</sub> NANOPARTICLES DISPERSION  
PREPARATION AND ASSESSMENT OF ITS SAFETY ON  
KERATINOCYTE CELL LINE**

DIPLOMSKA NALOGA  
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, junij 2010

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko tehnologijo. Analizo vzorcev keratinocitov s SEM in TEM so opravili na Inštitutu za biologijo celice Medicinske fakultete.

### **Izjava**

**Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod vodstvom mentorice prof. dr. Julijane Kristl in somentorice asist. dr. Petre Kocbek.**

Diplomantov lastnoročni podpis

Za strokovno pomoč, potrpežljivost in dosegljivost pri izdelavi diplomske naloge se iskreno zahvaljujem somentorici dr. Petri Kocbek.

Za vzpodbudo pri delu se zahvaljujem prof. dr. Julijani Kristl.

Iskrena hvala tudi mladi raziskovalki Karmen Teskač za nesebično pomoč pri izvedbi laboratorijskega dela diplomske naloge.

Zahvala gre tudi izr. prof. dr. Mateji Erdani Kreft za pomoč pri SEM in TEM mikroskopiji keratinocitov ter pri interpretaciji dobljenih rezultatov.

Zahvala tudi mojim bližnjim za podporo pri doseganju tega cilja.

Teja Brezovar

Ljubljana, junij 2010

### **Predsednik diplomske komisije:**

- zasl. prof. dr. Aleš Krbavčič

### **Člani diplomske komisije:**

- prof. dr. Julijana Kristl
- doc. dr. Lucija Peterlin Mašič
- asist. dr. Petra Kocbek

# VSEBINA

VSEBINA .....	3
POVZETEK .....	5
ABSTRACT .....	7
SEZNAM OKRAJŠAV .....	9
1 UVOD .....	11
1.1 Nanodelci.....	11
1.2 Vstop nanodelcev v organizem in njihove interakcije s celicami.....	13
1.3 Toksičnost nanodelcev .....	16
1.4 Nanodelci in okolje .....	18
1.5 Titanov dioksid .....	19
1.6 Uporaba TiO <sub>2</sub> v farmaciji in v kozmetiki.....	21
1.7 Toksičnost TiO <sub>2</sub> .....	25
1.8 In vitro metode določanja toksičnosti ND na celičnih kulturah .....	28
1.9 Zakonodajni vidik .....	31
2 NAMEN DELA .....	33
3 MATERIALI IN METODE .....	34
3.1 Materiali .....	34
3.2 Aparature .....	35
3.3 Priprava disperzije nanodelcev TiO <sub>2</sub> .....	36
3.4 Presajanje celic in poskusi na celicah .....	38
3.5 Vrednotenje učinkov TiO <sub>2</sub> na keratinocitih po kratkotrajni izpostavitvi .....	40
3.6 Vrednotenje učinkov TiO <sub>2</sub> na keratinocitih po dolgotrajni izpostavitvi .....	43
4 REZULTATI in RAZPRAVA .....	46
4.1 Izdelava in vrednotenje disperzije nanodelcev TiO <sub>2</sub> .....	46
4.2 Kratkotrajna izpostavitve celične kulture keratinocitov nanodelcem TiO <sub>2</sub> .....	50

4.3	Dolgotrajna izpostavitvev celične kulture keratinocitov nanodelcem TiO <sub>2</sub> .....	54
5	SKLEP .....	65
6	LITERATURA .....	67

## ***POVZETEK***

Nanodelci titanovega dioksida se pogosto uporabljajo kot pigment ali UV-filter v pripravkih za dermalno uporabo. Dermalna izpostavitve nanodelcem titanovega dioksida pogosto traja dalj časa, podatki o njegovi varnosti pa so dandanes še zelo pomanjkljivi.

V prvem delu smo optimirali metodo priprave disperzije nanodelcev titanovega dioksida, ki smo jo v drugem delu uporabili za poskuse na celični liniji keratinocitov. Ugotavljali smo vpliv časa in načina soniciranja na velikost delcev v disperziji in nanodelce titanovega dioksida tudi ovrednotili. Ugotovili smo, da na velikost delcev v disperziji vplivata tako medij, v katerem disperzijo pripravimo, kot tudi način soniciranja. Ugotovili smo, da je optimalna metoda izdelave disperzije nanodelcev titanovega dioksida kombinacija 10 min soniciranja v ultrazvočni kadički in 10 min pulznega soniciranja na ledeni kopeli z uporabo ultrazvočne sonde. Tako smo uspeli pripraviti disperzijo nanodelcev z najmanjšo povprečno velikostjo delcev (~ 500 nm). Večina nanodelcev je bila v disperziji v obliki agregatov, ki so bili ~ 20-krat večji od deklarirane velikosti delcev, ki jo navaja proizvajalec.

Sledila je *in vitro* raziskava varnosti nanodelcev titanovega dioksida na celični liniji keratinocitov. V raziskavi smo najprej ugotavljali preživetje in morfologijo keratinocitov v kulturi po 24, 48 in 72-urni izpostavitvi nanodelcem titanovega dioksida velikosti ~ 500 nm v koncentracijah od 0,05 - 100 µg/mL. Rezultati so pokazali, da nanodelci v koncentraciji < 20 µg/mL ne povzročajo vidnih učinkov, zato smo v nadaljevanju te »varne« koncentracije (0,5, 5, 10 µg/mL) uporabili za študij varnosti po daljšem času izpostavitve v tri mesečnem poskusu. Spremljali smo preživetje keratinocitov, njihovo mitohondrijsko aktivnost, morfologijo celic, znotrajcelično nastajanje radikalov in spremembe v celičnem ciklu. Celične organele smo označili s fluorescentnimi barvili in ugotavljali spremembe v njihovi obliki in v obliki samih celic. S pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa smo opazovali spremembe površine celic, s presežno elektronsko mikroskopijo pa smo ugotavljali, ali nanodelci prehajajo vanje.

Ugotovili smo, da nanodelci titanovega dioksida tudi v najvišji testirani koncentraciji (10 µg/mL) in trimesečni izpostavitvi niso citotoksični in ne povzročajo significantnih razlik v morfologiji celic ter ne sprožijo znatno povečane apoptotične ali nekrotične celične smrti. Nanodelci niso sprožili znatno povečanega nastajanja radikalov v celicah, niti povečanja mitohondrijske aktivnosti, ki je sicer pogosta posledica oksidativnega stresa. Število celic se je pri koncentraciji nanodelcev 10 µg/mL significantno zmanjšalo v primerjavi s kontrolnimi

celicami, ki niso bile izpostavljene nanodelcem, kar nas je pripeljalo do sklepa, da nanodelci v višjih koncentracijah delujejo citostatično; verjetno mehansko preprečijo celično delitev in s tem zmanjšajo proliferacijo celic. Rezultati kažejo, da izpostavitve celic nanodelcem ne vpliva na njihov celični cikel.

Potrdili smo tudi vstop nanodelcev titanovega dioksida v celice, kjer jih nahajamo v obliki agregatov, predvsem v endosomih celic. Nadalje smo ugotovili, da se celice odzovejo na prisotnost nanodelcev titanovega dioksida v kulturi s povečanjem števila nanotubularnih struktur, ki se raztezajo med celicami, kar je ugotovitev, ki predhodno za keratinocite še ni bila opisana. Pojav teh struktur lahko nakazuje transformacijo celic iz normalnih v rakave, zato bi bilo smiselno v nadaljnjih raziskavah ta pojav bolj podrobno raziskati.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklenemo, da so učinki daljše izpostavitve celic nanodelcev titanovega dioksida v nizkih, akutno varnih koncentracijah zanemarljivi, ideja o transformaciji normalnih celic v rakave pa je potrebno raziskati in utemeljiti.

## ***ABSTRACT***

Nanoparticles of titanium dioxide are often used as a dye or UV-filter in preparations for dermal use. Dermal exposure to titanium dioxide nanoparticles often lasts for a long time, but information regarding its safety is nowadays deficient.

In the first part of our research, the method of preparation of titanium dioxide nanoparticle dispersion has been optimized and this dispersion was used in the second part for experiments on keratinocyte cell line. Titanium dioxide nanoparticles were characterized and the effects of sonication time and method used on particle size in dispersion were evaluated. It was shown, that the particle size in dispersion depends on dispersion medium in which dispersion is prepared, as well as sonication method used. The optimal method for preparation of titanium dioxide nanoparticle dispersion is combination of sonication in an ultrasonic bath (10 min) and pulse sonication on ice bath using an ultrasonic probe (10 min). We were able to produce dispersion of nanoparticles with the smallest average particle size (~ 500 nm). Most of the nanoparticles in dispersion were present as aggregates, which were 20-times bigger than the size declared by the manufacturer.

This was followed by *in vitro* study of titanium dioxide nanoparticles safety on keratinocyte cell line. Firstly, viability and morphology of keratinocytes in culture were investigated after 24, 48 and 72 h exposure to nanoparticles of titanium dioxide in concentrations from 0,05 to 100 mg/mL. The results showed that the nanoparticles at a concentrations < 20 mg/mL do not cause any visible effects, therefore, these "safe" concentrations (0,5, 5, 10 mg/mL) were used in three months experiments to evaluate their safety after prolonged exposure. The viability of keratinocytes, their mitochondrial activity, cell morphology, intracellular formation of free radicals and changes in the cell cycle were investigated. Cell organelles were stained with fluorescent dyes to follow the changes in their shape and in morphology of the cells themselves. Using scanning electron microscopy changes in the cell surface were investigated and with transmission electron microscopy nanoparticle uptake was evaluated.

It was shown that nanoparticles of titanium dioxide in the highest concentration tested (10 mg/mL) after three months exposure are not cytotoxic and do not cause significant differences in the cell morphology and do not trigger a significantly increased apoptotic or necrotic cell death. Nanoparticles did not significantly increase intracellular formation of free radicals, nor an increase in mitochondrial activity, which is frequently consequence of oxidative stress.



The number of cells was significantly reduced at a concentration of 10 mg/mL compared to control cells, which were not exposed to nanoparticles, leading to conclusion that the effect of nanoparticles at higher concentrations are cytostatic, they probably mechanically prevent cell division and reduce cell proliferation. The results show that exposure of cells to nanoparticles do not affect the cell cycle.

We also confirmed the entry of nanoparticles of titanium dioxide into the cells, where they are present in the form of aggregates, mainly located in the endosomes of the cells. Furthermore, it was shown that cells respond to the presence of titanium dioxide nanoparticles in culture with increased number of nanotubular structures that extend between the cells. This finding has not been described for keratinocytes previously. The emergence of these structures may indicate the transformation of normal cells into cancer cells, and it would be reasonable to explore it more precisely in further studies.

According to the results it can be concluded that the effects of longer exposure to nanoparticles of titanium dioxide cells in low, short-term safe concentrations are negligible, however the idea of transformation of normal into cancer cells should be further investigated and substantiated.

## ***SEZNAM OKRAJŠAV***

ATP	adenozin trifosfat
CBA	»Cytometric Bead Assay«
CŽS	centralni živčni sistem
DCF	2',7'-diklorofluorescein
DCFH	diklorofluorescein
DCFH-DA	diklorofluorescein diacetat
DNA	deoksiribonukleinska kislina
e <sup>-</sup>	elektron
EELS	»Electron Energy Loss« spektroskopija
EFTEM	»Energy-Filtering« TEM
ELISA	»Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay«, encimskoimunski test
EPR	elektronska paramagnetna resonanca
FDA	»Food and Drug Administration«, Ameriška agencija za hrano in zdravila
GSH	glutation
h <sup>+</sup>	fotogenerirana luknja valenčnega pasu
HTS	»High-throughput screening«, reševanje visoke zmogljivosti
HR-TEM	visoko ločljivostni TEM
IL	interlevkin
LAF	»Laminar Air Flow«, laminarni pretok zraka
LDH	laktat dehidrogenaza
MEM	»Minimum essential medium«
MPT	»Multiple Particle Tracing«
MTT, MTS test	test aktivnosti mitohondrijske dehidrogenaze
ND	nanodelci
NRU	»Neutral Red Uptake«, privzem nevtralnno rdečega
OH <sup>-</sup>	hidroksilni ion
PBS	fosfatni pufer
PCR	»Polymerase chain reaction«, verižna reakcija s polimerazo
PCS	»Photon Correlation Spectroscopy«, fotonska korelacijska spektroskopija
PI	polidisperzni indeks
PŽS	periferni živčni sistem

REACH Uredba (ES) št. 1907/2006 Evropskega Parlamenta in Sveta z dne 18. decembra 2006 o registraciji, evalvaciji, avtorizaciji in omejevanju kemikalij

RNA ribonukleinska kislina

ROS reaktivne kisikove spojine

SCCP Znanstvenega odbora za potrošniške proizvode

SCHER Znanstveni odbor za zdravje in okoljska tveganja

SCENIHR Znanstveni odbor o novih in novo odkritih zdravstvenih tveganjih

SEM »Scanning Electron Microscopy«, vrstični elektronski mikroskop

TEM presečni elektronski mikroskop

TiO<sub>2</sub> titanov(IV) dioksid

TNF- $\alpha$  tumorski nekrotični faktor alfa

TUNEL »Terminal Deoxynucleotidiltransferase dUTP Nich and Labeling«

UV ultravijolično

UZ ultrazvok, ultrazvočna

# **1 UVOD**

## **1.1 Nanodelci**

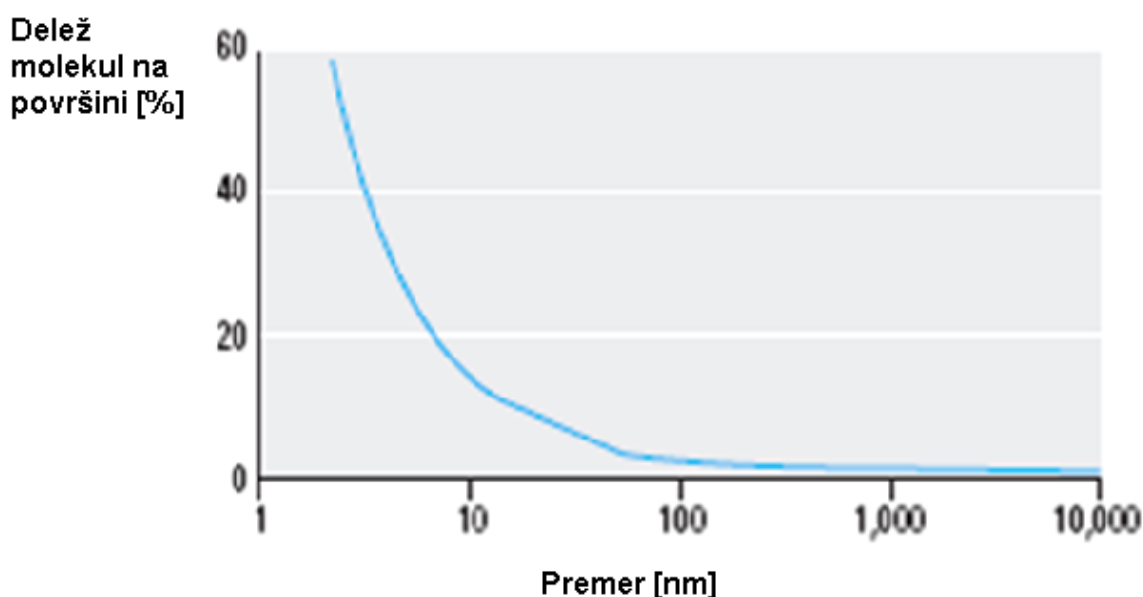
Nanodelci (ND) so delci koloidnih velikosti; v najširšem pomenu so to delci z velikostjo < 1000 nm, v ožjem pomenu pa delci z velikostjo < 100 nm (1). Pogosto pojem ND zajema tudi snovi, katerih vsaj ena dimenzija je < 100 nm, čeprav je v takšnih primerih bolj primeren izraz nanomaterial. ND predstavljajo vmesno velikostno stopnjo med mikrodenci in atomi oziroma molekulami (2, 3). Oblika delca določa njegov aerodinamični premer, ki je pomemben za potovanje delcev po zraku in telesnih tekočinah ter tudi za prehod v ozračje (1). Obstaja več razdelitev ND glede na velikost in ena od njih jih deli na drobne (~ 200 nm) in zelo drobne (~ 100 nm) (4). V farmaciji predstavljajo ND pomemben dostavni sistem, saj omogočajo prirejeno sproščanje in ciljano dostavo učinkovin v želena tkiva s spreminjanjem njihovih površinskih lastnosti, prav tako pa se lahko uporabljajo kot različne pomožne snovi npr. pigmenti.

V grobem lahko ND razdelimo glede na njihov izvor v tri skupine. V prvi skupini so ND, ki so bili narejeni načrtno, s točno določenimi lastnostmi, za točno določen namen uporabe. To so ND, ki jih na tržišču najdemo v pigmentih, kozmetičnih pripravkih, hrani, itd. Naravni ND nastajajo v procesih erozije, ob vulkanskih izbruhih, ali pa so že sami biološki sistemi ND kot npr. virusi. Poleg teh pa v okolju nenamensko nastaja ogromna količina ND, ki se jih do nedavnega nismo niti zavedali. Le-ti nastajajo pri gorenju, v motorjih z notranjim izgorevanjem, zlasti dizelskih, kot stranski produkt v industrijskih postopkih mletja, brušenja, razprševanja, varjenja itd. (1). Takšni delci v okolju niso zaželeni, njihove lastnosti niso načrtovane in so v določenih okoliščinah lahko celo škodljive (3).

Glede na kemijsko sestavo delimo ND na anorganske, kamor uvrščamo ND železa, zlata, TiO<sub>2</sub>, ZnO, ogljikove nanocevice itd. in na organske, kamor uvrščamo polimerne ND iz sinteznih polimerov kot so npr. poliglikolna kislina, polimlečna kislina, kopolimer mlečne in glikolne kisline, polikaprolakton, ali iz naravnih polimerov npr. hitosana ali kolagena. V skupino organskih ND spadajo tudi trdni lipidni nanodelci, liposomi, polimerni miceli, polimerni konjugati in dendrimeri (5).

Velikost je tista od lastnosti, ki odločilno vpliva tudi na ostale lastnosti nanometrskih delcev. Lastnosti ND se močno razlikujejo od lastnosti, ki jih imajo večji delci istega kemizma.

Spremenjene so lahko tako fizikalno-kemijske, mehanske, optične kot tudi magnetne lastnosti (6). Glavne od njih so: kemijska reaktivnost, električna prevodnost, termična razteznost, optična prevodnost, trdnost; glede na velikost delcev pa se spreminja tudi njihovo gibanje v mediju, itd. (3). Te spremenjene lastnosti so posledica dejstva, da imajo ND v primerjavi z večjimi delci bistveno večje razmerje med površino in volumnom, kar pomeni, da je večji delež atomov oz. molekul na površini delca (Slika 1), kar se kaže v povečani kemijski reaktivnosti in je tudi razlog za večjo težnjo po agregiranju ali aglomeriranju. Razlog za to je v tem, da so gradniki delca v ND postavljeni v drugačno okolje v primerjavi z gradniki v večjih delcih (1, 3).



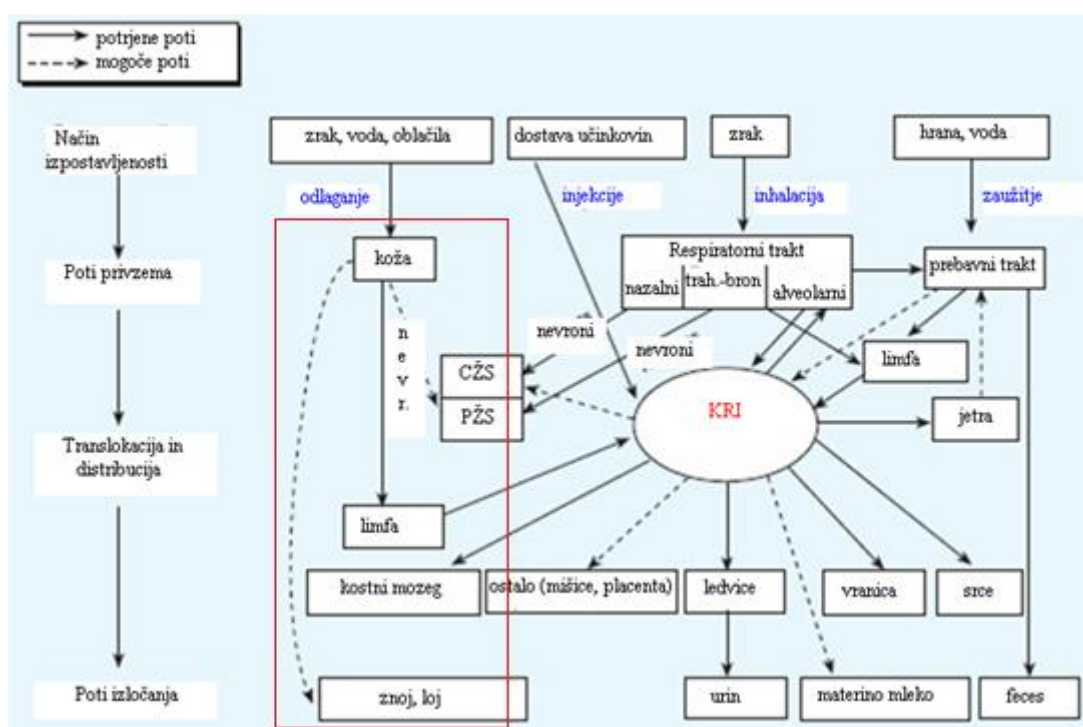
Slika 1: Odvisnost deleža molekul na površini od velikosti delca (7).

Spremenjene lastnosti ND se odražajo tudi v njihovi biološki aktivnosti. ND lahko vstopajo v interakcije s celicami, prehajajo biološke bariere in tako vstopajo v znotrajcelični prostor. Vodijo lahko tudi do škodljivih učinkov npr. povzročijo oksidativni stres, vplivajo na delovanje celic ali povzročijo katero od drugih oblik toksičnosti (8). Lastnosti, ki so odraz nanometrskih velikosti, so tako po eni strani specifične in uporabne, a hkrati so lahko vzrok potencialne toksičnosti in neželenih učinkov, ki pa so zaenkrat še premalo raziskani (9).

Področje uporabe ND je zaradi njihovih specifičnih lastnosti zelo široko npr. uporaba v elektroniki, biologiji, medicini, in je izjemno v porastu, zato se vse bolj kaže potreba po natančni toksikološki oceni uporabe ND tako za človekovo zdravje kot tudi za okolje.

## 1.2 Vstop nanodelcev v organizem in njihove interakcije s celicami

V naš organizem lahko ND pridejo skozi kožo, preko prebavil in v največji meri dihal, seveda pa je lahko vnos tudi intravenski, kar se vedno več uporablja v namene zdravljenja in diagnostike. V vsakem od teh primerov lahko ND vstopijo v krvni obtok in od tam tudi v možgane oz. so v neposrednem stiku s celicami različnih organov (Slika 2). ND lahko zaradi svoje nanometerske velikosti prehajajo skozi celične membrane v notranjost celic (3).



Slika 2: Biokinetika ND – poti vstopa ND v organizem, njihove porazdelitve po organizmu in poti izločanja. Vse te poti so dandanes še slabo raziskane, prav tako kot tudi kopičenje ND v posameznih tkivih (7).

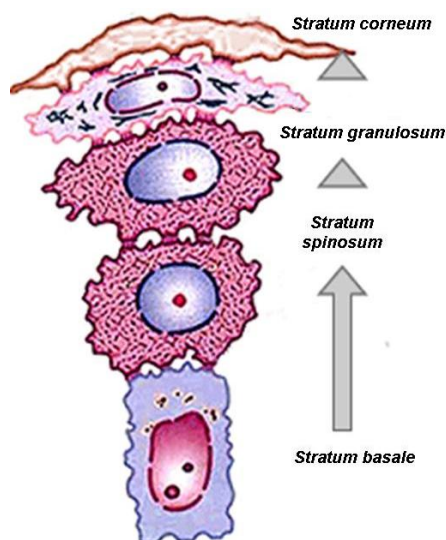
Ameriška Agencija za okolje je dokazala, da pride v celicah mikroglije, zaradi prisotnosti ND  $\text{TiO}_2$  z velikostjo 30 nm, do nastajanja radikalov, kar je potencialni vzrok nastanka Parkinsonove in Alzheimerjeve bolezni (1, 10). Pomembno je poudariti, da vse celice niso enako občutljive in podvržene vplivom ND; tako so npr. pljučni fibroblasti bolj občutljivi od bronhialnih epiteljskih celic (1, 11). Organi, ki jih vnos ND najbolj prizadene, so jetra,

vranica, ledvice in bezgavke, v splošnem pa so ND lahko vzrok vseh bolezni, ki so povezane s krvožiljem (1).

Jedro naših raziskav so bili ND  $\text{TiO}_2$  kot sestavina dermatikov, zato smo se v nalogi osredotočili na učinke le-teh na kožne celice in njihovo prodiranje skozi kožo. Neposredno v stiku z ND so keratinocitne celice, ki gradijo epidermis. Vendar pa z vtiranjem pripravkov, s čimer dobijo ND potrebno kinetično energijo za povečano mobilnost, omogočimo ND tudi prehod v plasti pod povrhnjico. Ta prehod je dodatno olajšan v primeru vseh vidnih in nevidnih poškodb kože (1).

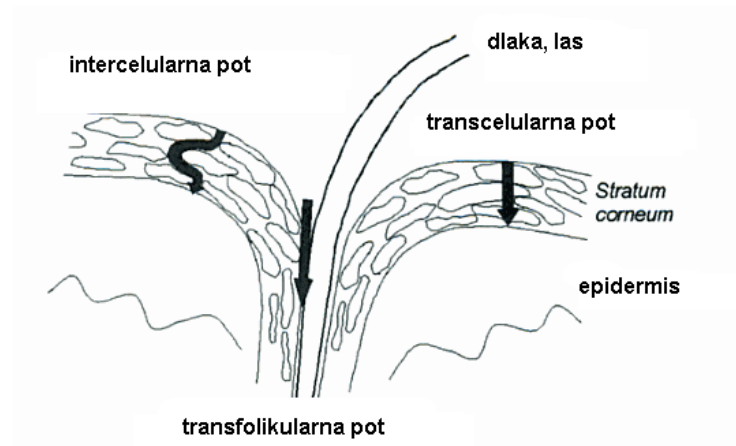
## **Koža**

Koža je stalno izpostavljena različnim zunanjim vplivom, kot so plini, topila, raztopine, dermalni pripravki. Zaradi svoje velike površine, ki pri odraslem človeku znaša približno  $18.000 \text{ cm}^2$ , je potencialno pomembna za sistemske absorpcije različnih snovi (12). Koža je zgrajena iz treh plasti: vrhnjice, usnjice in podkožja. Zunanja plast kože, vrhnjica ali epidermis, je neožiljena, zato dobiva potrebne snovi z difuzijo iz usnjice. Metabolna aktivnost v povrhnjici je kljub temu znatna. Keratinociti so osnovne gradbene enote epidermisa in nastajajo z delitvijo celic iz bazalne ali zarodne plasti ter postopoma potujejo proti površini (Slika 3). Na tej poti se morfološko spreminjajo ter zorijo. Glavna sprememba, ki se v njih dogaja, je keratinizacija ali poroženje, kar pomeni, da se v njihovi notranjosti (citoplazmi) tvorijo posebne vlaknate beljakovine, ki jih imenujemo keratini. Te beljakovine počasi popolnoma napolnijo celico, tako da ta postopoma odmre in postane drobna rožena "luskica", ki se s površine kože odluči. Na poti zorenja se celicam spreminja tudi oblika, in sicer iz visoko prizmatskih ali cilindričnih celic v bazalni plasti postajajo celice med zorenjem vedno bolj vretenaste in sploščene. Celoten proces zorenja oziroma spreminjanja keratinocitov od zarodnih celic do popolnega poroženja in odmrtja imenujemo epidermopoeza, ki v povprečju traja 28 dni. Keratinociti so med seboj čvrsto povezani s posebnimi drobnimi beljakovinskimi vlakni, ki jih imenujemo dezmosomi. S podobnimi vlakni pa so na dnu (keratinociti bazalnega sloja) tudi vsidrani v posebno plast (bazalno membrano), ki ločuje oziroma povezuje epidermis z dermisom. Takšna struktura omogoča epidermisu potrebno čvrstost in pritrjenost na globlje ležeče strukture (13).



Slika 3: Zorenje keratinocita v korneocit  
(Povzeto po New Cosmetic Science, (14)).

ND lahko prodirajo v oz. skozi kožo na več načinov: inter- ali transcelularno, zanemarljiv pa ni niti transfolikularni prehod (Slika 4). Dokazano je, da skozi zdravo, nepoškodovano kožo ND le težka prehajajo. Poudariti pa je potrebno, da je koža v določenih primerih izpostavljena velikim količinam ND (npr. poleti lahko z enim samim nanosom sončne kreme na kožo naneseemo več kot 0,5 g ND). V teh primerih lahko tudi minimalen delež absorbiranih ND, ki dosežejo vitalna tkiva, pomeni veliko nevarnost. Prav tako se moramo zavedati, da je vse več ljudi, ki obolevajo za različnimi oblikami kožnih bolezni, npr. psorizao, atopičnim dermatitisom, zato je učinkovitost njihove kožne bariere zmanjšana, kar varnost uporabe pripravkov z ND še dodatno postavi pod vprašanje (15).



Slika 4: Načini prehoda ND skozi roženo plast (16).



### ***1.3 Toksičnost nanodelcev***

Uporaba ND nedvomno predstavljajo neverjetno množico možnosti napredka praktično na vseh ravneh in področjih človekovega življenja in delovanja, vendar pa nikakor ne smemo pozabiti, da predstavlja tudi grožnjo tako za človekovo zdravje kot okolje, v katerem živimo. Vse tiste lastnosti, zaradi katerih so ND tako edinstveni, so na drugi strani potencialno nevarne. Regulatorni organi danes nanotehnoloških izdelkov kljub edinstvenim biološkim lastnostim še ne obravnavajo ločeno od ostalih izdelkov, čeprav raziskave kažejo, da sta delitev in ločena obravnava potrebna.

Z razvojem nanotehnologije je pomen velikosti delcev in vpliv na njihovo toksičnost vse pomembnejši. ND so praviloma bolj toksični od večjih delcev istega kemizma, kar je posledica relativno večje površine in kemijske reaktivnosti ter lažjega prodiranja v celice (17). Toksičnost ND definiramo kot vsako neželjeno biološko aktivnost in je lahko posledica samih fizikalnih lastnosti delcev (velikosti, velike površine, naboja), njihove kemijske sestave ali pa škodljivega delovanja njihovih razpadnih produktov. ND lahko vstopajo v interakcije z esencialnimi celičnimi strukturami, porušijo integriteto membran, citoskeleta, vplivajo na metabolizem in signalne poti celic (18). Za človeški organizem so toksični vsi tisti majhni delci, ki lahko kemijsko reagirajo s posameznimi celicami in jih pri tem spremenijo ali uničijo, ali pa že sama fizikalna prisotnost ND spremeni ali ovira delovanje posameznih celic. Kadar so ND dispergirani v tekočem mediju, je z vidika njihove toksičnosti zelo pomemben podatek o obsegu agregacije ali aglomeracije. O prvi govorimo, kadar obstajajo med delci šibke van der Waalsove vezi, kadar pa so vezi močnejše, govorimo o aglomeraciji. Oba pojava sta pomembna, ker imajo taki skupki delcev drugačne lastnosti kot posamezni delci (19).

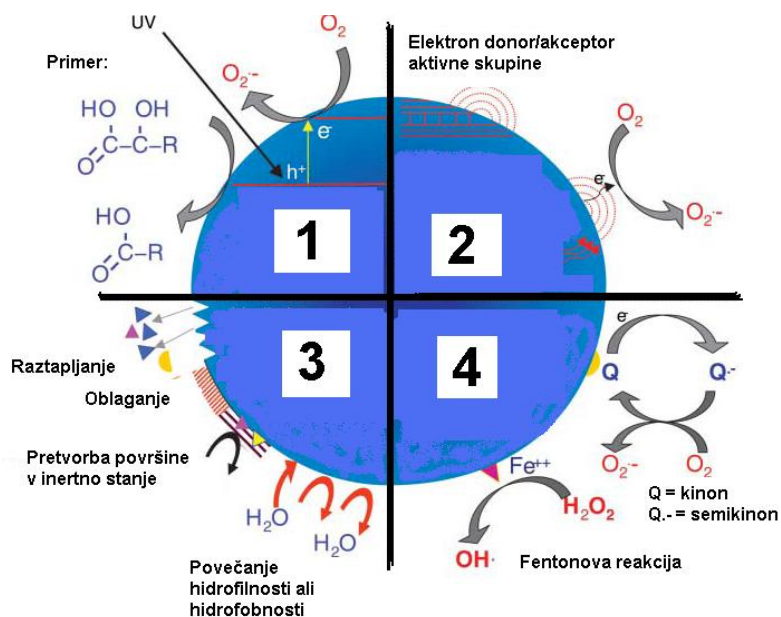
### 1.3.1 Mehanizmi toksičnosti

Spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti delcev, ki so posledica njihove nanometrskih velikosti, vodijo do različnih mehanizmov interakcij in njihovega toksičnega delovanja (*Preglednica I, Slika 5*), ki je potencialno nevaren za biološke sisteme.

*Preglednica I: Eksperimentalno ugotovljeni učinki ND in njihove posledice v organizmu (7).*

<b>Eksperimentalno spremljani parameter</b>	<b>Možne patofiziološke posledice:</b>
Nastajanje ROS, oksidativni stres	Poškodbe proteinov, DNA, celičnih membran, indukcija encimov, vnetje, poškodbe mitohondrijev
Motnje v delovanju mitohondrijev	Spremembe v prepustnosti membrane, citotoksičnost, apoptoza, nekroza
Vnetje	Namnožitev vnetnih celic, fibroza, granulom, pospešena tvorba proteinov akutne faze
Privzem v celice retikulo-endotelijskega sistema	Nalaganje v jetrih, vranici, limfnih vozlih, možno povečanje organov in motnje njihove funkcije
Denaturacija in razgradnja proteinov	Izguba encimske aktivnosti, nastajanje avtoantigenov
Privzem v jedro	Poškodba DNA, nastajanje avtoantigenov
Privzem v živčni sistem	Poškodbe možganov in perifernega živčnega sistema
Motnje v fagocitni funkciji	Kronično vnetje, fibroza, granulomi
Motnje v delovanju endotelija	Aterogeneza, tromboza, kap, miokardni infarkt
Nastanek neoantigenov, padec imunske tolerance	Avtoimunske reakcije
Spremembe v regulaciji celičnega cikla	Nenadzorovana proliferacija, staranje
Poškodbe DNA	Mutageneza, metaplazija, karcinogeneza

Posledice delovanja ND so odvisne od njihove velikosti, kemijske strukture, topnosti, oblike, površinskih lastnosti in stopnje agregacije. Vsi ti parametri lahko vplivajo na privzem v celice, vezavo na proteine ter na način in stopnjo poškodbe tkiva (20).



Slika 5: Možni mehanizmi interakcij nanodelcev z biološkim sistemom (tkivom, celicami).

- 1: Prekinitev vezi in nastanek radikalov sprožen z UV svetlobo;
- 2: Struktura delca, predvsem prisotnost napak v kristalni rešetki, lahko sproži nastajanje radikalov;
- 3: Interakcije delca z disperznim medijem: raztapljanje snovi s površine delca, oblaganje in pretvorba površine v inertno stanje ali spreminjanje hidrofilnih in hidrofobnih lastnosti; Povečanje hidrofobnosti lahko poveča interakcije s celično membrano, kar lahko vpliva na privzem ND, povečanje hidrofilnosti pa je pomembno predvsem z vidika disperzibilnosti;
- 4: Površina delca je lahko katalizator redoks reakcij (npr. Fentonova reakcija); (7)

## 1.4 Nanodelci in okolje

Proizvodnja in uporaba ND strmo narašča, kar ima za posledico vedno večjo težnjo po ovrednotenju novih tehnologij tudi s stališča varnosti za okolje, a danes je nabor informacij o tveganjih za zdravje in posledicah za okolje pomanjkljiv. Nanotehnologija predstavlja velik potencial za izboljšanje kakovosti zraka, vode in zemlje, saj lahko ND zaradi njihovih specifičnih lastnosti uporabimo za izjemno natančno detekcijo nekaterih plinov kot sta amonijak in kisik, pa tudi za razvoj novih tehnologij, s katerimi bi zmanjšali tvorbo polutantov, saj lahko ND služijo npr. kot sorbenti za strupene izpušne pline, ali kot katalizatorji pretvorbe le-teh. Adsorbenti z ND so potencialno uporabni za čiščenje pitne

vode, saj npr. lahko vežejo arzen in ga s tem odstranijo (21). ND  $\text{TiO}_2$  se uporabljajo celo za zmanjševanje onesnaženosti v mestih, saj katalizirajo pretvorbo dušikovega dioksida v manj toksične nitrane (22).

Ni nujno, da so ND že ob samem vstopu v okolje toksični, takšni lahko postanejo tekom svojega življenjskega ciklusa. Reagirajo lahko z drugimi snovmi v okolju, se razgradijo, katalizirajo in tako pospešijo reakcije, ki v okolju tudi sicer potekajo ali pa preprečijo potek sicer esencialnih reakcij. Vrednotenje vseh teh učinkov je za enkrat še zelo težavno, saj zahteva popolno razumevanje nanosveta; vseh reakcij, ki se tam odvijajo kot tudi življenjskega cikla ND (23).

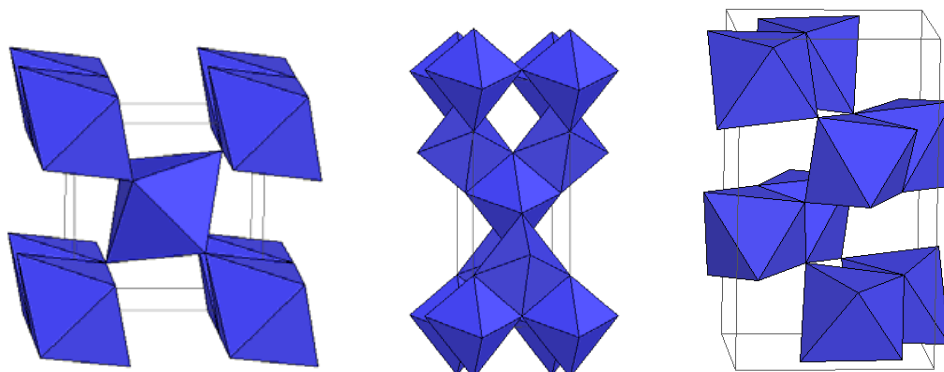
## ***1.5 Titanov dioksid***

Titanov (IV) oksid je najpomembnejša titanova spojina, saj je z naskokom največji delež (več kot 96 %) uporabljenega titana v obliki  $\text{TiO}_2$ . Titanov dioksid je danes med petdesetimi v največji količini proizvedenimi kemikalijami na svetu. Njegove glavne prednosti so: netopnost v vodi in številnih organskih topilih, nereaktivnost, velika kemijska in termična stabilnost, nevnetljivost, nizka cena ter možnost priprave stabilnih suspenzij (24).

Svetovna proizvodnja  $\text{TiO}_2$  znaša okoli štiri in pol milijona ton letno. Del se porabi v hunterjevem procesu za proizvodnjo kovinskega titana, preostanek pa kot pigment v barvah in v živilski industriji, polnilih za papir, za izdelavo samočistilnih nanosov, čiščenje vode in v kozmetiki ter farmaciji. Sintetično se  $\text{TiO}_2$  najpogosteje pridobiva s plamensko oksidacijo  $\text{TiCl}_4$ . Uporaba  $\text{TiO}_2$  strmo narašča tudi v različnih industrijah, športu, medicini in diagnostiki in lahko rečemo, da je  $\text{TiO}_2$  ena najbolj pogosto uporabljenih snovi, iz katere se ND izdelujejo, kar kaže na velik potencial za kratkotrajno kot tudi dolgotrajno izpostavljenost ND  $\text{TiO}_2$  (18).

V naravi so prisotne tri polimorfne modifikacije: rutil, anatas in brookit. Poleg teh treh lahko s sintezo pripravimo še nekatere druge polimorfne oblike ( $\text{TiO}_2$  (B),  $\text{TiO}_2$  (H)) (25). Naravne oblike se razlikujejo po lomnih količnikih, kemijski stabilnosti in fotokemijski aktivnosti. Koordinacijsko število titanovega atoma je pri vseh polimorfih 6 (vsak atom titana obdaja 6 kisikovih). Rutil in anatas spadata v tetragonalni kristalni sistem, brookit pa v ortorombskega (Slika 6). Izbrane fizikalno-kemijske lastnosti posameznih polimorfov so zbrane v Preglednici II. Rutil je termodinamsko najbolj stabilna in v naravi najbolj pogosta oblika. Kot UV filtra se

uporabljata rutil in anatas, saj je brookit umazano rjave barve in je zato kozmetično nesprejemljiv (26).



Slika 6: Kristalne oblike rutila (levo), anatasa (sredina) in brookita (desno). V središču vsake bipiramide nahajamo titanov atom, v ogljiščih pa kisikove (27).

Preglednica II: Izbrane fizikalno-kemijske lastnosti glavnih polimorfov  $TiO_2$  (26).

(En Å je enak 0,1 nm.)

	Rutil	Anatas
gostota [ $g/cm^3$ ]	4,2	3,9
dimenzije osnovne celice		
a [Å]	4,59	3,78
b [Å]	4,59	3,78
c [Å]	2,95	9,52
Kristalna struktura	Tetragonalna	Tetragonalna
V osnovne celice [ $Å^3$ ]	62,07	136,25
Lomni količnik	2,71	2,55
pH 5 % disperzije	6,0 ~ 7,5	5,5 ~ 7,0

## 1.6 Uporaba $\text{TiO}_2$ v farmaciji in v kozmetiki

$\text{TiO}_2$  se že mnogo let uporablja kot pigment v različnih dermalnih in kozmetičnih pripravkih, kot so kreme, črtala in senčila za oči, pudri, korektorji, črtala za ustnice ter v sončnih kremah kjer deluje kot anorganski UV filter in ščiti kožo pred UV (23, 24). Njegova velika prekrivna moč je posledica visokega lomnega količnika, odvisna pa je tudi od velikosti delcev. Maksimalno prekrivno moč imajo delci  $\text{TiO}_2$  veliki nekaj manj kot polovico valovne dolžine vidne svetlobe, in ker je človeško oko najbolj občutljivo na rumeno-zeleno svetlobo, katere valovna dolžina je  $\sim 550$  nm, je optimalna velikost pigmentnih delcev  $\text{TiO}_2$  med 200 in 300 nm. Za zaščito pred UV svetlobo pa se uporabljajo manjši delci velikosti  $< 100$  nm, kar zagotavlja njihovo transparentnost, hkrati pa omogoča, da se svetloba v delcih tudi absorbira (24).

### 1.6.1 $\text{TiO}_2$ kot pigment

Kot pigment ima  $\text{TiO}_2$  že več kot 70-letno zgodovino. Veliko se uporablja, ker učinkovito razprši vidno svetlobo in s tem daje belino, svetlost in motnost materialu, katerega del je. Zaradi svoje svetle barve in izjemno visokega lomnega količnika (2,4 – 2,7), višjega ima le še nekaj snovi kot npr. diamant, je  $\text{TiO}_2$  najbolj široko uporabljan beli pigment. Visok lomni količnik je razlog boljšim prekrivnim lastnostim  $\text{TiO}_2$  pred ostalimi belimi pigmenti (Preglednica III). Večja kot je razlika med lomnim količnikom pigmenta in medija, v katerem je dispergirana, večje bo sipanje svetlobe in posledično boljša prekrivnost oz. belina. Njegova prednost je tudi ta, da je neobčutljiv na UV svetlobo (27).

*Preglednica III: Lomni količniki nekaterih belih pigmentov (27).*

<b>Snov</b>	<b>Lomni količnik</b>
Diatomejska zemlja	1,45
Kalcijev karbonat	1,63
Magnezijev silikat	1,65
Cinkov oksid	2,02
$\text{TiO}_2$ (anatas)	2,55
$\text{TiO}_2$ (rutil)	2,73

Kot pigment ima prednost oblika rutila, ker le-ta bolje razprši svetlobo, je stabilnejša in bolj trpežna od anatasa.  $\text{TiO}_2$  kot pigment je netopen v mediju, v katerem je dispergirana, kar pomeni, da so kemijske in fizikalne lastnosti v glavnem odvisne od velikosti delcev in kemijske sestave njihove površine. Večina  $\text{TiO}_2$ , ki se uporablja v farmaciji, ima spremenjeno površino. Delci so prekriti z anorganskimi oblogami, ki so najpogosteje iz aluminijevega oksida ali silicijevega oksida, pri čemer skrbno nadzorujejo vrsto, količino in način oblaganja. Taka obdelava površine zagotovi izboljšanje ene ali več pomembnih lastnosti delcev kot so disperzibilnost v vodi in v organskih topilih, razbarvanje pod vplivom toplote in fotoredukcije (27).

### **1.6.2 Uporaba nanodelcev $\text{TiO}_2$ v dermatikih za varovanje pred UV-žarki**

Najbolj znana uporaba  $\text{TiO}_2$  v kozmetiki je kot UV filter v različnih dermatikih. Slednjo je Ameriška agencija za hrano in zdravila (FDA) odobrila že leta 1978. Na kožo jih nanašamo z namenom, da bi jo zaščitili pred škodljivimi UVA in UVB žarki, katerih valovna dolžina je med 290 in 450 nm. V zadnjem času se kot anorganski UV filtri v teh pripravkih uporabljajo poleg delcev  $\text{TiO}_2$  še delci  $\text{ZnO}$  ali kalamina – gre za  $\text{ZnO}$ , ki je obarvan s približno 0,5%  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  in je oficinalen po Ameriški farmakopeji. Vsi ti anorganski nadomeščajo organske UV filtre, ki zaradi prodiranja v kožo, pod vplivom UV žarkov povzročajo neželene učinke (preobčutljivostne reakcije npr. dermatitis in urtikarijo) (28).

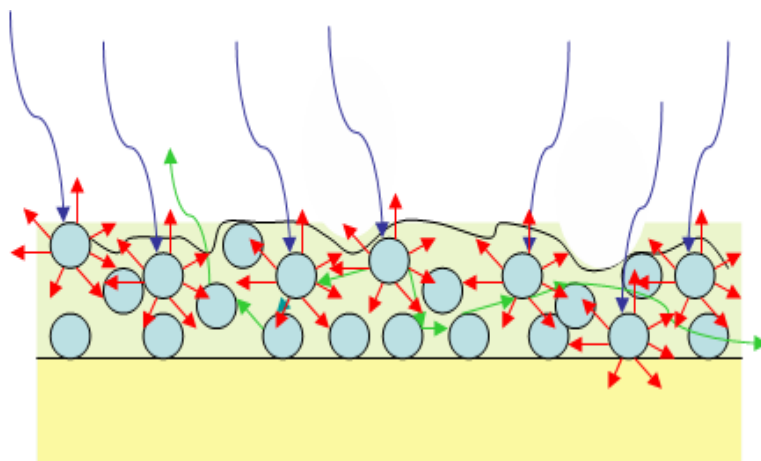
Velikost delcev  $\text{TiO}_2$ , ki se uporabljajo v sončnih kremah, je lahko bistveno manjša od tistih, ki jih najdemo npr. v barvah in pigmentih, kjer se  $\text{TiO}_2$  uporablja prav zaradi značilne bele barve. Uporaba delcev nanometrsko velikosti, katerih velikost je približno desetino valovne dolžine vidne svetlobe, zagotavlja transparentnost pripravka (28). Po nanosu na kožo, nanešen sloj delcev ni viden, kar je v današnjem svetu z estetskega vidika že skoraj nujno. Že Brown in Galley sta ugotovila, da mora biti velikost delcev  $\text{TiO}_2$  manjša od 100 nm, da je krema po nanosu transparentna. Vendar pa z naraščanjem zaščitnega faktorja kreme narašča tudi koncentracija ND v njej, zato le-ta, ko je presežena določena koncentracija  $\text{TiO}_2$  v formulaciji, po nanosu na koži pušča belo obarvanje in neprijeten občutek ne glede na nanomersko velikost delcev  $\text{TiO}_2$  (28).

## UV žarki in zaščita pred njihovim delovanjem

UV žarke lahko razdelimo na UVA in UVB žarke. Prvi imajo nižjo energijo, vendar večjo valovno dolžino in posledično večjo intenziteto. Rezultat tega je, da prodrejo globlje v kožo, tako da dosežejo usnjico in povzročijo spremembo v elastičnih vlaknih. Tako prispevajo k nastanku tako imenovane solarne elastoze. Gre za propad elastičnih vlaken, ki ga povzroči sonce, kar vodi do drobnih gubic in gub na predelih kože, ki so bili izpostavljeni sončni svetlobi (29). Posledično se koža "stara". Na drugi strani so UVB žarki z manjšo valovno dolžino in večjo energijo; posledica njihovega delovanja so akutni učinki (sončne opekline). Gre za boleč dermalni eritem, katerega posledica je lahko kožni rak, ki je običajno rezultat sinergističnega delovanja tako enih kot drugih elektromagnetnih valov (30). Uporaba formulacij zgolj z UVB zaščito prepreči nastanek sončnih opeklin, vendar lahko hkrati podaljša čas, ki ga bo posameznik prebil na soncu brez akutno vidnih posledic, kar pa ima za posledico pospešeno staranje kože. Edina smiselna je torej uporaba kombinacije snovi, ki ščitijo tako pred UVA kot UVB žarki. Danes je vse pogostejša uporaba UV filtrov tudi v običajnih dnevnikih kremah, kar zagotavlja zaščito kože skozi ves dan in celo leto ter ne samo poleti (30).

Glede na mehanizem delovanja delimo UV filtre na kemične UV filtre (spojine, ki UV svetlobo absorbirajo) in fizikalne UV filtre (spojine, ki UV svetlobo odbijajo in sipajo). Vendar pa tudi fizikalni UV filtri svetlobo absorbirajo, če so delci dovolj majhni. Ker pa so prvotno razviti fizikalni UV filtri vsebovali delce mikrometrskih velikosti, ki so svetlobo zgolj odbijali in sipali, se je razdelitev na kemijske in fizikalne ustalila in obdržala. Današnji UV filtri, ki temeljijo na ND, po tej razdelitvi sodijo tako med fizikalne kot tudi kemijske. Mehanizem delovanja  $\text{TiO}_2$  kot UV filtra torej temelji na kombinaciji absorpcije, odbijanja in sipanja svetlobe vseh valovnih dolžin. ND  $\text{TiO}_2$  v povprečju absorbirajo okrog 70 % vpadne svetlobe. Mehanizem je shematsko prikazan na Sliki 7. Vpadna UV svetloba se na delcih sipa in absorbira. Če je energija vpadne svetlobe višja ali enaka razliki energije valenčnega in prevodnega pasu (energiji prepovedanega pasu), se svetloba absorbira, saj se elektroni vzbujajo v višja energijska stanja v prevodni pas, tako da v valenčnem pasu nastanejo "luknje" valenčnega pasu. Zaradi absorpcije ima sipana svetloba nižjo energijo (večjo  $\lambda$ ), čemur pravimo neelastično sipanje. Sipana svetloba se sipa naprej na ostalih delcih, ki jih zadene, vendar je to sipanje elastično, saj je energija te sipane svetlobe nižja od energije prepovedanega pasu, zato ne pride do absorpcije. Nanokristalinični  $\text{TiO}_2$  torej absorbira svetlobo z  $\lambda$  enako ali nižjo od 400 oz. 387 nm (31).





Slika 7: Shematski prikaz mehanizma delovanja  $\text{TiO}_2$  kot UV filtra. Modre puščice predstavljajo vpadno UV svetlobo, ki se delno sipa (zelene puščice), delno pa absorbira. Po absorpciji pride do relaksacije, pri čemer se emitira svetloba (rdeče puščice) (32).

### 1.6.3 Protitumorsko delovanje

Po nekaterih raziskavah sodeč, ND  $\text{TiO}_2$  zavirajo rast in razmnoževanje tumorskih celic, medtem ko na normalne ne vplivajo ali pa je njihov učinek minimalen. Tumorske celice fagocitirajo ND, ki se združijo z lizosomi, kar ima lahko za posledico uničenje celice. V raziskavah so ND  $\text{TiO}_2$  uporabili kot fotoobčutljivo spojino za fotodinamično terapijo endobronhialnega in ezofagalnega raka (32).

ND  $\text{TiO}_2$  s funkcionalizirano površino (površina prekrita s polimeri z aktivnimi  $-\text{OH}$ ,  $-\text{NH}_2$  ali  $-\text{COOH}$  skupinami) dokazano uničujejo tumorske celice, vendar pa *in situ* izpostavitve UV svetlobi omejuje njihovo uporabo. Tako ima zdravljenje s fotoaktivacijo še določene omejitve, ki jim bo potrebno poiskati rešitve. UV žarki ne morejo prodreti globoko v tkivo in zato je njihova uporaba omejena zgolj na "površinske" tumorje, prav tako pa je nastajanje ROS pod vplivom UV svetlobe kratkotrajno, zato ne more zagotoviti kontinuiranega pobijanja rakavih celic (33).

## 1.7 Toksičnost $TiO_2$

Delci  $TiO_2$  z velikostjo  $>100$  nm so znani kot biološko inertni in netoksični tako za ljudi kot za živali in že izvedene študije so pokazale, da ND  $TiO_2$  večinoma niso cito- in genotoksični (8). Dokazano je tudi, da je toksičnost ND  $TiO_2$  odvisna od njihove koncentracije. Pokazano je bilo, da lahko do toksičnega odziva na celicah oz. tkivih pride tudi po izpostavitvi praktično netoksičnim ND, kadar je njihova količina zadostna (34). Celice so se sposobne odzvati z antioksidativno "obrambo" na nizke koncentracije ND, posledica večjih odmerkov pa so lahko vnetne reakcije in celo celična smrt (35).

Kljub temu, da se  $TiO_2$  že več desetletij uporablja kot pigment v kozmetiki, so bile prve študije o pomenu velikosti delcev za njihovo toksičnost objavljene šele leta 1990. Že takrat so dokazali, da je toksičnost delcev odvisna od njihove velikosti in da prisotnost ND  $TiO_2$  povzroča nastanek ROS, tako zunaj (fotokataliza) kot znotraj celic. Obseg nastajanja ROS je znatno večji v primeru delcev nanometrskih kot mikrometrskih velikosti (10). In čeprav so delci v pigmentih načeloma mikronskih velikosti, so med njimi lahko prisotni ND, zato je pomembno poznati poleg povprečne velikosti delcev tudi porazdelitev velikosti (6). Dokazano je bilo, da delci  $TiO_2$  velikosti 10 – 20 nm že v odsotnosti UV svetlobe na bronhialnih epiteljskih celicah sprožijo oksidativne poškodbe DNA, lipidno peroksidacijo, nastajanje vodikovega peroksida in dušikovega oksida, medtem ko delci anatasa večji od 200 nm takšnih učinkov nimajo (13). Manjša velikost delcev namreč že sama po sebi (v odsotnosti UV svetlobe) pomeni večjo reaktivnost. Količina ROS, ki nastane, pa je ob prisotnosti UV svetlobe še večja, saj absorbirana svetloba še dodatno poveča reaktivnost delcev (36).

Wang s sodelavci je dokazal, da so toksični učinki ND prehodne narave, saj si lahko celice v določenih pogojih po odstranitvi ND opomorejo, kar pa je odvisno od pogojev, katerim so bile predhodno izpostavljene (čas in koncentracija ND) (37).

V projektu Nanoderm so testirali standardne dermalne formulacije in komercialno dostopne izdelke z ND  $TiO_2$  na prašičji koži. Na podlagi elektronske mikroskopije kot tudi avtoradiografije so dokazali, da ND  $TiO_2$ , zlasti tisti, ki so obloženi, ne povzročajo škodljivih učinkov na zdravi koži. Obloga preprečuje njihovo agregiranje, hkrati pa tudi pojav škodljivih fotokatalitičnih lastnosti, npr. tvorbo ROS. Ugotovili so, da ND mehansko prodirajo v vrhnje sloje rožene plasti, vendar ne vstopajo v vitalno tkivo. Izpostavitve živih celic kože ND je zato pod mejo detekcije in upoštevajoč celični odziv so sklenili, da uporaba sončnih krem z ND  $TiO_2$  ne predstavlja tveganja za zdravje posameznika, če je koža zdrava (38).

### 1.7.1 Mehanizmi toksičnosti ND TiO<sub>2</sub>

Citotoksičnost ND TiO<sub>2</sub> je odvisna od njihove velikosti. Tako zelo drobni ND (<100 nm) lahko povzročajo vnetja, fibroze, poškodbe dednega materiala in pljuč (39). Zaradi možnosti prehoda skozi subepitelijski prostor lahko prehajajo tudi kožo in vplivajo na imunski sistem (40).

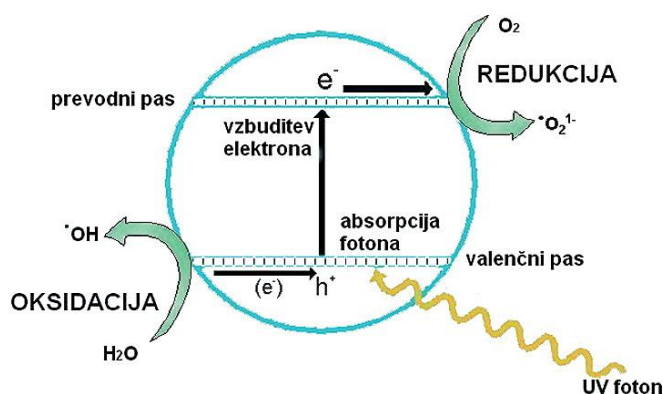
Tako ima prisotnost ND TiO<sub>2</sub> lahko številne posledice:

- tvorbo ROS in indukcijo z oksidativnim stresom povezanih genov za encime kot so hem oksigenaza-1, tioredoksin reduktaza, glutation-S-transferaza in katalaza; hkrati pride do zmanjšanja količine glutationa (GSH) v celici, kar lahko ima za posledico programirano celično smrt tj. apoptozo (41). *In vitro* študije izvedene na različnih celičnih sistemih kažejo različne stopnje vnetnih in s celičnim stresom povezanih odzivov, ki se kažejo s spremembami v ekspresiji genov in celičnega signaliziranja (povezanega s Ca<sup>2+</sup> in citokini).
- vnetje, ki se kaže s povečano količino interleukinov (IL-1, IL-6, IL-8), TNF –  $\alpha$ , idr.
- alergije,
- spremembo funkcije mitohondrijev,
- poškodbo DNA in proteinov,
- vplive na imunski sistem idr.

Vsi ti učinki vodijo v zmanjšanje celične površine, zmanjšane proliferacije in mobilnosti celic ter zmanjšanje sposobnosti krčenja kolagena (8). Nekatere študije dokazujejo, da lahko ND TiO<sub>2</sub> prehajajo nepoškodovano kožo in da jih lahko zaznamo ne le v krvi, ampak tudi v drugih tkivih. Lademann s sodelavci je ugotovil, da že mikrometrski delci TiO<sub>2</sub> prehajajo skozi roženo plast in skozi nekatere lasne folikle ter lahko vplivajo na imunski sistem (42). Vendar pa več študij govori v prid domnevi, da ND skozi nepoškodovano kožo ne prehajajo (43). Čeprav nabor informacij o varnosti dermalne uporabe ND TiO<sub>2</sub> narašča, je vedenje še vedno pomanjkljivo, zato ne moremo govoriti o zanesljivi varnosti le-teh (44). Najbolj je pomanjkljivo prav vedenje o posledicah dolgoročne in kontinuirane izpostavitve, ki pa je glede na obseg uporabe ND prav gotovo ključnega pomena za potrditev njihove varnosti. Hkrati je pogosto težavna interpretacija razpoložljivih rezultatov *in vitro* študij, saj se v študijah uporablja kemijsko različne ND, različne celične kulture, prav tako pa se razlikuje način izpostavitve in njeno trajanje.

## 1.7.2 Fotoaktivacija in tvorba ROS

Uporaba ND lahko povzroči tvorbo radikalov, kar se še poveča pod vplivom svetlobe. Kanadski znanstveniki so že leta 1997 dokazali, da delci, ki so jih izolirali iz sončne kreme, povzročijo tvorbo hidroksilnih ( $\text{OH}^\cdot$ ) ionov, ki lahko poškodujejo DNA ter vodijo do nastanka kožnega raka (45). Delci nanometrskih velikosti poleg sipanja svetlobe, le-to tudi v veliki meri absorbirajo - ND  $\text{TiO}_2$  absorbirajo približno 70 % vpadne UV svetlobe. Zaradi absorpcije svetlobe preide  $e^-$  iz najvišje energijske ravni na prvo vzbujeno raven, pri čemer nastanejo prosti  $e^-$  in valenčne luknje ( $h^+$ ). Oboji lahko reagirajo s prisotno vodo in kisikom ter povzročajo tvorbo radikalov. Sprožijo se lahko veržne reakcije, ki vodijo do nastanka toksičnih in alergenih produktov, ki lahko poškodujejo tkivo ali uničijo druge komponente dermalne formulacije (Slika 8).



Slika 8: Shema nastanka radikalov, ki ga katalizirajo ND  $\text{TiO}_2$  (32).

Škodljive fotokatalitične lastnosti nanokristaliničnih fizikalnih UV filtrov lahko preprečimo oz. jih zmanjšamo, če delce obložimo s spojinami, ki tvorijo hidratirane okside, ki lovijo nastale hidroksilne radikale. Taki spojini sta npr. aluminijev oksid in silicijev oksid. (31).

Dokazano je tudi, da delci  $\text{TiO}_2$  sprožijo znotrajcelično tvorbo ROS v alveolarnih makrofagih in fagocitih, kar vodi do oksidativnega stresa in ima za posledico razpad membranskih struktur, peroksidacijo membranskih lipidov, neravnotežje znotrajceličnega kalcija in spremembe v metabolnih poteh. Prav tako se poveča koncentracija IL-8 v endotelijskih celicah in zniža koncentracija GSH v makrofagih. Vse to lahko vodi v programirano celično smrt – apoptozo (46).

## ***1.8 In vitro metode določanja toksičnosti ND na celičnih kulturah***

Glede na veliko uporabo nanotehnologije na vseh področjih človekovega življenja, je potreba po zanesljivih metodah, referenčnih materialih in standardnih protokolih vedno večja. Trenutno so *in vitro* testi na celicah v ospredju tako pri določanju toksičnosti, pri testiranju biomaterialov kot tudi pri testih izpostavljenosti snovem v okolju. Pri testiranju toksičnosti ND so osnova eksperimentov: nastajanje ROS, celično preživetje, celični stres, morfologija celic in privzem ND v celice (47).

### a) Tvorba ROS

Izpostavljenost ND vodi v celicah do tvorbe ROS in prevladujoč model za določanje tvorbe ROS so fagocitne celice (48). Nekateri testi temeljijo na neposrednem merjenju količine ROS, drugi testi pa so posredni in temeljijo na opazovanju posledic njihovega nastanka. Direktno merjenje ROS temelji na merjenju fluorescence, kot posledice reakcije nastalih ROS z dodanim reagentom, lahko pa nastanek ROS merimo z elektronsko paramagnetno (spinsko) resonanco (EPR). V prvem primeru nastali ROS oksidirajo reagent, kar vodi do nastanka spojine, ki fluorescira, kar lahko merimo. Pri EPR merimo prehod med elektronskimi nivoji prostih elektronov v magnetnem polju. Prosti elektroni izvirajo iz ROS ter reagirajo z dodanim reagentom (48).

Indirektne metode pa obsegajo merjenje količine npr. GSH, ki ga kot odgovor na nastanek ROS začne tvoriti ogrožena celica (49). Spet druge pa merijo obseg poškodb DNA ali membran celic, ki so posledica nastanka ROS (50).

### b) Celično preživetje

Testi celičnega preživetja temeljijo na reakcijah celičnega metabolizma. Večinoma ugotavljamo delež mrtvih ali živih celic v kulturi. Žive najpogosteje ugotavljamo s pomočjo reagenta, ki se v prisotnosti celičnih encimov razbarva, obarva ali kako drugače spremeni, kar lahko kvantitativno ali kvalitativno izmerimo s kolorimetričnimi ali fluorescenčnimi tehnikami. Reagenti, ki se v ta namen uporabljajo so lahko številni, npr. nevtrarno rdeče, triptansko modrilo, resazurin idr. Princip testov pa je lahko tudi merjenje količine sproščenih npr. laktat dehidrogenaze, ATP-ja, adenilatne kinaze ali pa se meri npr. mitohondrijski membranski potencial (50, 51).

Edina trenutno validirana metoda testiranja toksičnosti, ki je bila tudi vključena v REACH direktivo (»Registration, Evaluation, Authorisation of Chemicals«), je privzem nevtraln rdečega (NRU – Neutral Red Uptake) v fibroblaste celične linije NIH3T3, kjer se barvilo akumulira v lizosomih živih celic, kar lahko določimo z merjenjem absorbance ali fluorescence (52). Drugi testi vrednotijo nastanek fragmentirane DNA v apoptotičnih celicah kot npr. ELISA ali TUNEL test ter tako posredno delež mrtvih celic v vzorcu (53).

Najenostavnejši testi celičnega preživetja temeljijo na štetju živih/mrtvih celic pod svetlobnim mikroskopom, kjer rezultate primerjamo s kontrolnim vzorcem in jih kvalitativno ali kvantitativno ovrednotimo (53). Mrtve celice so značilno okrogle, niso več pritrjene (velja za pritrjene celične kulture), jedra pa vidimo (po obarvanju) zaradi kondenzacije kromatina manjša. Vendar pa se taki, mikroskopski testi preživetja največkrat uporabljajo za potrditev rezultatov drugih, prej opisanih metod (54).

### c) Celični stres

Pri teh testih ugotavljamo učinke izpostavitve celic ND, ki za celice niso smrtni. Lahko gre za spremembe v izražanju genov, sposobnosti fagocitoze ali pa vnetne reakcije, ki vodijo do spremenjenega fenotipa (55). Spremembe v izražanju genov najpogosteje ugotavljamo z verižno reakcijo s polimerazo (PCR), njeno novejšo različico PCR v realnem času, spremembe v izražanju proteinov pa z »western blotting« testom. Najpogosteje določamo gene npr. CDKN1A, NF- $\kappa$ B, GADD45 $\beta$ , IL-6, NF $\kappa$ BIA, EGFP ali proteine npr. laminin,  $\beta$ -aktin, ciklin D<sub>3</sub>, kolagen IV (54).

Najpomembnejši proteini, ki so pokazatelj vnetnih reakcij, so citokini. Le-te lahko določamo neposredno z različnimi imunskimi tehnikami kot so ELISA, kjer določamo en citokin, ali pa LINCOpex, kjer določamo npr. osem citokinov (56). Z najnovejšimi tehnikami pa lahko hkrati določamo še več vrst teh molekul. Ena od teh je različica pretočne citometrije (CBA – »Cytometric Bead Assay«), kjer se razvršča celice glede na njihovo fluorescenčno aktivacijo, ki jo dosežemo s fluorescenčno označenimi protitelesi, ki se vežejo na specifične citokine (57). Do danes so določili le nekaj (< 10) citokinov v celicah, ki so bile izpostavljene ND, vendar pa je to prav gotovo področje, ki veliko obeta in nam bo v prihodnje povedalo veliko več o celičnem odzivu na prisotnost ND (55). Kot alternativa testom na sesalskih celicah se lahko uporabljajo tudi testi na bakterijskih in drugih enoceličarjih, npr. E. Coli ali Tetrahymena thermophila (58).

d) Privzem ND v celico

Obseg in način vstopa delcev v celice, njihovo lokalizacijo in gibanje v celicah ugotavljamo s pomočjo različnih mikroskopskih metod. Najpogosteje uporabljamo presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) in njene različice visoko ločljivostni TEM (HR-TEM) ali »energy-filtering« TEM (EFTEM) (59, 60, 61). Dodatno se lahko za ugotavljanje privzema ND uporabljata tudi laserska »scanning« mikroskopija in »electron energy loss« spektroskopija (EELS) (62). Pomembna metoda, s katero lahko pridobimo informacije o mehanizmih potovanja ND, njihovi adheziji in načinih njihove interakcije s posameznimi celičnimi komponentami je »Multiple Particle Tracing« (MPT) in njene različice (63).

e) Rešetanje visoke zmogljivosti – »High-throughput screening« (HTS metode)

Te metode omogočajo sočasno testiranje različnih vrst ND v različnih koncentracijah na različnih celičnih linijah. Zanje so potrebne izjemno napredne naprave, ki omogočajo uporabo mikrotitrskih ploščic s 384 vdolbinami (»384-well plate«), metode detekcije pa so tudi tu merjenje fluorescence ali luminiscence. Metode so izjemno hitre in enostavne, a so danes večinoma še malo v uporabi (64).

*Preglednica IV: Nekateri in vitro testi določanja toksičnosti ND na celicah (55).*

Test citotoksičnosti	Princip detekcije
<b><u>Celično preživetje</u></b>	
MTT, MTS	kolorimetrična detekcija mitohondrijske aktivnosti
LDH	kolorimetrična detekcija sproščanja LDH
Nevtralno rdeče	kolorimetrična detekcija nepoškodovanih lizosomov
Kaspaze	fluorimetrična detekcija aktivnosti kaspaze-3 (marker apoptoze)
<b><u>Stresni odziv</u></b>	
DCF	fluorimetrična detekcija nastalih ROS
<b><u>Vnetni odziv</u></b>	
ELISA	kolorimetrična detekcija izločanja citokinov

## ***1.9 Zakonodajni vidik***

ND vsekakor zahtevajo pozornost strokovne in laične javnosti, saj so mnogi že prisotni na tržišču, regulativa glede varnosti le-teh pa zamuja po vsem svetu. Pri toksikoloških študijah je potrebno ovrednotiti izpostavljenost človeka preko prebavnega trakta, kože in dihal in upoštevati obrambne mehanizme, da lahko potem določimo tiste »varne« količine, ki smo jim še lahko izpostavljeni, upošteva celoten življenjski cikel ND od sinteze do razgradnje (65, 66). Proučiti je potrebno tako lokalne kot sistemske učinke ND. Težave pri vrednotenju toksičnega potenciala ND povzročajo tudi različne oblike v katerih se ND nahajajo, različni kemizmi samih ND, spremembe površine ND in vehikli, v kateri so ND dispergirani. Posledica nehomogenosti razreda ND so različni mehanizmi delovanja in farmakokinetika v različnih tkivih. V veliko pomoč raziskovalcem pri delu bi bil razvoj standardov tj. referenčnih nanodelcev.

Mnoge regulatorne agencije ne razlikujejo med nanotehnološkimi izdelki in klasičnimi proizvodi, zato nanotehnološka proizvodnja in izdelki do sedaj niso bili posebej zakonsko regulirani. Snovi nanometrskih velikosti so obravnavane kot variacije že obstoječih materialov ali formulacij in zanje ni zahtevana ločena registracija. Za enkrat regulatorni organi še ne upoštevajo edinstvenih bioloških lastnosti in potencialnega tveganja pri uporabi nanodelcev kot tudi ne dejstva, da se lahko toksični profil nanodelcev bistveno razlikuje od toksičnega profila večjih delcev istega kemizma. The Royal Society, ena vodilnih znanstvenih avtoritet, je leta 2004 v sodelovanju s Kraljevo akademijo (The Royal Academy of Engineering) že izdala poročilo o nanotehnologijah. Eden glavnih zaključkov je bil, da bi morali nanodelce obravnavati kot novo vrsto kemikalij, ker nanodelci sicer kemijsko ostanejo enaki večjim delcem enake snovi, povsem pa se razlikuje njihova interakcija s telesom. Na njihovo poročilo je odreagirala Evropska komisija za zaščito zdravja in potrošnikov, ki je dala izdelati mnenje o toksičnosti nanodelcev komisiji neodvisnih znanstvenikov, članom SCCP (Znanstvenega odbora za potrošniške proizvode). Z njimi so sodelovali tudi SCHER (Znanstveni odbor za zdravje in okoljska tveganja) in SCENIHR (Znanstveni odbor o novih in novo odkritih zdravstvenih tveganjih). Mnenje so izdali junija 2007 pod delovnim naslovom Nanoderm. Ugotovitve kažejo, da nobena od obstoječih metod ne ugotavlja toksičnosti pri večkratni uporabi in dolgoročne toksičnosti, hkrati pa je v dokumentu postavljenih pet kriterijev za določanje toksičnosti nanomaterialov. Vendar pa je celoten dokument zgolj



mnenje skupine znanstvenikov (SCCP), ki ni nujno usklajeno s pogledi in mnenji Evropske unije (6).

V prihodnosti bo potrebno upoštevati ne le vpliv ND na biološke sisteme v primerjavi z že znanimi delci, marveč tudi nove potencialne tarčne organe in načine vnosa v organizem. Preučiti bo potrebno porazdelitev ND po telesu in posledice uporabe ter ovrednotiti potencialne pozitivne in negativne posledice uporabe, saj so ND prav gotovo nova revolucija na vseh področjih našega življenja.

## 2 NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je ugotoviti vpliv ND TiO<sub>2</sub> na keratinocite po krajšem (24, 48 in 72 h) in daljšem času izpostavitve (3 mesece). V raziskavi bomo kot vzorčne ND uporabili anorganske delce TiO<sub>2</sub> v polimorfni obliki anatas. Prvi cilj naloge bo pripraviti disperzijo ND za nanos na celice, saj celic ne moremo izpostaviti ND v suhi obliki. Optimirali bomo metodo priprave disperzije ND z minimalno povprečno velikostjo delcev, hkrati pa bo sprejemljiva z vidika temperaturne obremenitve vzorca. Za dispergiranje delcev v mediju bomo uporabili soniciranje v UZ kadički in soniciranje z uporabo UZ sonde. Spremljali bomo povprečno velikost delcev v mediju, porazdelitev velikosti delcev in temperaturo vzorca v odvisnosti od časa in načina soniciranja. Optimirano metodo bomo nato uporabili za pripravo disperzij ND v MEM mediju, ki jih bomo uporabili v drugem delu naše raziskave za študije učinkov ND na celični liniji keratinocitov.

Celično linijo keratinocitov bomo uporabili za ugotavljanje *in vitro* varnosti oz. toksičnosti ND TiO<sub>2</sub>, saj so keratinociti tudi v *in vivo* pogojih tiste celice, ki so izpostavljene vplivom ND, ki jih na kožo nanašamo z različnimi dermalnimi formulacijami. Najprej bomo ugotavljali učinke ND v koncentracijskem območju 0,05 - 10 µg/mL na celice pri izpostavitvi po 24, 48 in 72 h. Na podlagi dobljenih rezultatov kratkoročnih študij bomo s koncentracijami ND, ki se bodo izkazale kot varne, začeli 3 mesečno dolgoročno študijo, kjer bomo celice kontinuirano izpostavljali ND TiO<sub>2</sub> določene koncentracije. Med poskusom bomo ovrednotili vpliv ND tako, da bomo rast celic spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom, ugotavljali njihovo število s štetjem in po določenem številu dodanih odmerkov pripravili fluorescenčno označene preparate ter mikroskopsko ugotavljali morebitne spremembe v primerjavi s kontrolnimi netretiranimi celicami. Po zaključenem tri mesečnem poskusu bomo z vrstično elektronsko mikroskopijo ugotavljali spremembe v morfologiji površine keratinocitov, ki bodo izpostavljeni ND TiO<sub>2</sub>, s presevno elektronsko mikroskopijo bomo skušali ugotoviti ali ND vstopajo v celice in, če vstopajo, kje v celicah jih nahajamo oziroma kje se kopičijo. Nadalje bomo ugotavljali, ali izpostavitve celic ND vpliva na znotrajcelični nastanek ROS, ali pride do kakšnih vidnih sprememb v obliki in velikosti jeder, aktinskih filamentov in mitohondrijski aktivnosti celic. Analizirali bomo tudi celični cikel celic, da bi ugotovili morebitni vpliv ND na genetski material tretiranih keratinocitov.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 Materiali

#### 3.1.1 Izhodne sestavine za izdelavo disperzije nanodelcev TiO<sub>2</sub>

- Titanov(IV) oksid, v obliki anatasa, nanodelci velikosti < 25 nm, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- Medij: MEM (Minimum essential medium), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija) z dodatki:
  - 10 % (v/v) fetalni goveji serum (Gibco® - Invitrogen, ZDA),
  - 1 % (v/v) n-esencialne aminokisljine (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
  - 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija) in

100 U/mL antibiotik (penicilin, streptomycin) in antimikotik (amfotericin B) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija).

#### 3.1.2 Celična kultura in reagenti

- *Celična kultura*: keratinociti (NCTC2544), ICLC, (Univerza v Genovi, Italija)
- *Medij*: MEM (Minimum essential medium) z dodatki; glej zgoraj
- *Pufer*: fosfatni pufer s pH 7,4 (PBS), pripravljen z raztapljanjem 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×12 H<sub>2</sub>O in 0,24 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v 800 mL destilirane vode, uravnanjem pH na 7,4 s HCl in dopolnitvijo do 1 L z destilirano vodo, pred uporabo razdeljen še na alikvote, steriliziran
- *Barvila za barvanje celičnih organel*:
  - Za mitohondrije: *Mito Tracker*® Red CMXRos (Molecular probes, Invitrogen™, Anglija)
  - Za jedra: *Hoechst 33342*, 2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride, (Honeywell *Riedel-de Haen*®, Nemčija)
  - Za aktin:

- Phalloidin–Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija), rdeče obarvanje
- Phalloidin, Fluorescein Isothiocyanate Labeled (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija), zeleno obarvanje
- *Sterilna voda*: bidestilirana voda, sterilizirana z avtoklaviranjem po postopku za sterilizacijo vsebine (121 °C, 20 min)
- *4 % Formalin* ali *paraformaldehid* (Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Nemčija)
- *Triton® X-100* (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- *MTS reagent* (CellTiter 96<sup>R</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, Madison, WI, ZDA)
- *0,25% Trypsin × EDTA* (Promega Corporation, Madison, WI, ZDA)
- *Metanol 99,8%* (Fluka, Nemčija)
- *Tripan modro* (Trypan blue solution 0,4 %; Sigma - Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija)
- *RNAza A brez DNA* (DNase-free RNase A, 1 mg/mL; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- *Propidijev jodid* (Propidium iodide solution 1mg/1mL; Molecular probes, Invitrogen<sup>TM</sup>, Anglija)
- *reagent za detekcijo reaktivnih kisikovih spojin (ROS)*, reagent: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate; (Molecular probes, Invitrogen<sup>TM</sup>, Anglija)

### **3.2 Aparature**

- Precizna tehtnica (Mettler Toledo, Švica)
- Ultrazvočna kadička, (Sonis 4, Iskra, Slovenija)
- Ultrazvočna sonda, (Ultrasonic processor, Cole-Parmer, model CV 33, USA)
- PCS naprava, Zetasizer Nano ZS (Malvern, Anglija)
- Zaščitna mikrobiološka komora (Iskra PIO, tip M 12 (pretok zraka 0,4 m/s, dimenzija filtra 1220x610x69 mm, zagotavlja čiste pogoje dela razreda 4 po ISO 14644-1)
- avtoklav (Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija)
- mikrotitrski čitalec (Safire<sup>2</sup><sup>TM</sup> Tecan, Švica)
- pH meter, (SevenMulti, Mettler Toledo, InLab® Expert Pro pH, Švica)

- avtomatske pipete (BIOHIT za 2-20, 10-100 in 100-1000  $\mu\text{L}$ , za velike volumne BIOHIT MIDI PLUS, Headquarters Biohit OYJ, Helsinki, Finska; EPPENDORF za 10  $\mu\text{L}$ , Hamburg, Nemčija)
- mikrotitrne ploščice s 96-imi vdolbinicami (TPP<sup>R</sup> Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- plastične polistirenske ploščice za gojenje celičnih kultur s 6, 12 in 24 vdolbinicami (TPP<sup>R</sup> Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- plastične epruvete (TPP<sup>R</sup> Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- invertni svetlobni mikroskop (Olympus CKX41, Japonska)
- fluorescenčni mikroskop Olympus IX 81
- CO<sub>2</sub> inkubator (SORVALL<sup>R</sup> Heraeus, KendroLaboratory products)
- centrifuga CENTRIC 322A (Slovenija)
- vodna kopel (Memmert, Micro+Polo d.o.o., Maribor, Slovenija; Lab Vision Corporation, Kalifornija, ZDA)
- hemocitometer Neubauer 0,0025 mm<sup>2</sup> (BRAND, Nemčija)
- števec celic (Upgreen Counters No. 40047, Tajvan)
- hladilnik (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- zamrzovalnik na - 20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- vortex EV- 202 (Tehtnica Železniki, Slovenija)
- krovna stekelca Assistent (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Nemčija)
- objektna stekla Assistent 50 Elka (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Nemčija)
- fotoaparatus Olympus C-7070, Japonska
- pretočni citometer (FacsCalibur cytometer; BD Biosciences, San Diego, USA)

### **3.3 *Priprava disperzije nanodelcev TiO<sub>2</sub>***

#### **3.3.1 Sterilizacija nanodelcev TiO<sub>2</sub>**

ND TiO<sub>2</sub> smo sterilizirali v zaprtem steklenem vsebniku v skladu s predpisom v 6. izdaji Evropske farmakopeje (67) s suho toploto pri 160 °C 2 h.

### **3.3.2 Priprava disperzije nanodelcev TiO<sub>2</sub>**

Naša vzorca sta predstavljali disperzija TiO<sub>2</sub> v prečiščeni vodi in disperzija TiO<sub>2</sub> v rastnem mediju. V plastično epruveto smo v aseptičnih pogojih natančno natehtali približno 5 mg ND TiO<sub>2</sub> in jim dodali 5 mL medija, se pravi prečiščene vode ali rastnega medija, tako da smo dobili osnovno disperzijo s koncentracijo ~ 1 mg/mL.

### **3.3.3 Soniciranje disperzije TiO<sub>2</sub> z uporabo UZ kadičke in z UZ sondo**

Pripravljeno disperzijo ND TiO<sub>2</sub> s približno koncentracijo 1 mg/mL smo najprej dobro pretresli in jo nato vpeli v stojalo, tako da je bil vzorec v epruveti potopljen v UZ kadičko. Vkllopili smo soniciranje in v predhodno določenih časovnih točkah (5, 10, 15, 20 min) odvzeli vzorce disperzije ter izmerili velikost delcev.

Vzorec smo sonicirali tudi s pomočjo UZ sonde, kjer smo uporabili pulzni in kontinuirani način soniciranja. Disperzijo TiO<sub>2</sub> v epruveti smo vpeli v stojalo in v vzorec potopili UZ sondo. Epruveto z vzorcem smo potopili v ledeno kopel, da bi preprečili pretirano segrevanje vzorca zaradi vnosa velike količine energije s soniciranjem. Pri kontinuiranem soniciranju smo odvzeli vzorce po 1, 2, 3, 4 in 5 min in izmerili velikost delcev v disperziji. Sočasno smo izmerili tudi temperaturo vzorca. Pri pulznem načinu smo izbrali naslednji program soniciranja: 9,9 s soniciranja, čemur je sledilo 9,9 s premora brez soniciranja. Ta program smo ponovili 5-krat in v vsaki časovni točki (po 2, 5, 10, 15 in 20 min) izmerili velikost delcev v disperziji in temperaturo vzorca.

### **3.3.4 Vrednotenje velikosti nanodelcev TiO<sub>2</sub>**

#### **Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)**

Velikost in obliko ND smo vizualizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Prašek TiO<sub>2</sub> smo nanесли na kovinske nastavke z dvostranskim prevodnim ogljikovim trakom (premer 12 mm, Oxon, Oxford instruments, Velika Britanija) in jih opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom Supra 35 VP (Oberkochen, Zeiss, Nemčija) s pospeševalno napetostjo 1,00 kV in z uporabo sekundarnega detektorja.

#### **Fotonska korelacijska spektroskopija (PCS)**

Velikost in porazdelitev velikosti delcev v vodni disperziji ali disperziji v rastnem mediju smo določali s fotonsko korelacijsko spektroskopijo (Zetasizer nano ZS; Malvern Instrument, UK).

Vzorec disperzije ND smo redčili z ustreznim medijem, ki je bil enak disperznemu mediju same disperzije, vzorce smo ohladili na sobno temperaturo jih prenesli v plastično kiveto za merjenje velikosti in pomerili velikost delcev.

Pogoji meritev:

- temperatura : 25 °C
- kot merjenja: 90°
- število ponovitev: 3
- $\lambda$  laserske svetlobe (He-Ne laser): 633 nm
- lomni količnik medija: 1,330

Metoda temelji na meritvah fluktuacije intenzitete sipane laserske svetlobe, ki je posledica Brownovega gibanja delcev. Gre za naključno gibanje kot posledico trkov delcev z molekulami disperznega medija. Ker je gibanje naključno, je zgornja meja velikosti delcev, katere s to metodo še lahko merimo, omejena s sedimentacijo, ki je odvisna tako od velikosti kot tudi od gostote delcev. Rezultat meritve sta povprečna velikost delcev (hidrodinamski premer) in polidisperzni indeks (PI), ki podaja porazdelitev velikosti delcev v disperziji. Polidisperzni indeks (PI) je merilo porazdelitve velikosti delcev in lahko zavzame vrednosti med 0 in 1, pri čemer 0 pomeni monodisperzne, 1 pa zelo polidisperzne delce. Vrednosti  $PI < 0,1$  kažejo na dobro homogenost vzorca in ozko porazdelitev velikosti delcev, vrednosti  $PI > 0,3$  pa na večjo heterogenost (68).

### ***3.4 Presajanje celic in poskusi na celicah***

#### **3.4.1 Priprava disperzije nanodelcev TiO<sub>2</sub> za poskuse na celicah**

Predhodno sterilizirane ND smo v aseptičnih pogojih natehtali v plastično epruveto in jih dispergirali v takem volumnu rastnega medija, da smo dobili osnovno disperzijo ND s koncentracijo 1 mg/mL. Osnovno disperzijo ND smo nato sonicirali najprej 10 min v UZ kadički, nato še 10 min na UZ sondi po zgoraj opisanem pulznem programu. Pripravljeno disperzijo smo redčili z medijem in si pripravili serijo redčitev naslednjih koncentracij: 0,1, 1, 10, 20, 40, 50, 100 in 200  $\mu\text{g/mL}$  pri testih akutne toksičnosti ter 1, 10 in 20  $\mu\text{g/mL}$  pri testih kronične toksičnosti. V LAF komori smo k celicam v mediju dodali enak volumen vzorca (pri kratkotrajni toksičnosti 50  $\mu\text{L}$ , pri dolgotrajnih pa 1 mL) , tako da je bila končna koncentracija

TiO<sub>2</sub> na celicah polovico manjša, se pravi: 0,05, 0,5, 5, 10, 20, 25, 50 in 100 µg/mL pri kratkoročnih testih in 0,5, 5 in 10 µg/mL pri dolgoročnih..

### **3.4.2 Izpostavitev keratinocitov nanodelcem TiO<sub>2</sub> za krajši čas**

Za poskuse kratke izpostavljenosti keratinocitov ND TiO<sub>2</sub> smo v polistirenske plošče s 96-imi vdolbinicami v 4 paralelkah nasadili po  $2,5 \times 10^3$  celic v 50 µL medija, v 3 paralelkah pa smo nanесли samo medij, kar nam je služilo za kontrolo. Celice smo inkubirali 24 h pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub>, da so se pritrdile na podlago. Nato smo v vse vdolbinice – tiste s celicami in v kontrolne - dodali 50 µL disperzijo ND, tako da je bila koncentracija ND na celicah 0,05, 0,5, 5, 10, 15, 20, 25, 50 in 100 µg/mL. Vzorce smo inkubirali 24, 48 in 72 h, nakar smo proučevali preživetje celic in morebitne spremembe v njihovi morfologiji. Celic nismo presajali.

### **3.4.3 Izpostavitev keratinocitov nanodelcem TiO<sub>2</sub> za daljši čas**

Pri dolgoročni izpostavitvi smo keratinocite redno presajali in jim dodajali ND TiO<sub>2</sub> treh različnih koncentracij: 0,5, 5 in 10 µg/mL. V treh mesecih je to pomenilo 20 presajanj in 20 dodatkov ND. Pritrjene celice smo gojili v MEM mediju z dodatki v plastičnih polistirenskih ploščicah za gojenje celičnih kultur z 12 vdolbinicami.

Pred začetkom eksperimenta smo nasadili v vdolbinico polistirenske ploščice z 12 vdolbinicami  $1 \times 10^4$  celic v 1 mL medija. Vsak ponedeljek in četrtek smo celice presajali, v torek in petek pa smo dodajali nanodelce. Eksperimente smo izvajali v 3 paralelkah.

S celične kulture keratinocitov, ki je rastla pritrdjena na podlago, smo odlili rastni medij ter površino sprali s 500 µL PBS. Nato smo v vsako vdolbinico dodali 300 µL raztopine tripsina, da smo celice ločili od podlage in porušili medcelične povezave (inkubacija ~ 1 min), kar smo spremljali pod invertnim mikroskopom. Nato smo tripsin inaktivirali z dodatkom 1 mL medija z dodanim fetalnim govejim serumom, ki inaktivira tripsin. Celice smo s pipetiranjem sprali s podlage in jih kvantitativno prenesli v 15 mL centrifugirke ter disperzijo celic centrifugirali (1200 obratov/min, 5 min). Odpipetirali smo supernatant in celice redispergirali v 3 mL svežega medija ter jih nasadili v vdolbinice nove ploščice z 12 vdolbinicami, tako da smo v vsako od vdolbinic prenesli 200 µL celične suspenzije in dodali 800 µL medija. Po tem smo pod mikroskopom preverili, ali smo prenesli dovolj celic. Po 10, 15 in 20-em odmerku



pa smo celice prešteli in jih redčili tako, da smo jih v novo plato nasadili v enakem številu  $1 \times 10^4$  v 1 mL v vsako od 12 vdolbinic. Pred dodatkom ND k celicam, smo počakali 24 h, da so si celice po tripsinizaciji opomogle, oblikovale izrastke in se oprijele podlage.

### ***3.5 Vrednotenje učinkov $TiO_2$ na keratinocitih po kratkotrajni izpostavitvi***

#### **3.5.1 Neposredno opazovanje celične kulture pod mikroskopom**

S pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa (Olympus CKX41, Tokyo, Japan) smo opazovali rast keratinocitov v kulturi. Kontrolne keratinocite in keratinocite izpostavljene ND  $TiO_2$  v koncentracijah 0,05, 0,5, 5, 10, 25, 50, 75 in 100  $\mu\text{g/mL}$  smo po 24, 48 in 72 h slikali neposredno v plastičnih polistirenskih ploščicah za gojenje celičnih kultur ter opazovali razlike v številu oz. gostoti poraščenosti in morfologiji celic.

Invertni mikroskop uporabljamo pri delu s celičnimi kulturami, ker omogoča direktno opazovanje celic v posodi, v kateri rastejo. Pri tej vrsti mikroskopa so objektivni nameščeni pod mizico, zato višina posode ne ovira ostrenja slike tudi pri objektivih z večjimi lastnimi povečavami in majhnimi delovnimi razdaljami. Preparat je osvetljen od zgoraj. Posebne prizme v spodnjem delu mikroskopa svetlobne žarke, ki prihajajo iz preparata skozi objektiv, usmerijo zopet poševno navzgor v tubus z okularjem, ki je nameščen enako kot pri običajnih svetlobnih mikroskopih. Tudi pri invertnem mikroskopu je optični del lahko prirejen tako, da omogoča faznokontrastno ali fluorescenčno mikroskopijo (69).

#### **3.5.2 Fluorescenčna mikroskopija**

V polistirensko ploščo s šestimi vdolbinami smo na dno vsake vdolbinice položili predhodno sterilizirano krovno stekelce in nanj odpipetirali 3 mL disperzije celic tj.  $5,0 \times 10^5$  keratinocitov in jih inkubirali 24 ur pri temperaturi  $37^\circ\text{C}$  in 5 %  $\text{CO}_2$ , da so se pritrdili na podlago. Nato smo dodali disperzijo ND  $TiO_2$  tako, da je bila koncentracija ND na celicah 0,5, 5 in 10  $\mu\text{g/mL}$ . Vzorce smo inkubirali 24, 48 in 72 h ter nato pripravili preparate za fluorescenčno mikroskopijo. Odpipetirali smo medij in celice sprali s 500  $\mu\text{L}$  PBS. Dodali smo 500  $\mu\text{L}$  barvila za mitohondrije, da je bila koncentracija na celicah 50 nM, in celice inkubirali 30-45 min pri  $37^\circ\text{C}$  in 5 %  $\text{CO}_2$ . Sledilo je spiranje s PBS in dodatek 500  $\mu\text{L}$  4 %

formalina, da so se celice pritrdile na podlago. Po ponovnem spiranju s pufrom smo za permeabilizacijo celic dodali 500  $\mu\text{L}$  0,25 % raztopine detergenta Triton-X 100 in inkubirali pri sobni temperaturi 10 min. Ponovno smo celice sprali s PBS in dodali 500  $\mu\text{L}$  barvila za jedra s koncentracijo 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in jih inkubirali 30 min v temi pri sobni temperaturi. Po ponovnem spiranju s PBS smo dodali še 500  $\mu\text{L}$  raztopine barvila za aktin s koncentracijo 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in pol ure inkubirali pri istih pogojih kot prej. Nato je sledilo še zadnje spiranje preparatov s PBS-om.

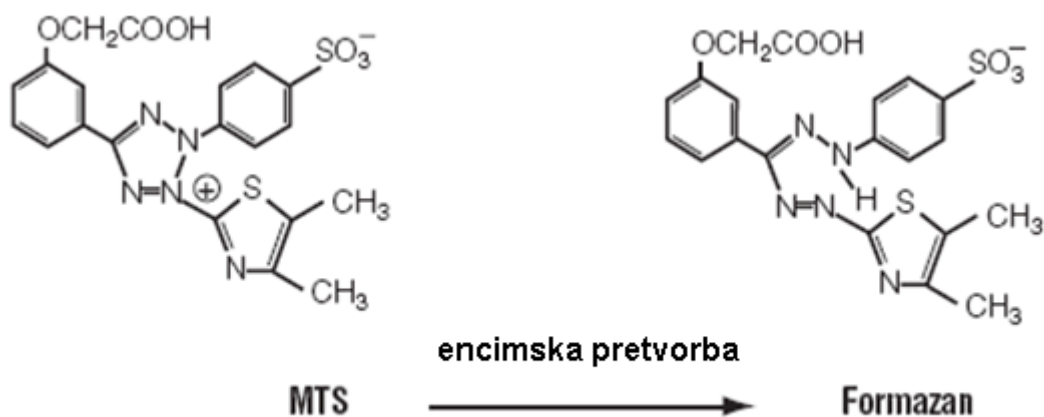
Tako tretirane celice smo skupaj s krovnim steklom prenesli na objektno steklo, ki smo ga predhodno premazali s snovjo, ki preprečuje bledenje in tako poveča obstojnost fluorescenčnih barvil. Preparate smo pustili v temi vsaj 24 h in nato robove krovnega stekla premazali z običajnim lakom za nohte ter jih shranili v hladilniku zaščitene pred svetlobo.

Pripravljene preparate smo pregledali s fluorescenčnim mikroskopom. Celice smo posneli po rezinah pri filtrih, optimalnih za posamezno fluorescentno barvilo: modro (barvilo Hoechst 33342) pri filtru DAPI, rdeče (barvilo Phalloidin–Tetramethylrhodamine B isothiocyanate in *Mito Tracker Red CMXRos*) pri filtru Tx-Red, zeleno (Phalloidin Fluorescein Isothiocyanate) pri filtru FITC. Pri vsakem barvilu smo posebej nastavili intenziteto svetlobe in čas izpostavljenosti svetlobi. Ko smo pod temi pogoji rezine posneli, smo z dekonvolucijo odstranili signale, ki bi prihajali na posamezno rezino iz zgornje ali spodnje plasti ter bi motili našo zaznavo fluorescence v posamezni rezini celice. Ker so nekatera barvila fluorescirala pri več filtrih, smo mešanje barv odstranili s programom »unmixing«.

### 3.5.3 Ugotavljanje preživetja celic z MTS testom

Celicam, ki smo jih predhodno izpostavili različnim koncentracijam ND  $\text{TiO}_2$  (0, 0,05, 0,5, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), smo po 24, 48 in 72 h dodali po 10  $\mu\text{L}$  MTS reagenta in jih inkubirali 3 h pri 37 °C in 5 %  $\text{CO}_2$ . Nato smo s čitalcem mikrotitrskih ploščic izmerili absorbanco pri valovni dolžini 490 nm. Rezultate preživetja celic smo podali relativno glede na kontrolo tj. celice, ki jih nismo izpostavili ND.

MTS test temelji na določanju aktivnosti encima mitohondrijske dehidrogenaze, ki je posredni kazalec preživetja celic. Gre za kolorimetrično metodo za ugotavljanje števila živih celic v študijah proliferacije in toksičnosti. Raztopina MTS reagenta vsebuje 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol (Slika 9) in fenazin etosulfat (PES), ki izboljša kemijsko stabilnost reagenta v raztopini.



Slika 9: Kemijski formuli MTS reagenta in formazana, ki nastane z encimsko reakcijo v metabolno aktivnih celicah.

MTS tetrazolijev kompleks reducirajo žive celice v rdeče obarvan produkt, ki je topen v rastnem mediju. Pretvorbo omogočajo NADPH ali NADH dehidrogenazni encimi v metabolno aktivnih celicah. Postopek izvedemo z neposrednim dodatkom reagenta v celično kulturo. Celice z reagentom nato inkubiramo 1 - 4 ure, nakar izmerimo absorbanco pri 490 nm. Absorbanca je sorazmerna številu živih celic v kulturi in njihovi metabolni aktivnosti (70).

V primeru določanja akutne toksičnosti smo ND v različnih koncentracijah dodali enakemu številu celic in opazovali, kako različen čas izpostavitve vpliva na njihovo preživetje. Le-tega smo določali posredno z merjenjem aktivnosti mitohondrijev.

$$\text{Preživetje celic} = \frac{(A_{vz} - A_{vz0}) \times 100 \%}{(A_k - A_{k0})}$$

$A_{vz}$ ....absorbanca vzorca,

$A_{vz0}$ ....absorbanca ND v mediju,

$A_k$ ....absorbanca kontrolnih celic v mediju, ki jim je bil dodan le MTS reagent, brez ND,

$A_{k0}$  ... absorbanca medija;

## ***3.6 Vrednotenje učinkov TiO<sub>2</sub> na keratinocitih po dolgotrajni izpostavitvi***

### **3.6.1 Neposredno opazovanje celične kulture pod mikroskopom**

Med ugotavljanjem učinkov ND TiO<sub>2</sub> na celice po daljšem času izpostavitve smo tekom poskusa celice ves čas kvalitativno spremljali pod invertnim svetlobnim mikroskopom. Opazovali smo gostoto celic, njihovo morfologijo in pritrnitev na podlago. Poleg tega smo tekom poskusa kronične toksičnosti ugotavljali številsko koncentracijo celic s štetjem le-teh s pomočjo hemocitometra v Neubauerjevi komori. Štetje smo izvajali po 10, 15 in 20-em odmerku. Disperzijo tripsiniziranih celic smo dobro premešali ter je 10 µL nanegli s pipeto na hemocitometer, ki smo ga predhodno sprali s 70 % etanolom in posušili na zraku. Celice smo prešteli pod svetlobnim mikroskopom s pomočjo kvadratne (4×4) mreže in celičnega števca.

Volumen, v katerem štejemo celice (dimenzije Neubauerjeve komore):

$$1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0,1 \text{ mm} = 0,0001 \text{ mL} = 10^{-4} \text{ mL}$$

Število celic/mL = (število vseh prešteti celic/število prešteti kvadratkov na mreži hemocitometra) × faktor redčenja × 10<sup>4</sup>

Prešteli smo celice v štirih poljih in določili povprečno številsko koncentracijo celic v vzorcu oz. absolutno število celic v posamezni vdolbini polistirenske plošče.

### **3.6.2 Fluorescenčna mikroskopija**

Preparate celic po dodatku 10, 15 in 20-tega odmerka ND TiO<sub>2</sub> smo pripravili po enakem postopku kot v primeru kratkotrajne izpostavitve in jih nato pregledali in posneli s fluorescenčnim mikroskopom.

Aktivnost mitohondrijev smo poleg MTS testa ugotavljali tudi kvalitativno preko primerjave intenzitete fluorescence mitohondrijev pri istih nastavitvah parametrov pod fluorescenčnim mikroskopom.

### **3.6.3 Vrednotenje metabolne aktivnosti po dolgotrajni izpostavitvi nanodelcem TiO<sub>2</sub>**

Tekom vrednotenja učinkov ND na celice po dolgotrajni izpostavitvi smo po 10, 15 in 20-em dodanem odmerku izvedli MTS test, ki nam je v tem primeru služil za vrednotenje razlik v metabolni aktivnosti celic. V ta namen smo izhajali iz enakega števila celic v vseh vzorcih. Celice smo prešteli in  $2,5 \times 10^3$  celic prenesli v posamezno vdolbinico plošče s 96-timi vdolbinicami. Po 24 h, ko so se celice pritrdile, smo v vsako vdolbinico dodali 10  $\mu$ L MTS reagenta. Po treh urah inkubacije pri 37 °C in v atmosferi s 5 % CO<sub>2</sub> smo izmerili absorbanco vzorcev pri 490 nm ter ovrednotili metabolno aktivnost celic relativno glede na kontrolo.

### **3.6.4 Vrstična elektronska mikroskopija**

Morfologijo površine keratinocitov smo vrednotili s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije (SEM). Po zaključeni 3 mesečni izpostavitvi keratinocitov ND smo jih nanegli na inserte s porozno membrano (Cell Culture Inserts, BD Falcon, Heidelberg, Nemčija) in jih inkubirali pri 37 °C in 5 % CO<sub>2</sub> 24 h, da so se pritrdili. Nato smo jih sprali s PBS in jih fiksirali z raztopino 2 % (m/v) paraformaldehida in 2 % (v/v) glutaraldehida v 0,1 M kakodilatnem pufri, pH 7,4, 2 h pri 4 °C. Po spiranju z 0,1 M kakodilatnim pufrom in fiksaciji z 1 % (m/v) OsO<sub>4</sub>, je sledila dehidracija vzorcev s serijo raztopin acetona in vode naraščajoče koncentracije. Preparate smo nato posušili pri kritični točki, jih napanili z zlatom in opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (Jeol JSM 840A).

### **3.6.5 Presevna (transmisijska) elektronska mikroskopija**

Transmisijsko elektronsko mikroskopijo (TEM) smo uporabili tako za določanje privzema in lokalizacije ND TiO<sub>2</sub> v keratinocitih, kot tudi za opazovanje morebitnih morfoloških sprememb znotrajceličnih organelov po trimesečni izpostavitvi ND TiO<sub>2</sub>. Postopek priprave vzorcev je bil enak kot pri vzorcih za SEM s to razliko, da smo za dehidracijo vzorcev uporabili serijo raztopin etanola in vode naraščajoče koncentracije. Nato smo vzorce zalili z epoksi smolo (Epon, Serva, Heidelberg, Germany) in jih prenesli v termostat, kjer je smola pri 38 °C polimerizirala. Ultratanke rezine vzorcev smo kontrastirali s pomočjo uranilaceta in svinčevega citrata ter nato preparate opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom (Philips CM 100).

### 3.6.6 Analiza celičnega cikla

Po zaključenem 3 mesečnem eksperimentu smo  $2 \times 10^5$  celic v 2 mL medija nasadili v ploščico z 12 vdolbinami. Celice smo inkubirali 24 h, da so se pritrdile na podlago. Nato smo jih sprali z 2 mL PBS in jim dodali 300  $\mu$ L raztopine tripsina, s katerim smo celice odlepili od podlage in porušili medcelične povezave (1 min). Nato smo tripsin inaktivirali z 1 mL medija z dodanim fetalnim govejim serumom, ki inaktivira tripsin. Celice smo s pipetiranjem sprali s podlage in jih kvantitativno prenesli v 15 mL centrifugirko. 10  $\mu$ L celic smo dodali 10  $\mu$ L triptan modrega in jih prešteli. Ostale celice smo centrifugirali na 1500 obratov/min 15 min. Odvzeli smo supernatant in sediment dispergirali v volumnu PBS-a, da je bila končna koncentracija celic  $5 \times 10^5$  v 200  $\mu$ L. Tako dobljeno suspenzijo celic smo dobro prepipetirali in jo prenesli v 4 mL ledeno mrzlega metanola in vzorec inkubirali v zamrzovalniku 1-2 h. Sledilo je ponovno centrifugiranje na 1500 obratov/min 20 min, odstranitev metanola in dodatek 500  $\mu$ L PBS. Disperzijo smo vnovič dobro premešali in dodali 10  $\mu$ L RNAze (začetna konc.=100 mg/mL) ter nato še 20  $\mu$ L propidijevega jodida (začetna koncentracija = 1 mg/mL), premešali in pustili na sobni temperaturi v temnem prostoru 0,5-1 uro. Pred vsako meritvijo smo vzorec dobro premešali (vorteksirali) in nato določili celični cikel s pretočno citometrijo.

### 3.6.7 Znotrajcelični nastanek ROS

Kot enega od končnih poskusov smo želeli izvedeti, v kolikšni meri vpliva izpostavitve celic ND TiO<sub>2</sub> na stopnjo znotrajceličnega nastajanja reaktivnih kisikovih spojin (ROS). Celice, ki so bile izpostavljene 20-tim odmerkom ND, smo nasadili v koncentraciji  $5 \times 10^3$  celic v 100  $\mu$ L medija v črno mikrotitrsko ploščico s 96-timi vdolbinami in jih pustili 24 ur, da so se celice pritrdile na podlago. Sledilo je dvakratno spiranje s 100  $\mu$ L PBS ter nato dodatek 100  $\mu$ L reagenta za določanje ROS, ki smo ga predhodno redčili z medijem do delovne koncentracije 10  $\mu$ M. Celice smo nato inkubirali pri 37 °C 20 minut, jih ponovno spirali s PBS-om, ter nato merili fluorescenco z ekscitacijo pri 498 nm in emisijo pri 522 nm.

Znotrajcelično nastajanje ROS smo ovrednotili z reagentom diklorofluoresceinom (DCFH), ki smo ga celicam dodali v obliki diacetata (DCFH-DA). Molekule le-tega pasivno prehajajo v celice, kjer jih deacetilirajo nespecifične esterase. Molekula DCFH tako ostane ujeta v celici, in se pod vplivom ROS oksidira do fluorescentne oblike 2',7'-diklorofluoresceina (DCF), ki je pokazatelj znotrajcelične oksidacije (71).

## **4 REZULTATI in RAZPRAVA**

### **4.1 Izdelava in vrednotenje disperzije nanodelcev TiO<sub>2</sub>**

#### **4.1.1 Vpliv načina in časa soniciranja na velikost delcev TiO<sub>2</sub> v disperziji**

Biološki učinek delcev je odvisen od njihove velikosti, kar pomeni, da imajo lahko delci drugačen učinek, če so združeni v agregate, kot če so prisotni posamično. Zato smo pred proučevanju vpliva TiO<sub>2</sub> ND na celice optimirali postopek izdelave disperzije, da bi agregacijo v največji možni meri zmanjšali. Za dispergiranje delcev smo uporabili soniciranje v ultrazvočni kadički ali z ultrazvočno sondo. Prvi način soniciranja je manj obremenjujoč za vzorec, saj je jakost ultrazvoka manjša v primerjavi s soniciranjem z UZ sondo. Rezultati kažejo, da smo z uporabo UZ kadičke tako v vodi kot v rastnem mediju razbili le največje agregate ND, saj se povprečna velikost delcev ni spustila pod 1000 nm. Najmanjšo povprečno velikost delcev smo izmerilo po 20 min soniciranja in je znašala 1090 nm; že po 10 min pa je bila povprečna velikost v vodi 1183 nm. Ugotovili smo, da se z daljšanjem časa soniciranja povprečna velikost delcev v disperziji bistveno ne spreminja. Tudi temperatura vzorca se med soniciranjem v UZ kadički ni bistveno spreminjala in ni presegla 37 °C, zato vzorcev nismo hladili. Temperaturo vzorca smo spremljali, ker bi lahko pretirano segrevanje zaradi vnosa energije s soniciranjem povzročilo spremembo lastnosti medija npr. denaturacijo proteinov v rastnem mediju, čemur smo se želeli izogniti.

Pri uporabi UZ sonde smo ugotovili, da se velikost delcev v vodi in mediju signifikantno ne razlikuje. Nekoliko manjši so bili delci v vodi, kjer je bila povprečna velikost  $414,9 \pm 4,5$  nm, medtem ko je bila le-ta v mediju  $463,6 \pm 12,8$  nm. Ta razlika v izmerjeni velikosti je lahko posledica sestave disperznega medija, ki je definiran s svojo viskoznostjo, pH-jem, ionsko močjo in prisotnostjo proteinov (6). Slednji (npr. goveji serumski albumin) so makromolekule, ki se lahko adsorbirajo na površino delcev v disperziji in tako povečajo njihovo povprečno velikost, ki jo izmerimo s fotonsko korelacijsko spektroskopijo, ali celo povečajo težnjo delcev po agregaciji (72).

PI naših disperzij ND TiO<sub>2</sub> se je v vodi gibal od 0,22 do 0,33, v rastnem mediju pa od 0,28 pa do 0,37, kjer je bil v povprečju vseskozi nekoliko večji (Preglednica V), kar kaže, da medij, v katerem delce dispergiramo, vpliva na njihovo disperzibilnost. Vrednost PI se ne zmanjšuje časovno odvisno in je v povprečju približno enaka, odvisna le od disperznega medija.

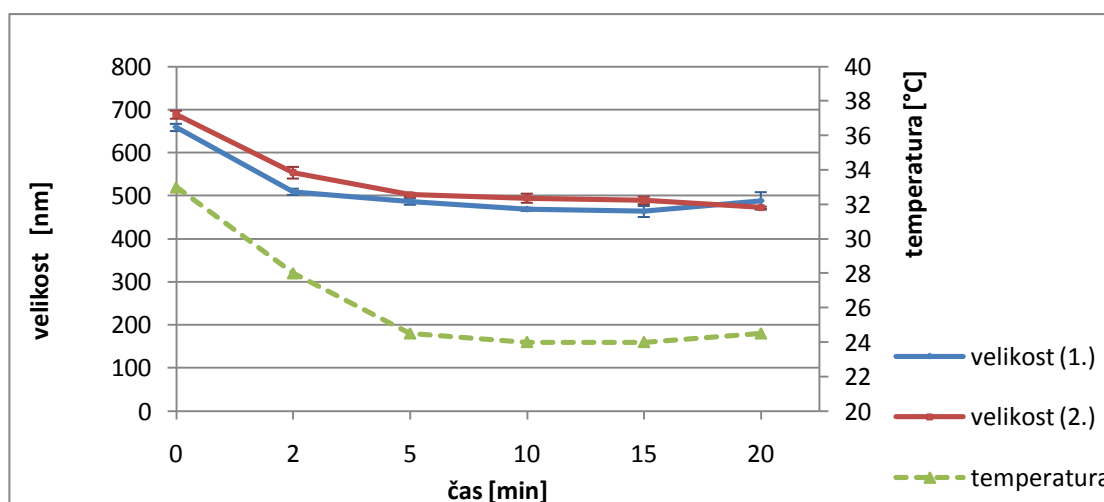
Vrednosti PI kažejo na precejšnjo heterogenost vzorcev tj. prisotnost agregatov različnih velikosti.

*Preglednica V: Vrednosti PI pri pulznem soniciranju z uporabo UZ sonde v vodi in v rastnem mediju.*

Čas [min]	Voda	Rastni medij
2	0,268 +/- 0,028	0,315 +/- 0,039
5	0,269 +/- 0,013	0,310 +/- 0,042
10	0,284 +/- 0,024	0,341 +/- 0,018
15	0,224 +/- 0,023	0,360 +/- 0,0013
20	0,231 +/- 0,020	0,281 +/- 0,006

Pri uporabi UZ sonde v pulznem načinu v začetku vidimo trend zmanjševanja povprečne velikosti delcev s časom soniciranja, ki pa se že nekje po 5 min ne spreminja več znatno in po 10 min soniciranja doseže minimalno vrednost (463,6 nm) (Slika 10).

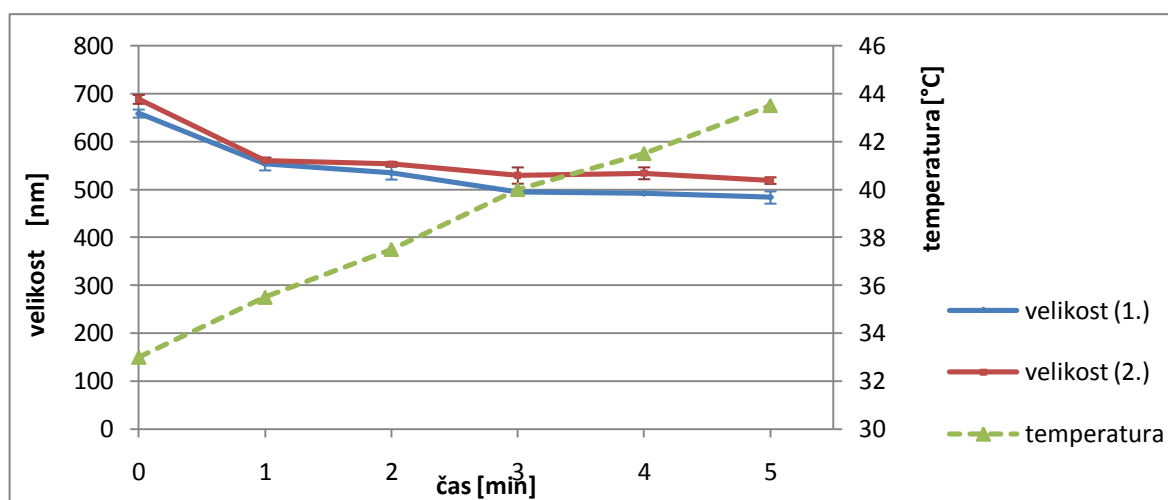
Pri soniciranju z UZ sondo pride do vnosa velike količine energije in vzorec se, če ga ne hladimo, močno segreva, zato smo soniciranje izvajali na ledeni kopeli. Začetna temperatura vzorca je bila zaradi predhodnega soniciranja v UZ kadički okrog 37 °C in se je, kot prikazuje Slika 10, med pulznim soniciranjem z UZ sondo na ledeni kopeli na začetku zniževala ter se nato ustalila nekje pri 25 °C.



*Slika 10: Povprečna velikost delcev (1. in 2. ponovitev) v odvisnosti od časa soniciranja z UZ sondo pri pulznem načinu ter časovno spreminjanje temperature.*



Pri kontinuirani uporabi UZ sonde (torej brez vmesnih »odmorov«) je bila izmerjena povprečna velikost delcev istega velikostnega razreda kot pri pulznem načinu soniciranja (Slika 11). Opazili smo podoben trend zmanjševanje povprečne velikosti delcev s časom kot pri pulznem načinu soniciranja. Minimalna povprečna velikost je bila 483,4 nm, kar smo dosegli že po 5 min soniciranja. Vzorec se je pri tem načinu soniciranja, kljub uporabi ledene kopeli, močno segreval (Slika 11) in temperatura vzorca je že po 3 min soniciranja presegla 40 °C. Tako visoki temperaturi pa smo se zaradi sestavin medija želeli izogniti. Rastni medij vsebuje proteine, ki bi pri teh pogojih lahko denaturirali.



*Slika 11: Povprečna velikost delcev (1. in 2. ponovitev) v odvisnosti od časa kontinuiranega soniciranja z UZ sondo ter časovno spreminjanje temperature vzorca.*

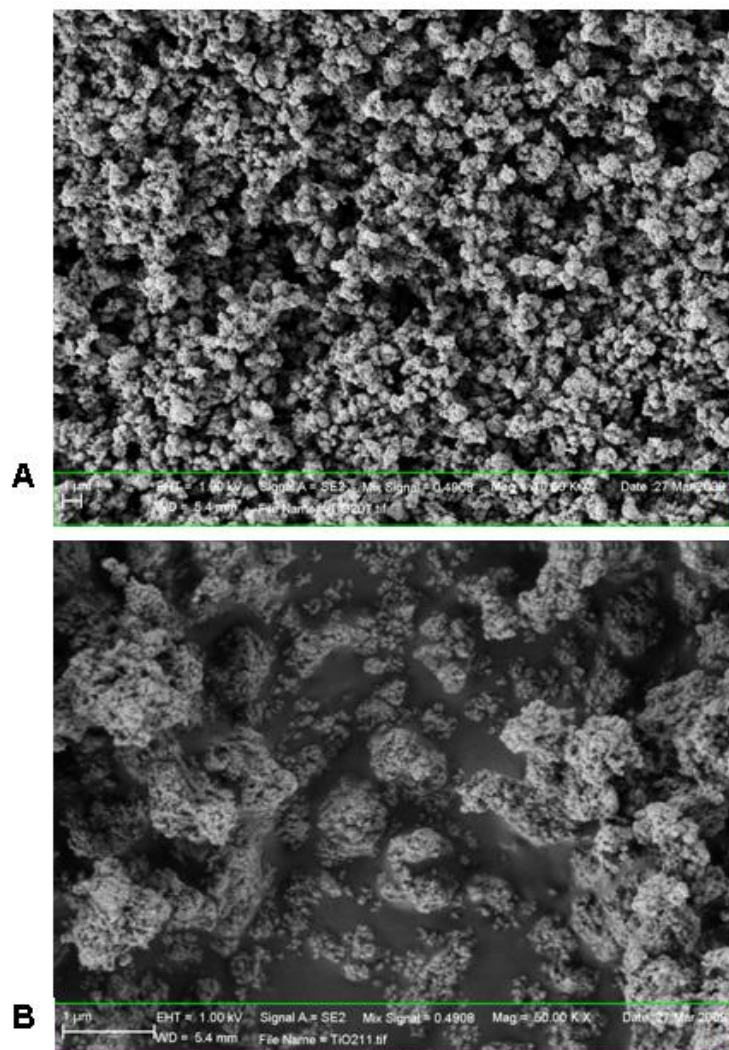
Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odločili, da bomo vzorce pred soniciranjem z UZ sondo predhodno 10 min sonicirali v UZ kadički, da razbijemo največje agregate, nato pa bomo vzorec pulzno sonicirali 10 min na ledeni kopeli (kar skupaj s premori pomeni ~ 20 min).

#### **4.1.2 Vrednotenje velikosti in morfologije delcev TiO<sub>2</sub>**

Proizvajalec ND TiO<sub>2</sub> v specifikaciji navaja, da je povprečna velikost delcev manjša od 25 nm. Analiza vzorcev s fotonsko korelacijsko spektroskopijo pa je pokazala, da imajo delci TiO<sub>2</sub> v disperziji povprečno velikost nekaj pod 500 nm, PI pa se je gibal nekje od 0,28 pa vse do 0,45. To kaže na veliko težnjo po agregaciji ND TiO<sub>2</sub> tako v vodi kot v rastnem mediju; sorazmerno velik PI pa kaže, da delci v disperziji niso enotne velikosti. Do podobnih rezultatov so v raziskavah prišli tudi drugi raziskovalci (73, 74). Ugotovili so, da je povprečna

velikost delcev v mediju  $\sim 330$  nm pri  $37^\circ\text{C}$  v prvi in  $\sim 480$  nm v drugi raziskavi, kjer je bila specificirana velikost delcev  $\text{TiO}_2$  15 nm. Majhni delci so zaradi velike številčne gostote močno podvrženi agregaciji in aglomeraciji, medtem ko večji delci večinoma ostanejo v neagregirani obliki (75).

Obstoj agregatov že v suhi obliki potrjuje slika praškastih delcev  $\text{TiO}_2$  posneta z vrstično elektronsko mikroskopijo, kjer vidimo sferične agregate delcev  $\text{TiO}_2$ , ki pa so v nasprotju z delci v disperziji dokaj enakomerne velikosti (Slika 12). Povprečna velikost delcev v disperziji je približno 20-krat večja od proizvajalčeve specificirane.

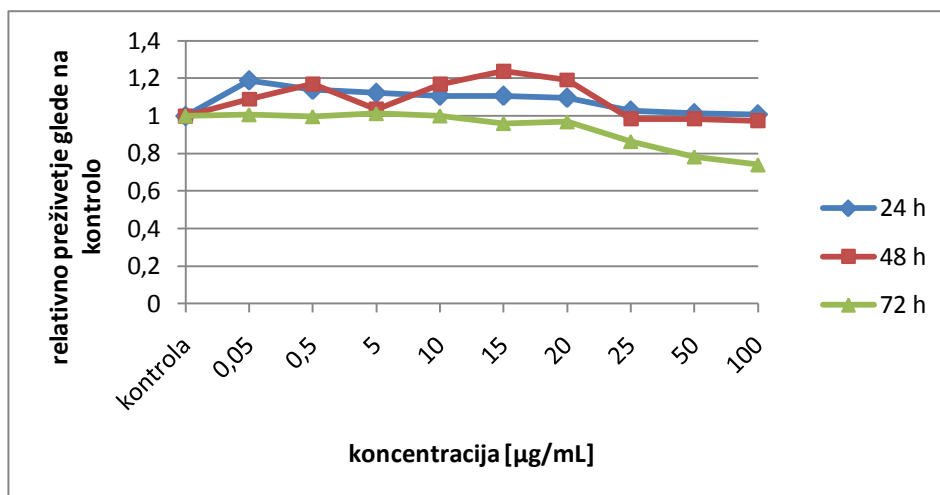


*Slika 12: Delci  $\text{TiO}_2$  posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom pri manjši (A) in večji (B) povečavi, kjer vidimo agregate neenakomerne velikosti.*

Agregacija neobloženih ND TiO<sub>2</sub> je posledica visoke površinske energije in se ji v biološkem okolju izjemno težko izognemo (6). Njena vloga je velika tako pri ND TiO<sub>2</sub> kot tudi pri drugih ND npr. ZnO, fulerenih in delcih SiO<sub>2</sub>. Pri njej lahko nastanejo tudi do nekaj mikrometrov veliki delci zelo neenakomernih velikosti (10, 76). Agregacija je lahko tako zunaj- kot znotrajcelična in ima signifikanten vpliv na toksičnost. Nastanek agregatov ND TiO<sub>2</sub> ima najverjetneje tudi velik vpliv na rezultate nadaljnih poskusov, saj imajo večji delci oz. agregati ND drugačne lastnosti kot delci nanometrskih velikosti, ki jih navaja proizvajalec (77). Eden od dejavnikov, ki vpliva na obseg agregacije, je ionska moč medija, agregacija pa je odvisna tudi od pH-ja (71). Ovrednotenje agregacije delcev v mediju je ključnega pomena tudi z vidika ugotavljanja od velikosti delcev odvisne toksičnosti (70, 77).

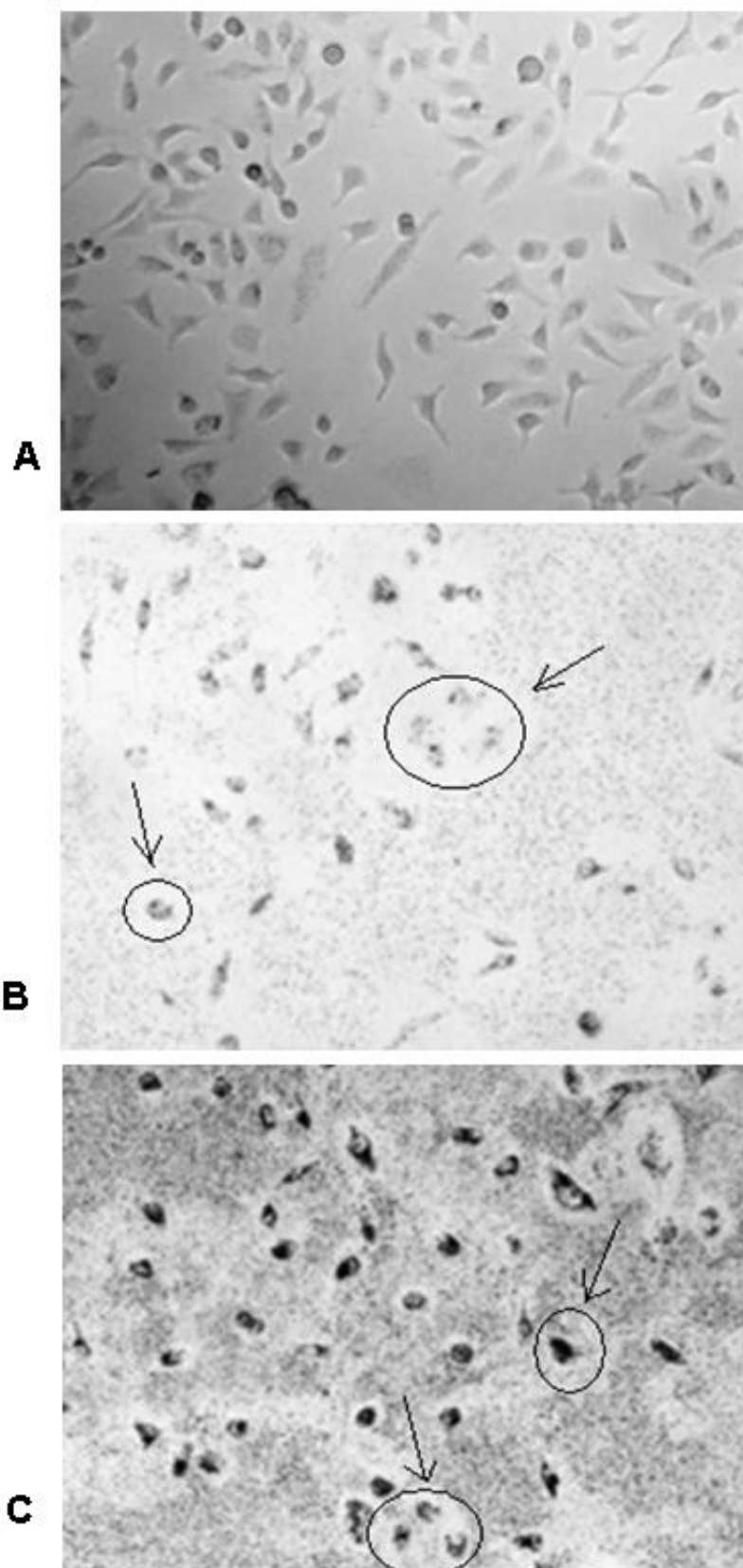
## ***4.2      Kratkotrajna izpostavitev celične kulture keratinocitov nanodelcem TiO<sub>2</sub>***

Pred ugotavljanjem učinkov dolgotrajne izpostavitve celic ND TiO<sub>2</sub> smo določili koncentracijo, ki je kratkoročno "varna". Ugotavljali smo učinke ND TiO<sub>2</sub> v koncentracijskem območju 0,05-100 µg/mL po 24, 48 in 72 h. Ugotovili smo, da čas izpostavitve ND nima signifikantnega vpliva na preživetje celic pri isti koncentraciji ND in da ND TiO<sub>2</sub> ne vplivajo na preživetje celic preko celotnega izbranega koncentracijskega območja (Slika 13). Izjema so le koncentracije > 20 µg/mL, kjer po 72 h opazimo nekoliko zmanjšano preživetje celic (Slika 13), kar potrjuje tudi ugotovitev, da se število celic z naraščanjem koncentracije ND zmanjšuje. Nekoliko zmanjšana mitohondrijska aktivnost celic po 72 h in pri višjih koncentracijah ND kaže, da ND TiO<sub>2</sub> najverjetneje mehansko preprečujejo proliferacijo celic, torej delujejo citostatično. Zato število celic v vzorcu ni naraščalo tako kot v kontroli, ampak je bilo glede na kontrolo relativno manjše verjetno zaradi manjšega števila delitev. V manjših odmerkih in pri krajšem času izpostavitve, se je metabolna aktivnost celo nekoliko povečala, a povečanje ni bilo signifikantno.



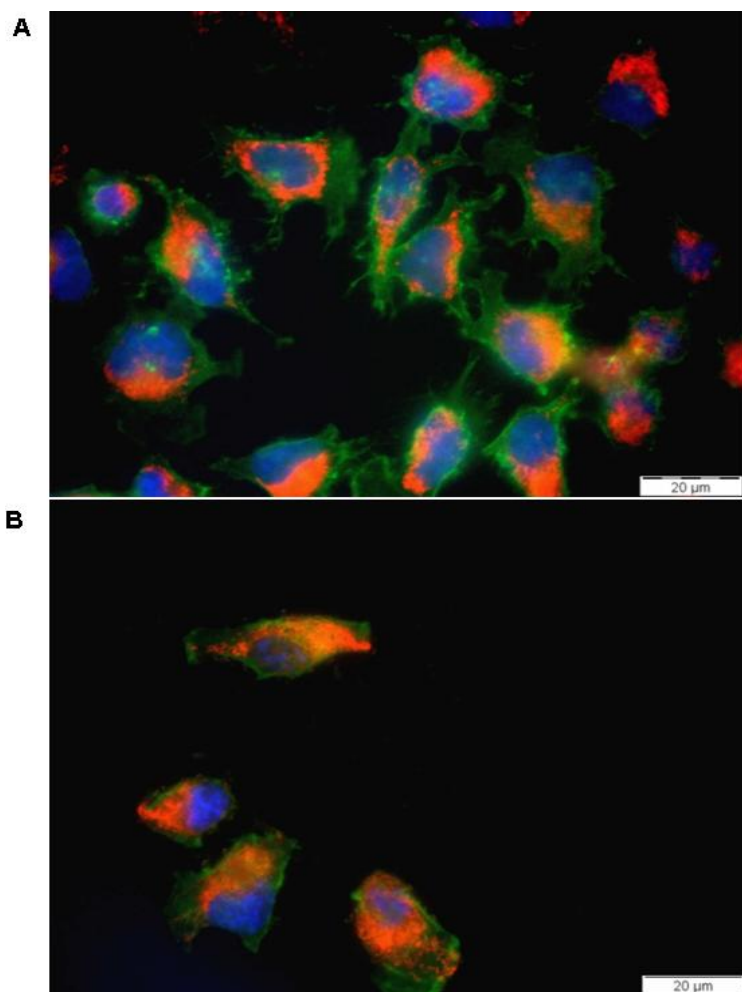
Slika 13: Relativno preživetje celic glede na kontrolo v odvisnosti od koncentracije in časa izpostavitve celic ND TiO<sub>2</sub>.

Rezultate potrjujejo tudi slike celic po izpostavitvi ND, kjer je lepo vidno, da imajo celice kljub izpostavitvi ND nespremenjeno velikost in morfologijo (Slika 14). Celice izpostavljene najvišji koncentraciji ND (100 µg/mL) so še vedno dobro pritrjene na površino in imajo morfologijo popolnoma primerljivo kontrolnim netretiranim celicam. Pod invertnim mikroskopom smo opazili, da se delci TiO<sub>2</sub> koncentrirajo v neposredni bližini celic oz. se vežejo na same celice, kar zmanjša količino delcev v okolici celic in se na slikah vidi kot svetlejša lise (Slika 14 B, C). Na tem mestu se nam je postavilo vprašanje, ali delci dejansko vstopajo v celice in če, kje v celici se kopičijo, oz. ali se delci le koncentrirajo okrog oz. na samih celicah.



*Slika 14: Kultura keratinocitov pod invertnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi 24 h po izpostavitvi disperziji ND TiO<sub>2</sub>: (A) kontrola, (B) 10 µg/mL in (C) 50 µg/mL.*

Slike preparatov celic, ki so bile 72 h izpostavljene ND TiO<sub>2</sub> v koncentraciji 10 µg/mL, kažejo, da se število celic po 72 h močno zmanjša (Slika 15). Celice so med seboj veliko manj povezane, verjetno tudi zaradi zmanjšane gostote celic v vzorcu, in aktinski filamenti so slabše vidni v primerjavi s kontrolo (Slika 15). V intenziteti fluorescence mitohondrijev ni bistvenih razlik med kontrolnimi celicami in celicami, ki so bile izpostavljene ND. Primerjava rezultatov ugotavljanja preživetja celic in slik preparatov je precej presenetljiva. Glede na znatno manjše število celic v vzorcu celic, ki so bile izpostavljene ND, bi pričakovali, da bo MTS test pokazal zmanjšano preživetje oz. v tem primeru zmanjšano število celic v vzorcu že pri nižjih koncentracijah, a je pokazal metabolno aktivnost primerljivo kontroli. Tak rezultat si lahko razlagamo s povečanjem mitohondijske aktivnosti, kljub manjšemu številu celic, kar pa spet na slikah preparatov ni vidno. Morda je razlika v intenziteti rdeče fluorescence mitohondijev kontrolnih in tretiranih celic premajhna, da bi jo vizualno zaznali.

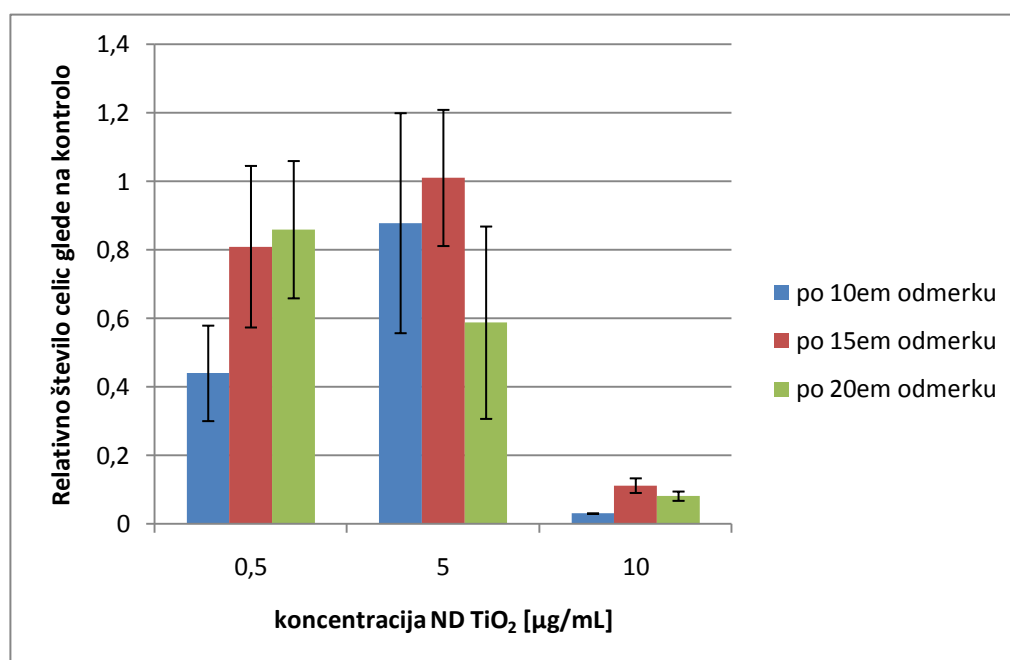


*Slika 15: Slika keratinocitov po 72 h urah posneta s fluorescenčno mikroskopijo (A) kontrolne celice in (B) celice izpostavljene ND TiO<sub>2</sub> v koncentraciji 10 µg/mL. Modro so obarvana jedra, rdeče mitohondriji in zeleno aktinski filament.*

### 4.3 Dolgotrajna izpostavitve celične kulture keratinocitov nanodelcem $TiO_2$

#### 4.3.1 Spremljanje števila, pritrditve ter oblike celic in celičnih organelov

V okviru kratkotrajnega testiranja nismo ugotovili nobenih znatnih učinkov ND  $TiO_2$  na keratinocite v koncentracijah 0,5, 5 in 10  $\mu\text{g/mL}$ , zato smo te koncentracije ND izbrali za kontinuirano dolgotrajno testiranje. Rast celic smo opazovali pod invertnim svetlobnim mikroskopom in tekom celotnega poskusa so celice kazale normalno celično rast. Celice so imele morfologijo primerljivo kontroli in so bile med sabo dobro povezane; podobno, kot smo prej opazili pri akutni izpostavitvi. Metoda štetja celic, ki je absolutna in se na njene rezultate lahko zanašamo z največjo gotovostjo, pa je pokazala, da je bilo signifikantno manjše število celic le v vzorcu tretiranem z največjo koncentracijo ND  $TiO_2$ , medtem ko pri ostalih dveh testiranih koncentracijah ni signifikantnih razlik (Slika 16). Ugotovili smo tudi, da večje število dodanih odmerkov ne povzroči zmanjševanja števila celic v vzorcu.

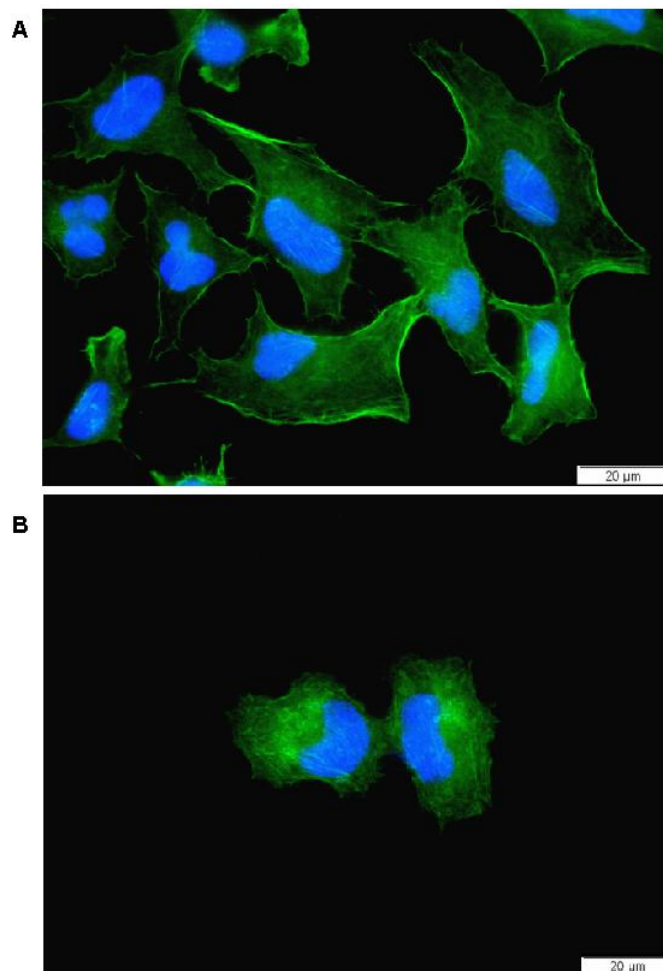


Sliki 16: Število celic v vzorcu relativno glede na kontrolo v odvisnosti od koncentracije dodanih ND  $TiO_2$  in števila dodanih odmerkov.

Pri največji koncentraciji, 10  $\mu\text{g/mL}$ , smo v vidnem polju mikroskopa komaj še našli kako celico. Če pri tem upoštevamo še dejstvo, da pod invertnim mikroskopom tudi pri dolgotrajni

izpostavitvi nismo opazili mrtvih celic, žive pa so ohranile normalno obliko, lahko sklepamo, da ND od določene koncentracije naprej mehansko ovirajo celično delitev in torej delujejo citostatično, ne pa tudi citotoksično. Pri najnižji testirani koncentraciji vidimo, da se število celic s časom relativno celo povečuje (povečevanje je nakazano, ni pa signifikantno), kar lahko kaže na to, da so se celice na prisotnost ND prilagodile.

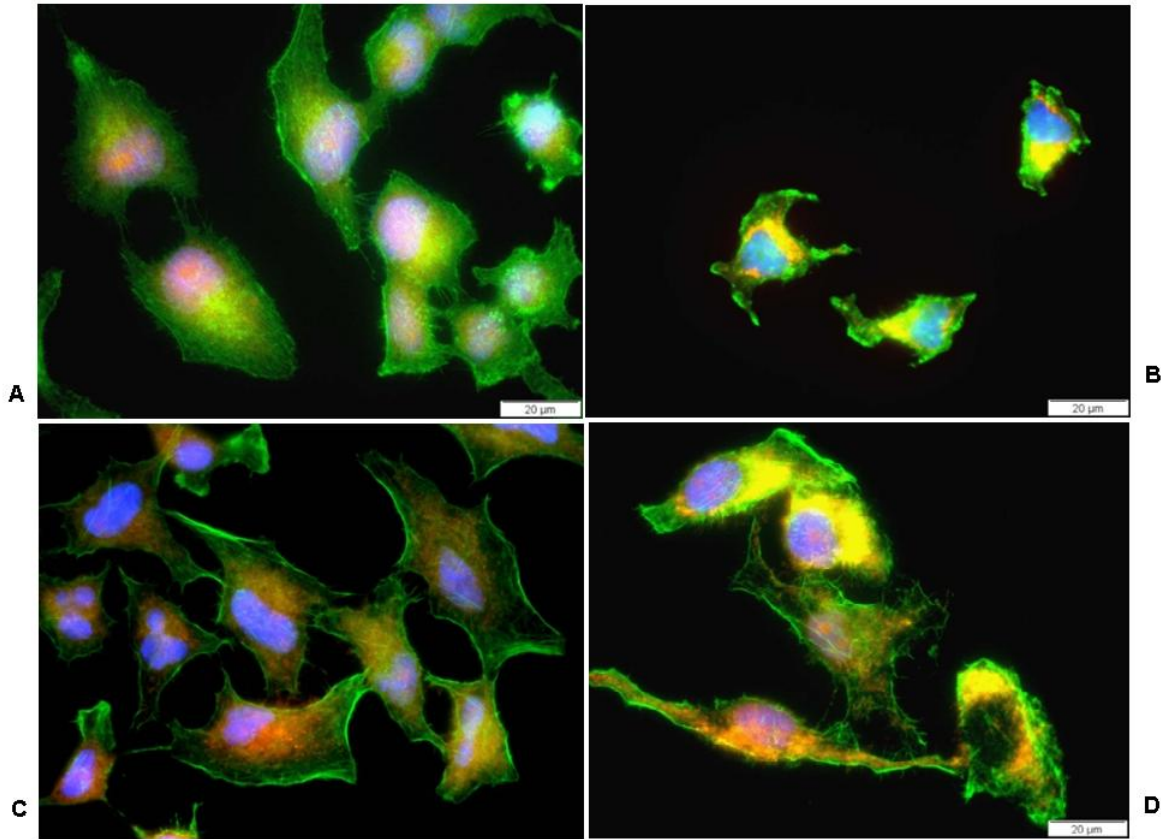
S pomočjo fluorescenčne mikroskopije smo opazovali spremembe v obliki celičnega jedra in aktinskih filamentov. Pri kontrolnih celicah vidimo lepo razširjene aktinske filamente in zaobljena ali rahlo ukrivljena jedra. Pri koncentraciji 0,5  $\mu\text{g/mL}$   $\text{TiO}_2$  ni prišlo do sprememb, medtem ko je pri koncentraciji 10  $\mu\text{g/mL}$  celic manj in so med seboj manj povezane, aktinski filamenti v teh celicah pa niso tako lepo vidni (Slika 17).



*Slika 17: Kontrolne (A) in celice izpostavljene ND  $\text{TiO}_2$  s koncentracijo 10  $\mu\text{g/mL}$  po 20-em odmerku (B). Modro so obarvana jedra in zeleno aktinski filamenti.*



Tudi na naslednjih fluorescenčnih slikah vidimo zmanjšano gostoto celic. Najverjetneje ND otežujejo pritrjevanje, rast in delitev celic, prav tako pa so slabše vidni aktinski filamenti, celična jedra pa so zgoščena (Slika 18).

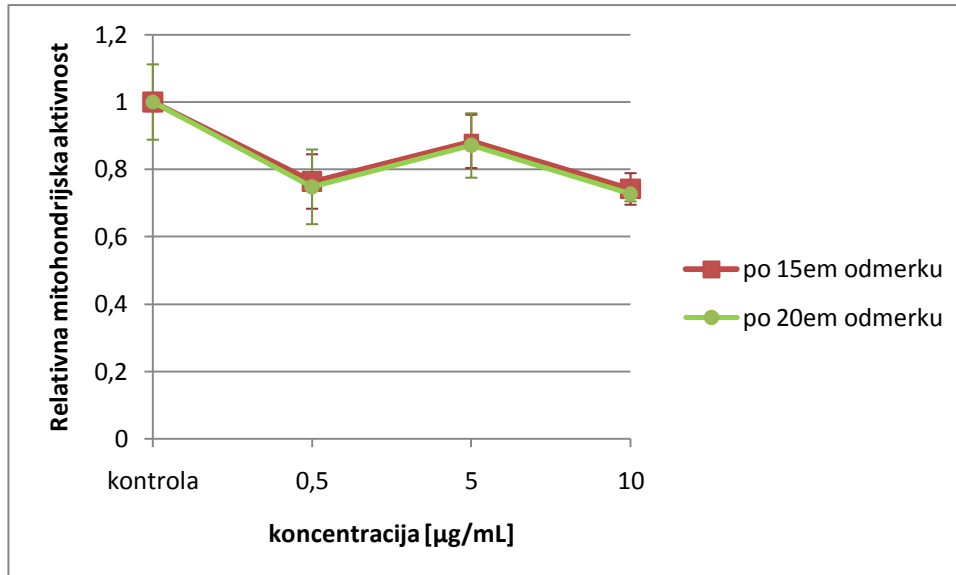


*Slika 18: Slike keratinocitov posnete s fluorescenčno mikroskopijo: kontrolne celice po 15-em (A) in po 20-em (C) odmerku ter celice izpostavljene ND TiO<sub>2</sub> s koncentracijo 5 μg/mL po 15-em (B) in 20-em (D) odmerku. Modro so obarvana jedra, rdeče mitohondriji in zeleno aktinski filamenti.*

### **4.3.2 Spremljanje metabolne aktivnosti celic**

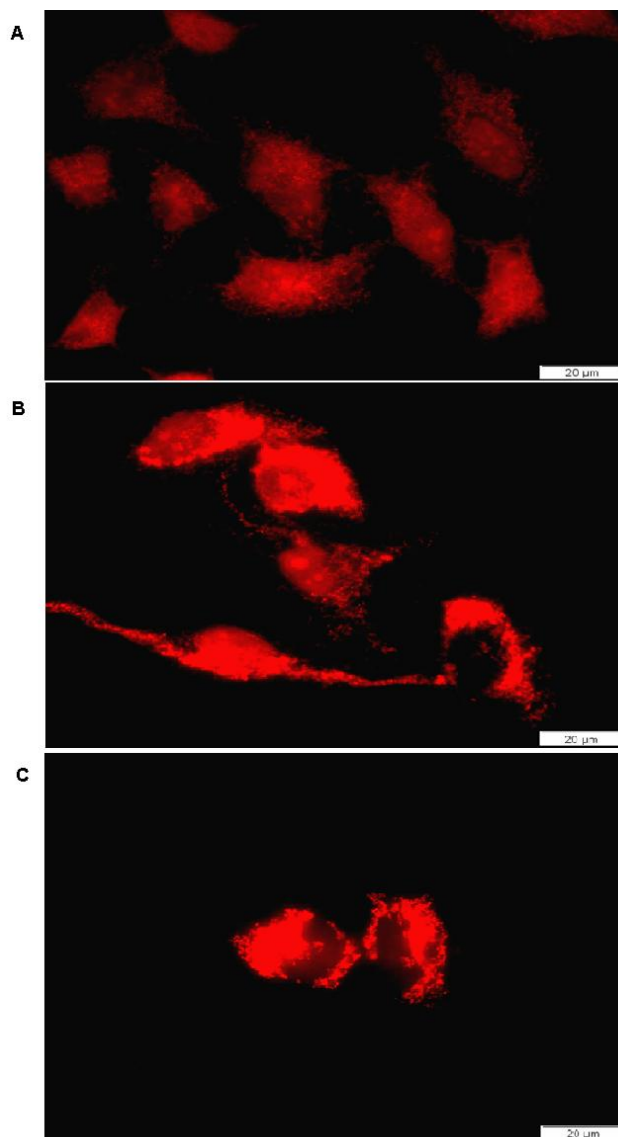
Metabolno aktivnost celic smo določali z MTS testom, kjer merimo aktivnost mitohondrjskih dehidrogenaznih encimov. Test, pri katerem smo v vdolbinice nanegli enako število celic, ki pa so bile predhodno izpostavljene različnim koncentracijam ND, smo izvedli po 15-em in 20-em odmerku. Tu nam test ni služil kot posredno merilo preživetja celic, saj je bila koncentracija celic v vseh vdolbinicah enaka, temveč neposredno kot merilo mitohondrijske aktivnosti. Le-ta je po 15-em in 20-em odmerku praktično enaka (Slika 19). V celotnem

testiranem koncentracijskem območju pa je mitohondrijska aktivnost v primerjavi s kontrolo manjša in sicer za približno 25 % pri koncentracij ND 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in za 15 % pri 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Slika 19).



Slika 19: Relativna mitohondrijska aktivnost v odvisnosti od koncentracije ND  $\text{TiO}_2$  po 15-em in 20-em odmerku.

Mitohondrijsko aktivnost smo ovrednotili tudi z opazovanjem intenzitete fluorescence mitohondrijev, ki smo jih obarvali s fluorescentnim barvilom. Ugotovili smo, da je bila po dolgotrajni izpostavitvi keratinocitov ND  $\text{TiO}_2$  s koncentracijo 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ali 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  le-ta kvalitativno večja v primerjavi s kontrolo (Slika 20), kar je v nasprotju z rezultati MTS testa.

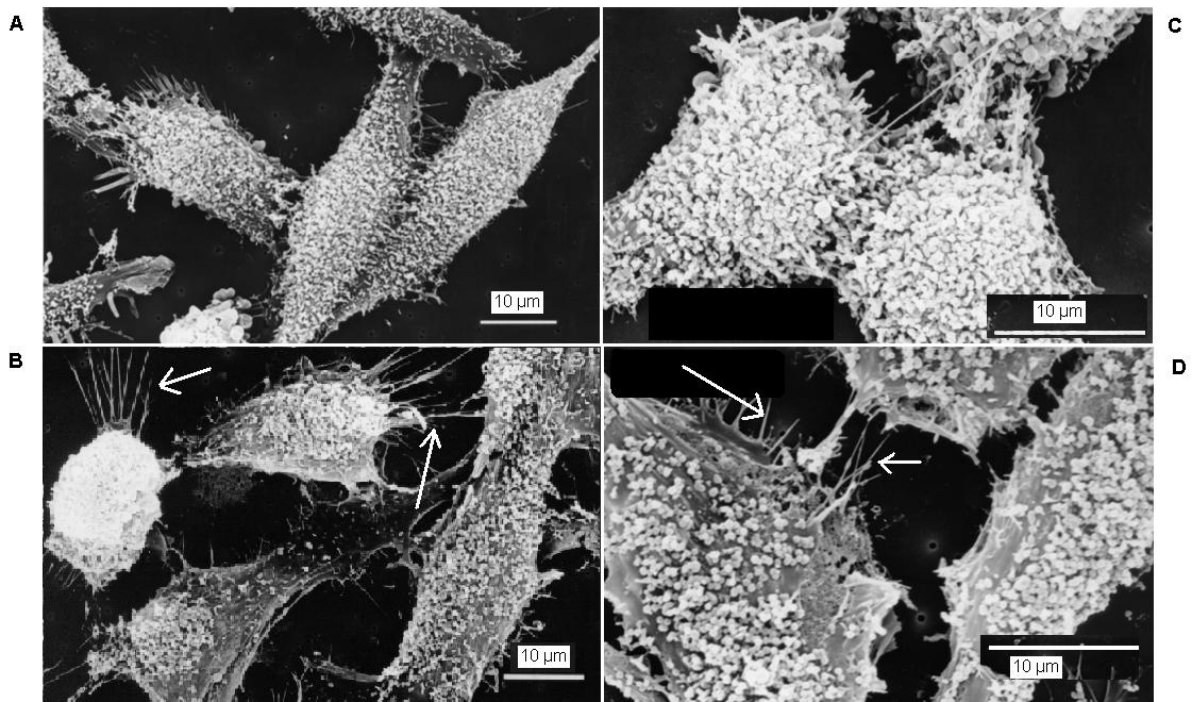


*Slika 20: Fluorescenčno označeni mitohondriji kontrolnih celic (A), celic, ki so bile izpostavljene 20-im odmerkom ND ND TiO<sub>2</sub> s koncentracijo 5 µg/mL (B) in 10 µg/mL (C). Slike so posnete pri enakih nastavitvah. Kvalitativno lahko ocenimo, da je intenziteta rdeče fluorescence večja pri preparatih keratinocitov, ki so bili izpostavljeni ND (B, C).*

### **4.3.3 Morfologija površine keratinocitov**

Slike površine keratinocitov posnete z vrstičnim elektronskim mikroskopom kažejo, da je oblika celic, ki so bile izpostavljene ND, primerljiva kontrolnim celicam, ki niso bile izpostavljene ND (Slika 20). Apikalna površina celic je tako pri enih kot drugih pokrita s številnimi membranskimi izrastki. SEM slike z ND tretiranih keratinocitov razkrivajo povečano število medceličnih povezav pri celicah, ki so bile izpostavljene ND v primerjavi s

kontrolno. Te povezave so vidne kot nanotubularne strukture, ki se raztezajo med celicami (Slika 21).



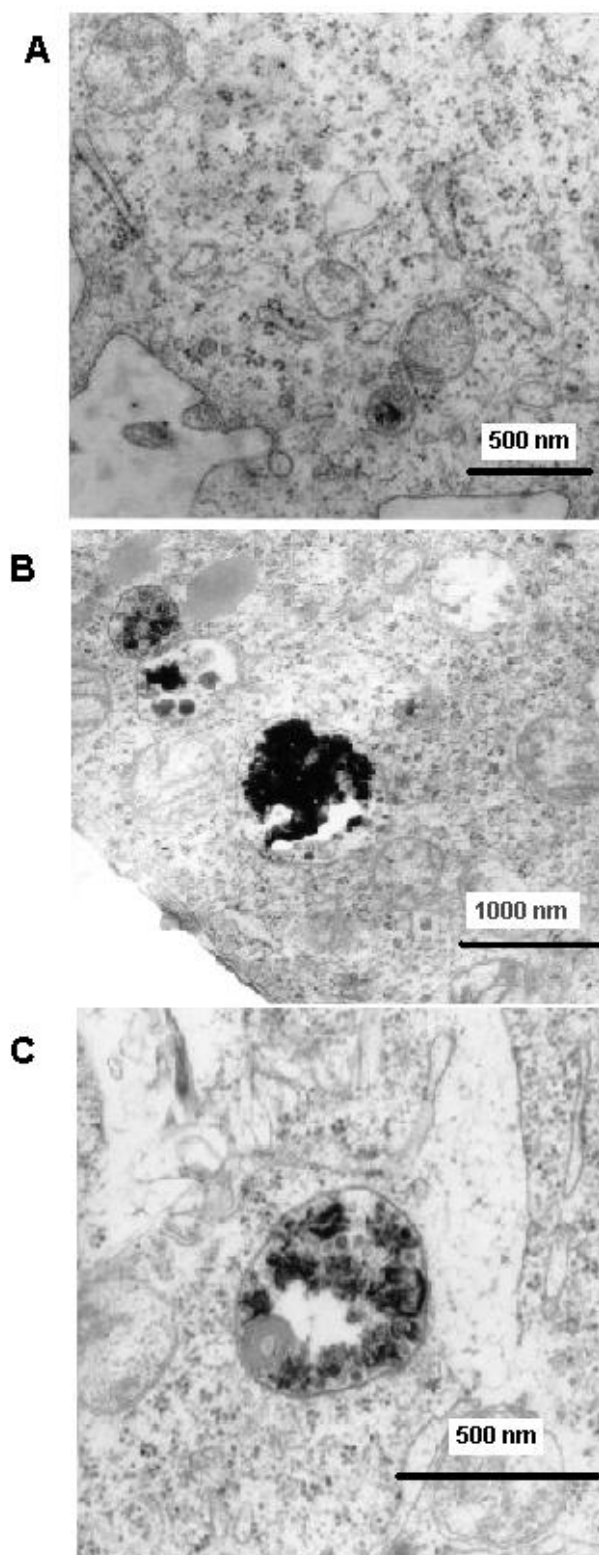
*Slika 21: SEM slike keratinocitov: Kontrolne celice pri manjši (A) in večji (C) povečavi ter keratinociti, ki so bili izpostavljeni 20-imi odmerkom ND TiO<sub>2</sub> s koncentracijo 5 µg/mL pri manjši (B) in večji (D) povečavi. Z belo puščico so na slikah celic, ki so bile izpostavljene ND, označeni nanotubuli.*

Tovrstne medcelične povezave za keratinocite v literaturi še niso bile opisane, so pa podobne nanotubularne strukture značilne za imunske celice in astrocite oz. za celice, ki aktivno migrirajo npr. urotelijske celice T24 in rakave celice prostate DU145 (78-79). Povečano število nanotubulov med celicami lahko nakazuje transformacijo keratinocitov iz normalnih v tumorske celice po izpostavitvi ND TiO<sub>2</sub>. V literaturi lahko najdemo razlago, da te nanotubularne strukture omogočajo komuniciranje med celicami oz. transport molekul ali celo organelov (78, 80). Za potrditev domneve pa so vsekakor potrebne nadaljne raziskave.

#### 4.3.4 Privzem nanodelcev v celice

TEM slike keratinocitov, ki so bili 3 mesece izpostavljeni ND TiO<sub>2</sub>, potrjujejo znotrajcelični privzem ND TiO<sub>2</sub>. ND vidimo v citoplazmi v veziklih, predvsem v endosomih (Slika 22). ND v endosomih niso posamezno, temveč združeni v agregate. Delcev ne vidimo zunaj veziklov ali prostih v citoplazmi. Prav tako ni

dokazov o vstopu ND v mitohondrije ali celična jedra. Endosomi celic, ki so bile izpostavljene ND TiO<sub>2</sub>, so v primerjavi z endosomi kontrolnih celic večji, medtem ko je velikost in oblika vseh ostalih celičnih organelov primerljiva.



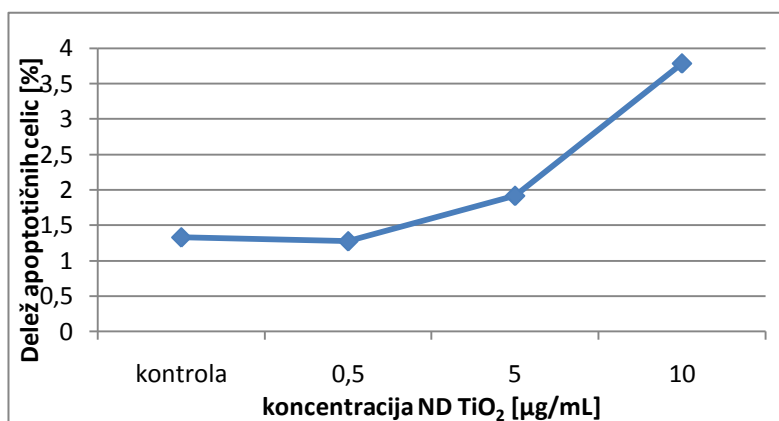
Slika 22: TEM slike kontrolnih keratinocitov (A) in keratinocitov, ki so bili izpostavljeni 20-imi odmerkom ND TiO<sub>2</sub> s koncentracijo 5 µg/mL pri manjši (B) in pri večji (C) povečavi. ND vidimo znotraj endosomov.

Naša opažanja so v skladu s študijami drugih raziskovalcev o privzemu ND TiO<sub>2</sub>, ki navajajo, da se ND kopičijo v citoplazemskih veziklih in ne vstopajo v jedra celic (80-81). Poleg tega študije prikazujejo TEM slike, ki potrjujejo privzem ND TiO<sub>2</sub> v obliki manjših skupkov (82). V nasprotju z rezultati naših študij pa poročajo, da izpostavitve celic ND TiO<sub>2</sub> povzroči pojav nabreklih ali poškodovanih mitohondrijev, ki se nahajajo v bližini agregatov TiO<sub>2</sub>, kar vodi v apoptozo ali nekrozo celic (82).

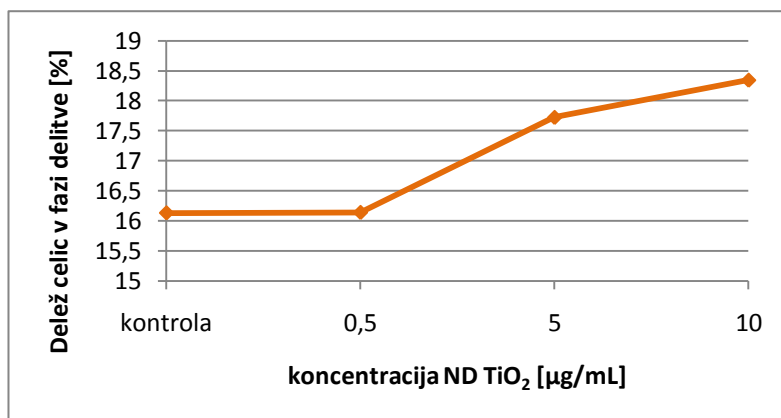
#### 4.3.5 Vpliv izpostavitve celic nanodelcem TiO<sub>2</sub> na genetski material celic

Vpliv ND TiO<sub>2</sub> na genetski material smo ugotavljali z analizo celičnega cikla po tri mesečni izpostavitvi keratinocitov ND TiO<sub>2</sub>. Celični cikel lahko glede na količino genskega materiala razdelimo v 4 faze. Normalno je največ celic v fazi rasti (faza G1) in so diploidne z enokromatidnim kromatinom. Preostale se pripravljajo na delitev (faza S) ali so v fazi delitve, diploidne celice z dvokromatidnim kromatinom (faza G2/M). Prisotnost fragmentirane DNA (faza subG1) kaže na prisotnost apoptotičnih celic.

Analiza celičnega cikla po dodanih 12 odmerkih ND TiO<sub>2</sub> v koncentraciji 10 µg/mL kaže nekoliko povečan delež celic v fazah G2/M in subG1, medtem ko je delež celic v fazah S in G1 nekoliko zmanjšan, kar pomeni, da je v vzorcu nekaj več apoptotičnih celic in da je tudi obseg delitve celic nekoliko povečan (Sliki 23 in 24).

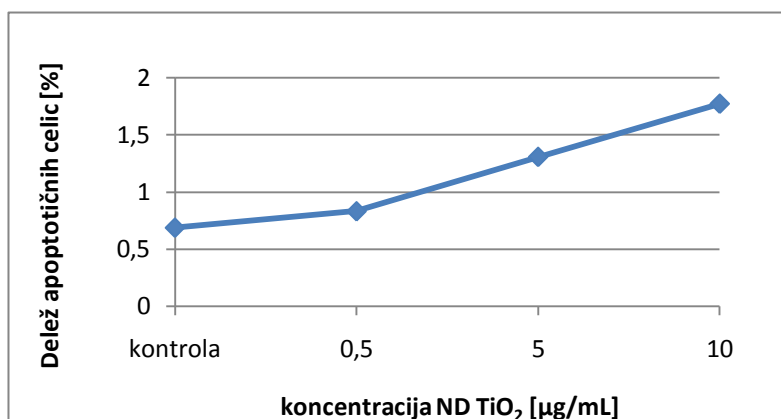


Slika 23: Delež apoptotičnih celic v odvisnosti od koncentracije ND TiO<sub>2</sub> po 12-em odmerku.



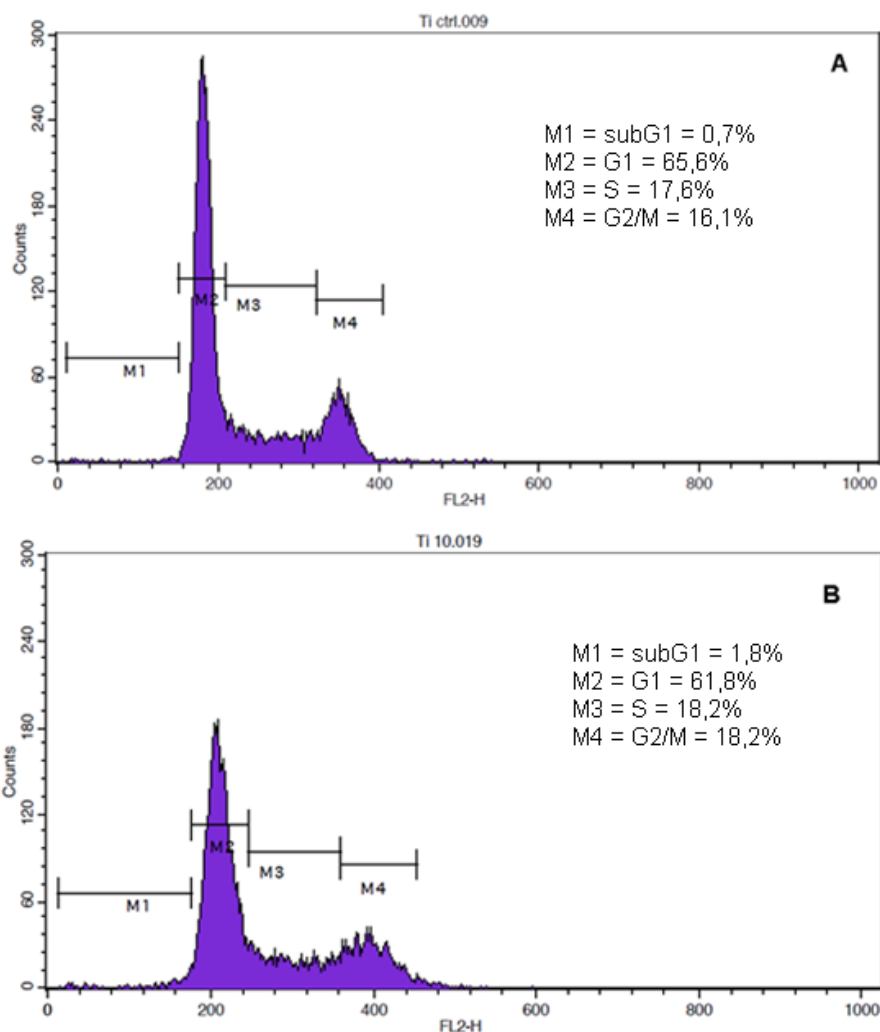
Slika 24: Delež celic v fazi delitve v odvisnosti od koncentracije ND TiO<sub>2</sub> po 12-em odmerku.

Podobne rezultate kot po 12-em odmerku smo dobili tudi po dodanem 20-em odmerku. Porazdelitev celic po posameznih fazah je bila po 20-em odmerku za vzorec celic, so bile izpostavljene ND TiO<sub>2</sub> v koncentraciji 0,5 µg/mL, nespremenjena, pri 10 µg/mL pa je vidno rahlo povečanje deleža celic v fazi subG1 (apoptotične celice) (Slika 25).



Slika 25: Delež apoptotičnih celic v odvisnosti od koncentracije ND TiO<sub>2</sub> po zaključenem 3 mesečnem tretiranju.

Sklepamo lahko, da ND TiO<sub>2</sub> v koncentraciji 0,5 µg/mL ne vplivajo na celični cikel keratinocitov, medtem ko pri višji koncentraciji (10 µg/mL) vidimo rahlo povečanje deleža celic v subG1 fazi (apoptotične celice) (Slika 26). Rezultati torej nakazujejo, da prisotnost ND TiO<sub>2</sub> v celični kulturi do neke mere vpliva na celični cikel in povzroči povečanje obsega delitve in apoptoze celic.

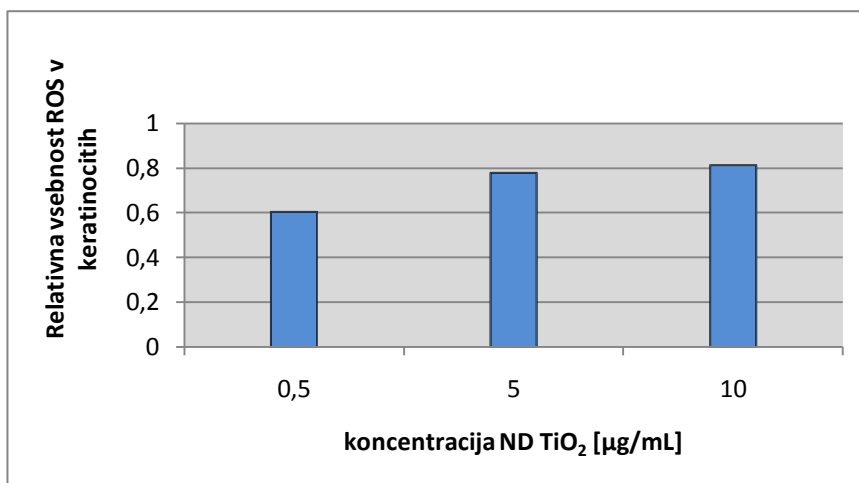


Slika 26: Rezultati analize celičnega cikla s pretočno citometrijo: kontrolne celice (A) in celice, ki so bile izpostavljene 20-im odmerkom ND TiO<sub>2</sub> v koncentraciji 10 µg/mL (B).

#### 4.3.6 Znotrajcelični oksidativni stres

Toksičnost nanomaterialov je odvisna od velikosti, oblike in kemične sestave ND. Poglavitni mehanizem toksičnosti ND naj bi bil oksidativni stres, torej znotrajcelično nastajanje ROS, ki vodi v porušitev ravnotežja med pro- in antioksidanti v celici. Ugotovljeno in dokazano je, da ND sprožijo oksidativni stres v celicah, ki so jim bile izpostavljene (9-11), kar pa je v nasprotju z našimi rezultati. Ugotovili smo, da je obseg znotrajcelične tvorbe ROS po 3 mesečni izpostavitvi ND TiO<sub>2</sub> nespremenjen oz. celo manjši kot v kontrolnih celicah (Slika 27).





Slika 27: Vsebnost ROS v keratinocitih po izpostavitvi 20-im odmerkom ND TiO<sub>2</sub> v odvisnosti od koncentracije ND.

Pri določanju ROS smo predpostavili, da je stopnja fluorescence sorazmerna količini ROS v celicah. Prišli smo do zanimivih ugotovitev, da je prisotnost ND TiO<sub>2</sub> v celični kulturi povzročila zmanjšanje nastajanje ROS v celicah, kljub temu pa količina ROS v celicah narašča z naraščanjem koncentracije ND TiO<sub>2</sub> v kulturi. Količina ROS v celicah, ki so bile izpostavljene ND TiO<sub>2</sub> v koncentraciji 10 µg/mL je več kot 10 % manjša kot pri kontroli, kjer celice niso bile izpostavljene ND. Dobljeni rezultati so v nasprotju s številnimi študijami, kjer so dokazali, da ND TiO<sub>2</sub> tako v prisotnosti UV svetlobe kot brez nje sprožijo tvorbo ROS znotraj in zunaj celic (10, 11, 31).

Zelo verjeten razlog za dobljene rezultate je agregacija delcev. V raziskavi smo ugotovili, da so ND TiO<sub>2</sub> v mediju močno podvrženi agregaciji, zato so celice izpostavljene v večji meri agregatom kot posameznim ND. Prej omenjenim raziskovalcem pa je nekako uspelo izvajati teste v pogojih, kjer so bili ND popolnoma dispergirani in posledično so bile celice izpostavljene učinku posameznih delcev, ki so lahko več kot 20-krat manjši od naših.

## 5 SKLEP

V raziskavi smo ugotovili, da je optimalna metoda izdelave disperzije ND TiO<sub>2</sub> kombinacija 10 min soniciranja v UZ kadički in 10 min pulznega soniciranja na ledeni kopeli z uporabo UZ sonde. Tako smo uspeli pripraviti disperzijo ND s povprečno velikostjo delcev ~ 500 nm, kar kaže, da se večina ND v disperziji nahajajo v obliki agregatov, ki so ~ 20-krat večji od deklarirane velikosti, ki jo navaja proizvajalec ND.

V študiji ugotavljanja kratkotrajnih (do 72 h) učinkov ND TiO<sub>2</sub> smo ugotovili, da čas izpostavitve ND nima signifikantnega vpliva na preživetje celic pri isti koncentraciji ND in da ND TiO<sub>2</sub> ne vplivajo na preživetje celic preko celotnega testiranega koncentracijskega območja. Izjema so le koncentracije >20 µg/mL, kjer smo po 72 h opazili nekoliko zmanjšano preživetje celic, kar potrjuje tudi ugotovitev, da se število celic z naraščanjem koncentracije ND zmanjšuje. Nekoliko zmanjšana mitohondrijska aktivnost celic po 72 h in pri višjih koncentracijah ND kaže, da ND TiO<sub>2</sub> najverjetneje mehansko preprečujejo proliferacijo celic, torej delujejo citostatično.

Za študij dolgoročnih učinkov smo izbrali tri različne koncentracije ND (0,5, 5 in 10 µg/mL), ki so se v kratkoročnih poskusih izkazale za "varne". Ugotovili smo, da ND TiO<sub>2</sub> tudi v koncentraciji 10 µg/mL in trimesečni izpostavitvi niso citotoksični in ne povzročajo signifikantnih razlik v morfologiji celic ter ne sprožijo znatno povečane apoptotične ali nekrotične celične smrti. ND niso sprožili znatno povečanega nastajanja radikalov v celicah, niti povečanja mitohondrijske aktivnosti, ki je sicer pogosta posledica oksidativnega stresa. Pri največji testirani koncentraciji 10 µg/mL se je število celic po določenem času signifikantno zmanjšalo v primerjavi s kontrolnimi celicami, ki niso bile izpostavljene ND. Tako lahko sklepamo, da ND v višjih koncentracijah delujejo citostatično; verjetno mehansko preprečijo celično delitev in s tem zmanjšajo proliferacijo celic. Analiza celičnega cikla je pokazala, da ND nimajo signifikantnega vpliva na celični cikel celic, ki so jim bile kontinuirano izpostavljene.

Potrdili smo tudi vstop ND TiO<sub>2</sub> v celice, kjer se nahajajo v obliki agregatov predvsem v endosomih celic. Nadalje smo ugotovili, da ND TiO<sub>2</sub> povečajo število nanotubularnih struktur, ki se raztezajo med celicami, kar je ugotovitev, ki predhodno za keratinocite še ni bila opisana. Možno je, da te strukture nakazujejo transformacijo celic iz normalnih v rakave.

Pojav in vloga nanotubulov pa sta danes še zelo slabo raziskana, zato bi bilo smiselno nadaljnje raziskovalno delo usmeriti v proučevanje tega pojava.

Zgoraj opisane ugotovitve so strjene v Preglednici VI.

*Preglednica VI: Povzetek rezultatov naše raziskave.*

<u>Metoda</u>	<u>Opazovani parameter</u>	<u>Kratek čas izpostavitve</u>	<u>Daljši čas izpostavitve</u>
<u>Invertni mikroskop</u>	<i>Oblika celic</i>	Ni sprememb.	Ni sprememb.
	<i>Število celic</i>	Se manjša z naraščajočo koncentracijo (> 20 µg/mL).	Se močno zmanjša pri koncentraciji 10 µg/mL.
	<i>Pritrjenost celic</i>	Ni sprememb.	Ni sprememb.
<u>Fluorescenčna mikroskopija</u>	<i>Oblika jeder, aktinskih filamentov</i>	Pri višjih koncentracijah slabše povezane celice, manj vidni aktinski filament.	Pri višjih koncentracijah slabše povezane celice, manj vidni aktinski filament.
	<i>Mitohondrijska aktivnost</i>	/	Narašča s koncentracijo.
<u>MTS test</u>	<i>Metabolna aktivnost</i>	/	Ni sprememb.
<u>SEM</u>	<i>Površinska morfologija</i>	/	Povečano število nanotubularnih struktur.
<u>TEM</u>	<i>Privzem v celice</i>	/	Da, ND v endosomih.
<u>Fluorescenčna metoda</u>	<i>Tvorba ROS</i>	/	Nespremenjena.
<u>Pretočna citometrija</u>	<i>Spremembe v celičnem ciklu</i>	/	Pri večjih koncentracijah – nesignifikantne.

Vedno večja izpostavljenost človeka ND TiO<sub>2</sub> pomeni veliko večje tveganje za zdravje, zato so potrebe po natančni oceni varnosti nujne. Literaturni podatki, ki so danes na voljo, so skopi in pogosto celo nasprotujoči ter težko primerljivi. Naša raziskava je tako nov, majhen prispevek v bazo podatkov o varnosti daljše izpostavitve celic ND TiO<sub>2</sub>.

## 6 LITERATURA

---

- (1) Remškar M: Nanodelci in nanovarnost. Ministrstvo za zdravje, Urad RS za kemikalije, Ljubljana, 2009.
- (2) Chen J, Dong X, Zhao J, Tang G: *In vivo* acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. *J Appl Toxicol* 2009; 29: 330-7.
- (3) Čebulj M: Posebne lastnosti nanodelcev, Fakulteta za matematiko in fiziko, Univerza v Ljubljani, 2007.
- (4) Koehler A, Marx U, Broeg K, Bahns S, Bressling J: Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas – A new treat to marine life? *Mar Environ Res* 2008; 66: 12-4.
- (5) Mirković B, Lah Turnšek T, Kosl J: Nanotehnologija pri zdravljenju raka. *Zdrav Vest* 2010; 79: 146-155.
- (6) SCCP: Preliminary opinion on safety of nanomaterials in cosmetics products. 2007.
- (7) Nel A, Xia T, Madler L, Li N: Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*, 2006; 311: 622-7.
- (8) Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J: Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives* 2005; 113: 823-39.
- (9) Pan Z, Lee W, Slutsky L, Clark RAF, Pernodet N, Rafailovich MH: Adverse Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts and How to Protect Cells. *Small* 2009; 4: 511-20.
- (10) Choi SJ, Oh JM, Choy JH: Toxicological effects of inorganic nanoparticles on human lung cancer A549 cells. *J Inorg Biochem* 2009; 103: 463-71.
- (11) Bhattacharya K, Davoren M, Boertz J, Chins RPF, Hoffmann E, Dopp E: Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA- adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Part Fibre Toxicol* 2009; 6:17.
- (12) Timbrell J. A: Principles of biochemical toxicology. 4th edition, 2008.
- (13) Inohara S, Tatsumi Y, Cho H, Tanaka Y, Sagami S: Actin filament and desmosome formation in cultured human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1990; 282: 210-2.
- (14) Mitsui T: New cosmetic science. Elsevier Science, ZDA, 1997: 16.
- (15) Mitsui T: New cosmetic science. Elsevier Science, ZDA, 1997: 92-3.

- 
- (16) Borm PJA, Schins RPF: Nanoparticle technology for drug delivery. *Toxicological Characterization of Engineered Nanoparticles*, ZDA, 2006; 159: 161-88.
- (17) Gurr JR, Wang ASS, Chen CH, Jan KY.: Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Science Direct, Toxicol* 2005; 213: 66–73.
- (18) Švelc T: Vpliv sestave nanodelcev na preživetje in funkcijo celic. *Diplomska naloga, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*, 2006.
- (19) Špes A: Vpliv nanodelcev titanovega dioksida na mitohondrije. *Diplomsko delo Biotehnična fakulteta, Univerza v Ljubljani*, 2009.
- (20) Oberdorster G, Elder A: Metal Particles and Extrapulmonary Transport: Oberdörster and Elder Respond. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 823-39.
- (21) Biswas P, Wu CY: Nanoparticles and the Environment. *J Air Waste Manag Assoc* 2005; 55: 708-46.
- (22) (online) Other uses of TiO<sub>2</sub> (citirano: 17. 4. 2010)  
Dostopno na naslovu: <http://cleanair.bz/otheruses.html>.
- (23) (online) The Environmental Risks of Nanoparticles (citirano: 3. 3. 2010)  
Dostopno na naslovu: <http://www.nanocap.eu/Flex/Site/Page.aspx?PageID=4443>.
- (24) Contado C, Pagnoni A: TiO<sub>2</sub> in Commercial Sunscreen Lotion: Flow Field-Flow Fractionation and ICP-AES Together for Size Analysis. *Anal Chem* 2008; 19: 7594-608.
- (25) Wells F: *Structural Inorganic Chemistry*. Clarendon Press, Oxford, 1975.
- (26) Lazarini F, Brenčič J: *Splošna in anorganska kemija*. DZS, Ljubljana 1989.
- (27) DuPont Titanium Dioxide for Coatings
- (28) United State Patent, Patent Number: 5,468,471, Date of Patent: Nov. 21. 1995: Titanium dioksidi disperzion, cosmetic compositions and methods for using same, 1994.
- (29) Epstein JH, Wang SQ: *Understanding UVA and UVB*, Skin Cancer Foundation, , (citirano: 11. 4. 2010),  
Dostopno na naslovu: <http://www.skincancer.org/understanding-uva-and-uvb.html>.
- (30) Andersen MW, Hewitt JP, Spruce SP: Broad-Spectrum Physical Sunscreens: Titanium Dioxide and Zinc Oxide. *Cosmetic Science and Technology Series* 1997; 18: 353-75.
- (31) Ukmar T: Proučevanje s sol-gel postopkom izdelanih kserogelov in oblog z vgrajenimi nanodelci TiO<sub>2</sub>. *Diplomsko delo Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*, 2008.

- 
- (32) Gurr JR, Wang ASS, Chen CH, Jan KY: Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Science Direct, Toxicol* 2005; 213: 66–73.
- (33) Thevenot P, Cho J, Wavhal D, Timmons RB, Tang L: Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Science direct, Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2008; 4: 226-36.
- (34) Maynard AD, Aitken RJ, Butz T, Colvin VL, Donaldson K, Oberdörster G, Philbert MA, Ryan J, Seaton A, Stone V, Tinkle SS, Tran L, Walker NJ, Warheit DB: Safe handling of nanotechnology. *Nature* 2006; 16: 267-9.
- (35) Nel A, Xia T, Mädler L, Li N: Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* 2006; 311: 622-7.
- (36) Jemec A, Drobne D, Sepčić K, Tišler T: Uporaba biomarkerjev za določanje vplivov nanodelcev. *Zdrav Vars* 2007; 4: 144 – 50.
- (37) Wang J, Zhou G, Chen C, Yu H, Wang T, Ma Y, Jia G, Gao Y, Li B, Sun J, Li Y, Jiao F, Zhao Y, Chai Z: Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. *Toxicol Lett* 2007; 168: 176-85.
- (38) Butz T, Reinert T, Pinheiro Philippe Moretto T, Pallon J, Kiss A. Z, Stachura J, Dabros W, Stachura Z, Lekki J, Lekka M, Hunyadi J, Biro T, Sticherling M, Van Vaeck L, Van Royen P, Surleve-Bazeille J. E: NANODERM - Quality of Skin as a Barrier to ultra-fine Particles. Final report, 2007.
- (39) Hart GA, Hesterberg TW: *In vitro* toxicity of respirable-size particles of diatomaceous earth and crystalline silica compared with asbestos and titanium dioxide. *J Occupa Environ Med* 1998; 40: 29-42.
- (40) Churg A, Stevens B, Wright JL: Comparison of the uptake of fine and ultrafine TiO<sub>2</sub> in a tracheal explant system. *American Journal of Physiology – Lung Cell Mol Physiol* 1998; 274: L81-5.
- (41) Park EJ, Yib J, Chung KH, Ryu DY, Choi J, Park K: Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol Lett* 2008; 180: 222-9.
- (42) Lademann J, Weigmann H, Rickmeyer C, Barthelmes H, Schaefer H, Mueller G: Penetration of titanium dioxide microparticles in a sunscreen formulation into the horny layer and the follicular orifice. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 1999; 12: 247-56.

---

(43) (online) Patel RP: Nanoparticles and its applications in field of pharmacy. (citirano: 3.3 2010)

Dostopno na internetu: <http://www.pharmainfo.net/reviews/nanoparticles-and-its-applications-field-pharmacy>.

(44) Rampaula A, Parkin IP, Cramer LP, Ingold C: Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. *J Photochem Photobiol* 2007; 191: 138-48.

(45) Dunford R: Chemical oxidation and DNA damage catalysed by inorganic sunscreen ingredients. *FEBS Lett* 1997; 418: 87–90.

(46) Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY: Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicol* 2005; 213: 66-73;

(47) Jones CF, Grainger DW: *In Vitro* assessments of nanomaterial toxicity. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 438-56.

(48) Nel A: Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311: 622-7.

(49) Wilson MR: Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 184: 172-9.

(50) Schins RP: Surface modification of quartz inhibits toxicity, particle uptake, and oxidative DNA damage in human lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol* 2002; 15: 1166-73.

(51) Hussain S. M, et al.: *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol In Vitro* 2005; 1: 975-83.

(52) Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J: Current *in vitro* methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 72: 370-7.

(53) Tian B: Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. *Toxicol In Vitro* 2006; 20: 1202-12.

(54) Magrez A: Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett* 2006; 6: 1121-5.

(55) Jones CF, Grainger DW: *In Vitro* assessments of nanomaterial toxicity. *Adv Drug Deliv Rev* 2009; 61: 438 – 456.

(56) Kim DH: Response of monocytes exposed to phagocytosable particles and discs of comparable surface roughness. *Biomaterials* 2007; 28: 4231-9.

(57) (online) The most flexible way to multiplex with beads. BD™ Cytometric Bead Array System 2007 [citirano 20. Maj 2010];

---

Dostopno na naslovu:

<http://www.softflow.hu/Kereskedelem/XEUR1178-02%20-%20CBA%20brochure.pdf>.

(58) Ghafari P: Impact of carbon nanotubes on the ingestion and digestion of bacteria by ciliated protozoa. *Nat Nano* 2008, 3: 347–351.

(59) Davoren M: *In vitro* toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol In Vitro* 2007; 21: 438–448.

(60) Wilson MR: Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. *Toxicol Appl Pharmacol* 2002; 184: 172-9.

(61) Geiser M: Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 1555–1560.

(62) Lorenz MR: Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. *Biomaterials* 2006; 27: 2820-8.

(63) Suh J, Dawson M, Hanes J: Real-time multiple-particle tracking: applications to drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57: 63–78.

(64) Jan E: High-content Screening as a Universal Tool for Fingerprinting of Cytotoxicity of Nanoparticles. *ACS Nano* 2008.

(65) Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J: Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 823 – 839.

(66) Tsuyi JS, Maynard AD, Howard PC, James JT, Lam C, Warheit DB, Santamaria AB: Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part IV: Risk assessment of nanoparticles. *Toxicol Sci* 2005; 89: 42 – 50.

(67) *Formularium Slovenicum 2.0*. Ljubljana 2005: 57.

(68) Rowle A: PCS in 30 minutes. Information materials of Malvern Instruments Ltd: 1-8, 2003.

(69) (online) Metode in tehnike dela, ki jih biologi uporabljajo pri svojem delu, (citirano: 13. 3. 2010),

Dostopno na naslovu: [http://www.svarog.si/biologija/index.php?page\\_id=7573](http://www.svarog.si/biologija/index.php?page_id=7573).

(70) Technical Bulletin: CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Instructions for use of products G3580, G3581 AND G3582, ZDA, 2007.

(71) Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents. ZDA, 2006.

(72) Banaszak Holl MM: Nanotoxicology: a personal Perspective. *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 2009.



- 
- (73) Long TC, Tajuba J, Sama P, Saleh N, Swartz C, Parker J, Hester S, Lowry GV, Veronesi B: Nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons *in vitro*. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 1631-7.
- (74) L'Azou B, Jorly J, On D, Sellier E, Moisan F, Fleury-Feith J, Cambar J, Brochard P, Ohayon-Courtes C: *In vitro* effects of nanoparticles on renal cells. *Part Fibre Toxicol* 2008; 71: 478-85.
- (75) Limbach LK, Li Y, Grass RN, Brunner TJ, Hintermann MA, Muller M, Gunther D., Stark WJ: Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts: Effect of Particle Size, Agglomeration and Diffusion at Low Concentration. *Environ Sci Technol* 2005; 39: 9370-6.
- (76) Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sayes CM: Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO<sub>2</sub> particles as a component of nanoparticle risk management. *Science Direct, Toxicol Lett* 2007; 171: 99–110.
- (77) Hussain SM, Braydich-Stolle LK, Schrand AM, Murdock RC, Yu KO, Mattie DM, Schlager JJ, Terrones M: Toxicity Evaluation for Safe Use of Nanomaterials: Recent Achievements and Technical Challenges. *Adv Mater*, 2009; 21: 1-11.
- (78) Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH: Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 2004; 303: 1007-10.
- (79) Vidulescu C, Clejan S, O'Connor KC: Vesicle traffic through intercellular bridges in DU 145 human prostate cancer cells. *J Cell Mol Med* 2004; 8: 388-96.
- (80) Pan Z, Lee W, Slutsky L, Clark RA, Pernodet N, Rafailovich MH: Adverse effects of titanium dioxide nanoparticles on human dermal fibroblasts and how to protect cells. *Small* 2009; 5: 511-20.
- (81) Lin W, Xu Y, Huang CC, Ma Y, Shannon K. B, Chen D. R, Huang Y. W: *In Vitro* Oxidative Stress and DNA Damage Induced by Nano- and Micro-sized ZnO Particles in Human Lung Epithelial Cells. *J Nanopart Res Special Issue: Nanoparticles and Occupation Safety* 2009: 25-39.
- (82) Long TC, Saleh N, Tilton RD, Lowry GW, Veronesi B: Titanium Dioxide (P25) Produces Reactive Oxygen Species in Immortalized Brain Microglia (BV2): Implications for Nanoparticle Neurotoxicity. *Environ Sci Technol* 2006; 40: 4346-52.