UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

NINA CAGLIČ

OPTIMIRANJE IZDELAVE DISPERZIJE NANODELCEV ZnO IN UGOTAVLJANJE VARNOSTI NA CELIČNI LINIJI KERATINOCITOV

OPTIMIZATION OF ZnO NANOPARTICLES DISPERSION PREPARATION AND ASSESSMENT OF ITS SAFETY ON KERATINOCYTE CELL LINE

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 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.

Iskreno se zahvaljujem dr. Petri Kocbek.

Za strokovno pomoč se zahvaljujem prof. dr. Julijani Kristl.

Iskrena hvala mladi raziskovalki Karmen Teskač za nesebično pomoč pri izvedbi labaratorijskega 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 moji družini in Alešu za podporo pri doseganju tega cilja.

Izjava

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

Ljubljana, September 2010

Predsednik diplomske komisije:

- prof. dr. Joško Osredkar

Člani diplomske komisije:

- prof. dr. Julijana Kristl
- doc. dr. Bojan Doljak
- asist. dr. Petra Kocbek

KAZALO

KAZALO	2
POVZETEK	4
ABSTRACT	6
SEZNAM OKRAJŠAV	8
1. UVOD	10
1.1. NANODELCI	10
1.2. VSTOP NANODELCEV V ORGANIZEM 1.2.1. Koža in prehajanje ND skozi kožo	11
1.3. TOKSIČNOST NANODELCEV	15
1.5. CINK IN CINKOV OKSID	20
1.6. TOKSIČNOST ZnO	22
1.7. DELOVANJE in UPORABA ZnO	
1.7.1. Antibakterijsko delovanje	
1.7.2. ZnO kot UV filter v sončnih kremah	27
2. NAMEN DELA	30
3. EKPERIMENTALNI DEL	31
3.1 MATERIALI	31
3.1.1. Izhodne sestavine za izdelavo disperzije ND ZnO	
3.1.2. Celična kulura in reagenti	
3.2 APARATURE	32
3.3 PRIPRAVA DISPERZIJE ND ZnO	
3.3.1. Sterilizacija ND	
3.3.2. Priprava disperzije ND ZnO	
3.3.3. Soniciranje disperzije ND ZnO	
3.3.4. Priprava disperzije ND ZnO za poskuse na celicah	
3.3.5. Določanje velikosti ND ZnO	35
3.4. In Vitro POSKUSI NA CELIČNI KULTURI	
3.4.1. Izpostavitev keratinocitov ND ZnO za krajši čas	
3.4.2. Izpostavitev keratinocitov ND ZnO za daljši čas	
3.5. VREDNOTENJE UČINKOV ZnO NA KERATINOCITIH PO KRATKOTRA IZPOSTAVITVI	JNI 37

3.5.1. Neposredno opazovanje celične kulture pod mikroskopom	37
3.5.2. Fluorescenčna mikroskopija	37
3.5.3. Ugotavljanje preživetja celic z MTS testom	
3.6. VREDNOTENJE UČINKOV ZnO NA KERATINOCITIH PO DOLGOTRAJNI	
IZPOSTAVITVI	40
3.6.1. Neposredno opazovanje celične kulture pod mikroskopom	40
3.6.2. Fluorescenčna mikroskopija	40
3.6.3. Vrednotenje metabolne aktivnosti po dolgotrajni izpostavitvi ND ZnO	40
3.6.4. Vrstična elektronska mikroskopija	41
3.6.5. Presevna elektronska mikroskopija	41
3.6.6. Analiza celičnega cikla	41
3.6.7. Znotrajcelični nastanek ROS	42
4. REZULTATI IN RAZPRAVA	43
4.1. IZDELAVA IN VREDNOTENJE DISPERZIJE NANODELCEV ZnO	43
4.1.1. Vpliv načina in časa soniciranja na velikost delcev ZnO v disperziji	43
4.1.2. Vrednotenje velikosti in morfologije delcev ZnO	46
4.2. KRATKOTRAJNA IZPOSTAVITEV KERATINOCITOV NANODELCEM ZnO	48
4.3. DOLGOTRAJNA IZPOSTAVITEV KERATINOCITOV NANODELCEM ZnO	50
4.3.1. Spremljanje števila celic v kulturi	50
4.3.2. Spremljanje metabolne aktivnosti	53
4.3.3. Morfologija površine keratinocitov	54
4.3.4. Privzem nanodelcev v celice	55
4.3.5. Vpliv izpostavitve celic nanodelcem ZnO na genetski material celic	56
4.3.6. Znotrajcelični oksidativni stres	58
5. SKLEP	60
LITERATURA	62

POVZETEK

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

V prvem delu naloge smo optimirali metodo priprave disperzije nanodelcev cinkovega oksida, 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 cinkovega oksida tudi ovrednotili. Ugotovili smo, da na velikost delcev v disperziji vplivata tako medij, v katerem disperzijo pripravimo, kot tudi način soniciranja. Optimalna metoda izdelave disperzije nanodelcev cinkovega oksida je 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 (~ 250 nm). Večina nanodelcev je bila v disperziji v obliki agregatov, ki so bili ~ 3-krat večji od deklarirane velikosti delcev, ki jo navaja proizvajalec. Sledila je in vitro raziskava varnosti nanodelcev cinkovega oksida na celični liniji keratinocitov. V raziskavi smo najprej ugotavljali preživetje in morfologijo keratinocitov v kulturi po 24, 48 in 72-urni izpostavitvi nanodelcem cinkovega oksida velikosti ~ 250 nm v koncentracijah od 0,005 do 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 presevno elektronsko mikroskopijo pa smo ugotavljali ali nanodelci prehajajo vanje.

Ugotovili smo, da nanodelci cinkovega oksida pri koncentraciji 0,5 µg/mL ne povzročajo signifikatnih sprememb po trimesečni izpostavitvi, medtem ko pri koncentraciji 5 µg/mL in 10 µg/mL delujejo citotoksično. Nanodelci cinkovega oksida so pri koncentraciji 5 µg/mL zmanjšali preživetje celic, povzročili so spremenjeno morfologijo celic in njihove površine,

4

vplivali pa so tudi na povečano metabolno aktivnost. Pri koncentraciji 10 µg/mL so imeli nanodelci cinkovega oksida izrazito citotoksično delovanje. Ugotovili smo, da pri tej koncentraciji povzročajo tudi povečano tvorbo ROS. Rezultati kažejo, da izpostavitev celic nanodelcem vpliva tudi na njihov celični cikel. Pri koncentraciji 5 µg/mL in 10 µg/mL so nanodelci povzročili nekoliko manjši delež celic v fazi rasti in nekoliko večji delež apoptotičnih celic v primerjavi s kontrolnimi celicami, ki jih nismo izpostavili nanodelcem. Potrdili smo tudi vstop nanodelcev cinkovega oksida v celice, kjer se nahajajo v obliki agregatov v endosomih celic. Nadalje smo ugotovili, da se celice odzovejo na prisotnost nanodelcev cinkovega oksida v kulturi s povečanjem števila nanotubularnih struktur, ki se raztezajo med celicami. Pojav teh struktur lahko nakazujejo transformacijo celic iz normalnih v rakave, zato bi bilo smiselno v nadaljnih raziskavah ta pojav bolj podrobno raziskati.

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko zaključimo, da tudi akutno varne koncentracije nanodelcev ZnO povzročijo po daljši, kontinuirani izpostavitvi spremembe na keratinocitih, ki lahko vodijo v celično smrt.

ABSTRACT

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

In the first part of our reasearch, the method of preparation of zinc oxide nanoparticle dispersion has been optimized and this dispersion was used in the second part for experiments on keratinocyte cell line. Zinc oxide 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 zinc oxide 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 (~ 250 nm). Most of the nanoparticles in dispersen were present as aggregates, which were 3-times bigger than the size declared by the manufacturer. These preliminary investigations were followed by in vitro study of zinc oxide 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 zinc oxide in concentrations from 0,005 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. Changes in the cell surface were investigated using scanning electron microscopy and nanoparticle uptake was evaluated using transmission electron microscopy.

It was shown that nanoparticles of zinc oxide at concentration 0,5 μ g/mL after three months exposure do not cause significant alterations, while at concentrations 5 and 10 μ g/mL nanoparticles are cytotoxic. Nanoparticles of zinc oxide at concentration 5 μ g/mL

6

decreased cell viability, caused changes in morphology of cells and their surface, as well as increased cellular metabolic activity. At concentration 10 μ g/mL nanoparticles showed highly cytotoxic effects. It was confirmed, that nanoparticles at this concentration caused increased formation of ROS. The results show that exposure of cells to nanoparticles also affected their cell cicle. At concentrations 5 μ g/mL and 10 μ g/mL nanoparticles caused a slighty smaller fraction of cells in a growth phase and a slightly higher fraction of apoptotic cells compared to the control cells that were not exposed to nanoparticles. We also confirmed the entry of zinc oxide nanoparticles into the cells, where they are localized as aggregates inside the endosomes. Furthermore, it was shown that cells responded to the presence of zinc oxide nanoparticles in culture with increased number of nanotubular structures that extend between the cells. The emergence of these structures may indicate the transformation of normal to cancer cells, therefore, it would be reasonable to investigate this phenomemnon more in details in further studies.

Based on the results of current study it can be conclude that zinc oxide nanoparticles, even in acute »safe« concentrations, cause changes in keratinocytes, which may lead to cell death after prolonged, continuous exposure.

SEZNAM OKRAJŠAV

- ATP adenozin trifosfat
- CBA »Cytometric Bead Assay«
- CŽS centralni živčni sistem
- DCF 2',7'-diklorofluorescein
- DCFH diklorofluorescein
- DCFH-DA diklorofuorescein diacetat
- DNK deoksiribonukleinska kislina
- EELS »Electron Energy Loss« spektroskopija
- EFTEM »Energy-Filtering« TEM
- ELISA »Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay«, encimskoimunski test
- EPR elektronska paramagnetna resonanca
- GHS Globalno poenoten sistem razvrščanja in označevanja nevarnih kemikalij
- GSH glutation
- HTS »High-throughput screening«, rešetanje 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 »Nevtral Red Uptake«, privzem nevtralno rdečega

OECD Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj

- OH⁻ hidroksilni ion
- PBS fosfatni pufer
- PCR »Polymerase chain reaction«, verižna reakcija s polimerazo
- PCS »Photon Correlation Spectroscopy«, fotonska korelacijska spektroskopija
- PEG polietilenglikol

PI polidisperzni indeks

- RNK ribonukleinska kislina
- ROS reaktivne kisikove spojine
- SCCP Znanstveni odbor za potrošniške proizvode

SCCNFP Znanstveni odbor za kozmetične in neprehrambene proizvode namenjene potrošnikom

- SEM »Scanning Electron Microscopy«, vrstični elektronski mikroskop
- TEM presevni elektronski mikroskop
- TiO₂ titanov (IV) dioksid
- TNF-α tumorski nekrotični faktor alfa
- TUNEL »Terminal Deoxynucleotidiltransferase dUTP Nich and Labeling«
- UV ultravijolično
- UZ ultrazvok, ultrazvočna
- ZnO cinkov oksid

1. UVOD

1.1. NANODELCI

Ne bi pretiravali, če bi 21. stoletje poimenovali "nano stoletje". Zaradi izjemno hitrega razvoja nanotehnologije je v zadnjih 2 letih do 185 % večje število nanotehnoloških izdelkov na svetovnem trgu. Več kot 20 držav po svetu proizvaja in prodaja različne nanotehnološke izdelke za potrošnike, med katerimi prevladujejo kozmetični izdelki [1]. Razvijajoča se nanotehnologija ima in bo v prihodnosti imela še večji vpliv prav na vsa področja znanosti in tehnologije. Znanstvena odkritja in tehnološki obeti nanotehnologije so izjemni, še posebej v proizvodnji materialov, nanoelektroniki, medicini in varovanju zdravja, biotehnologiji in informatiki. Zato je že jasno, da ima nanotehnologija močan vpliv tudi na ekonomijo in družbena dogajanja 21. stoletja [2].

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 [2]. Nanomaterial je material z eno ali več zunanjimi dimenzijmi ali notranjo strukturo nanovelikosti [3]. ND predstavljajo vmesno velikostno stopnjo med mikro delci in atomi oziroma molekulami. Pri samih ND in v materialih, ki le-te vsebujejo, so opazili lastnosti, ki se močno razlikujejo od lastnosti, ki jih imajo večji delci enake kemijske sestave. Glavna lastnost ND v primerjavi z mikrodelci je, da imajo veliko večje razmerje med površino in prostornino. Manjši kot je delec, večji je relativni delež atomov, ki so na površini glede na število vseh atomov, ki sestavljajo delec. Razmerje med površino in prostornino delca je zelo pomemben podatek, saj kaže kako (kemično) reaktiven je delec [4]. Večje kot je razmerje, bolj je delec reaktiven. Kemijske sile med delci so posledica reaktivnosti atomov na površini. Če je atomov na površini več oz. imajo atomi na površini več prostih vezi, se delci lahko hitreje in močneje vežejo. Kadar govorimo o koncentraciji ND nam več pove podatek o številu delcev na enoto volumna, kot pa masa delcev na volumsko enoto. Velik pomen pri razmerju med površino in prostornino ima tudi sama oblika delcev npr. ploščat delec ima večjo površino kot sferičen delec z enako maso [5]. Fizikalno-kemijske lastnosti, ki so pri ND drugačne, so spremenjena kemična reaktivnost, električna prevodnost, termična razteznost, optična prevodnost, trdnost, glede na velikost se spreminja gibanje v mediju, itd. Posamezni ND nimajo vseh teh lastnosti, je pa pogosto, da ima delec na nanoskali zgoraj navedene značilnosti drugačne kot delec, ki je za velikostni red ali dva večji [5, 6]. Zavedati se moramo, da imajo ND zelo veliko težnjo po agregiranju in aglomeriranju s čimer lahko izgubijo svojo funkcionalnot. V disperziji ND zaradi Brownovega gibanja med seboj trkajo in če se delca dovolj približata in če je vsota vseh interakcij med delcema privlačna, se delca šibko sprimeta. Tako sčasoma nastajajo večji aglomerati, ki lahko imajo popolnoma drugačne lastnosti, kot posamezni delci, saj se spremeni razmerje med površino in prostornino, proste vezi pa se zapolnijo. Aglomeracija je odvisna od mnogih dejavnikov npr.: kemijske narave ND, njihove koncentracije, medija, prisotnosti morebitne obloge na površini delca, temperature, pH,.. Za načrtovane ND je zelo nezaželeno, da agregirajo, saj s tem izgubijo svojo funkcionalnost. Aglomeracijo lahko preprečimo tako, da delce obložimo s polimeri, da dosežemo dovolj velik naboj na površini delca ali izberemo medij, ki preprečuje aglomeracijo. Zaradi svoje reaktivnosti pa ND ne aglomerirajo le med seboj, ampak tudi z drugimi strukturami kot so virusi ali makromolekule. Ko se delci enkrat sprimejo, se jim poveča tudi velikost, številska koncentracija v mediju pa se posledično zmanjša [4,7].

Ena izmed razvrstitev nanodelcev je razvrstitev po izvoru. Ločimo delce, ki so bili narejeni načrtno, s točno določenimi lastnostmi, za točno določen namen uporabe, in delce, ki se pojavljajo v naravi (npr. virusi, ipd.) ali pa nastanejo kot stranski produkt nekega procesa (gorenje biomase ali naftnih derivatov, izpuh motorja z notranjim izgorevanjem, itd.). Takšni ND običajno niso zaželeni, njihove lastnosti niso načrtovane in so v določenih pogojih lahko celo škodljive [5].

Glede na kemijsko sestavo delimo ND na anorganske, kamor uvrščamo ND železa, zlata, titanovega dioksida (TiO₂), cinkovega oksida (ZnO), ogljikove nanocevke 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 [8].

1.2. VSTOP NANODELCEV V ORGANIZEM

ND lahko prehajajo v človeško telo po različnih poteh, žal pa so posledice izpostavljenosti ND dandanes še zelo slabo poznane in raziskane. Možnost prehoda ND v telo zelo zavisi od njihove velikosti in površinskih lastnosti ter od specifičnih fizioloških lastnosti mesta izpostavljenosti. ND lahko prehajajo v telo skozi respiratorni in intestinalni trakt, skozi kožo in oči ter seveda tudi po intravenski poti.

O vstopu ND skozi oko je malo znanega. Kljub temu da oči predstavljajo zelo malo površino, kjer bi ND lahko vstopili v telo, pa so zaradi uporabe kozmetike za obraz in ličil lahko vsakodnevno v stiku z ND [3]. Ne glede na mesto izpostavljenosti ND se moramo zavedati, da če ND vstopijo v centralni krvni obtok, so lahko v neposrednem stiku s celicami različnih tarčnih organov (bezgavke, kostni mozeg, možgani,..) (Slika 1) [9].



Slika 1: 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 [10].

Jedro naših raziskav so bili ND ZnO kot setavina 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 [2].

1.2.1. Koža in prehajanje ND skozi kožo

Koža je zaradi svoje velike površine potencialno pomembna pot vstopa nanodelcev v organizem. Koža je zgrajena iz treh plasti: vrhnjice, usnjice in podkožja. Zunanja plast kože, vrhnjica ali epidermis je sestavljen iz rožene, zrnate in bazalne plasti in predstavlja učinkovito zaščito pred vplivi okolja za spodaj ležeči dermis, ki vsebuje številne krvne in tkivne makrofage ter pet vrst senzornih živčnih končičev (Slika 2) [11].



Slika 2: Zgradba kože [11].

Povrhnjica 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 zarodne plasti ter postopoma potujejo proti površini. Na tej poti se morfološko spreminjajo ter zorijo. Glavna sprememba, ki se v njih dogaja, je keratinizacija ali poroženevanje, 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 odlušči. 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 poroženetja 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 globje ležeče strukture [12]. Obstajajo tri poti prehajanja snovi v in skozi kožo: intercelularno, transcelularno (skozi

celice) in transfolikularno (skozi lasne mešičke in mešičke znojnic) (Slika 3).



Slika 3: Načini prehoda ND skozi roženo plast [13].

Pasiven transport ND skozi nepoškodovano roženo plast, je skoraj nemogoč zaradi same strukture keratinocitov, prisotnih lipidnih dvoslojev med celicami in fiziološkega okolja pod roženo plastjo, ki vsebuje visok odstotek proteinov. V primeru da je koža poškodovana, pa je možnost vstopa delcev precej večja. Kljub temu, da so kozmetični izdelki namenjeni uporabi na zdravi koži vemo, da se kljub navodilom občasno nanašajo tudi na poškodovano in/ali obolelo, razdraženo kožo; npr. v Evropi ima 2 % ljudi psoriazo in od 5 do 15 % populacije atopični dermatitis, zaradi česar je učinkovitost njihove kožne bariere zmanjšana in uporaba izdelkov z ND tvegana. Kakšno je to tveganje žal še ne vemo, saj še ni dovolj podatkov o prehajanju ND skozi atopično kožo ali kožo s sončnimi opeklinami. Poleg tveganja pri aplikaciji ND na poškodovano kožo, moramo poudariti tudi dejstvo, da je koža lahko v določenih primerih izpostavljena velikim količinam ND, zato

že minimalni delež absorbiranih ND, ki se akumulirajo v sekundarnih tarčnih organih, pomeni določeno tveganje. Npr. v poletnem času lahko z nanašenjem sončnih krem nanesemo tudi do nekaj gramov ND na kožo in če se absorbira le 0,01 % nanešenih delcev, pride v centralni krvni obtok 100-500 µg ND, ki se izločijo ali pa se akumulirajo v enem ali več organih [3]. Pri uporabi dermalnih pripravkov smo izpostavljeni sistemski absorpciji skozi kožo in tudi preko prebavnega trakta zaradi nanašanja pripravkov v bližino ust in nosu, ter zaradi vnašanja hrane s kontaminiranimi rokami [14].

O varnosti uporabe dermalnih pripravkov z ND, npr. sončnih krem z ND TiO₂ ali ND ZnO, je še veliko nejasnega. SSCP (Znanstveni odbor za potrošniške proizvode) je izdal že številna poročila o tej temi, vendar so še vedno prepričani, da je premalo informacij o prehajanju ND skozi kožo, da bi lahko zagotovili varnost uporabe ND ZnO. Izvedena je bila raziskava, kjer so oblikovali različne formulacije sončnih krem z ND ZnO in *in vitro* preizkušali prehajanje skozi povrhnjico po dermalnem nanosu na človeški epidermis. Ugotovili so, da je epidermalna penetracija cinka neznatno majhna po topikalni aplikaciji uporabljene formulacije z ND ZnO *in vitro* na človeškem epidermisu. Na podlagi slik posnetih z elektronskim mikroskopom so ugotovili, da so se ND ZnO zadržali zgolj na površini kože in okrog poroženelih korneocitov, medtem ko penetracije v spodnje plasti kože niso zaznali. V *in vitro* študiji so ugotovili tudi povečano koncentracijo Zn²⁺ ionov v receptorskem mediju, zato sklepajo, da je majhen delež ZnO topen in kot elementarni cink prehaja skozi membrane [14]. Ti podatki se ujemajo s študijo v kateri so se osredotočili na prehajanje ZnO po nanosu mazila in ugotovili, da po 24 h preide le 0,29 % cinka glede na celotno na kožo nanešeno količino [15].

1.3. TOKSIČNOST NANODELCEV

ND lahko imajo zaradi svoje nano velikosti drugačne lastnosti kot večji delci istega kemizma, prav zato lahko vodijo do nepričakovanih interakcij z biološkimi sistemi. Neželene učinke zaradi izpostavljenosti ND so potrdili v več raziskavah. Dokazana je bila vrsta učinkov ND na celice, med drugim tudi genotoksičnost in citotoksičnost različnih ND (razlike v kemijskih lastnostih, velikosti, obliki, površinskih lastnostih, vrsti obloge) na celicah sesalcev (Preglednica I). Možni mehanizmi, ki vodijo do toksičnosti ND še vedno niso popolnoma raziskani in razjasnjeni. Veliko raziskovalcev se strinja, da imata

oksidativni stres in lipidna peroksidacija pomembno vlogo pri poškodba DNA in razgradnji celične membrane, kar vodi v celično smrt [1]. ND povzročajo nastanek prooksidantov še posebej pod vplivom svetlobe ali prisotnosti prehodnih kovin, zaradi česar se v celici poruši ravnovesje med tvorbo ROS in med popravljalnimi mehanizmi biološkega sistema. Oksidativni stres, ki ga povzročijo ND preko različnih mehanizmov, povzroči vnetne procese v celici, lahko pa vpliva tudi na spremenjeno funkcijo mitohondrijev [9].

Večina raziskav je osredotočenih na raziskovanje lastnosti in učinkov enega samega tipa delcev določene snovi ali nekaj različnih vrst delcev iste snovi. Vlada pa pomanjkanje študij v katerih bi lahko primerjali ND z različnimi lastnostmi in njihove biološke učinke. Splošno velja, da se z zmanjševanjem velikosti delcev povečuje biološka aktivnost [16]. Velikost je torej pomembna lastnost pri interakcijah ND s celicami, vsekakor pa tega ne moremo splošno trditi za vse vrste ND.

Eksperimentalno spremljani	Mozne patofizioloske posledice:	
parameter		
Nastajanje ROS, oksidativni stres	s Poškodbe proteinov, DNK, celičnih membran,	
	indukcija encimov, vnetje, poškodbe mitohondrijev	
Motnje v delovanju	Spremembe v prepustnosti membrane,	
mitohondrijev	citotoksičnost, apoptoza, nekroza	
Vnetje	Namnožitev vnetnih celic, fibroza, granulom,	
	pospešena tvorba proteinov akutne faze	
Privzem v celice retikulo-	Nalaganje v jetrih, vranici, limfnih vozlih, možno	
endotelijskega sistema	povečanje organov in motnje njihove funkcije	
Denaturacija in razgradnja	Izguba encimske aktivnosti, nastajanje avtoantigenov	
proteinov		
Privzem v jedro	Poškodba DNK, 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	Avtoimunske reakcije	
imunske tolerance		
Spremembe v regulaciji celičnega	Nenadzorovana proliferacija, staranje	
cikla		
Poškodbe DNK	Mutageneza, metaplazija, karcinogeneza	

Preglednica I: Eksperimentalno ugotovljeni učinki ND in njihove posledice v organizmu [10].

V eni izmed raziskav so ugotavljali toksičnost ogljikovih ND, ogljikovih nanocevk, ND SiO₂ in ND ZnO *in vitro* na mišjih embrionalnih fibroblastih. Ugotavljali so kako velikost, oblika in kemijske lastnosti različnih ND vplivajo na njihovo toksičnost. Prišli so do spoznanja, da z naraščajočo koncentracijo vse štiri vrste ND povzročajo signifikantno zmanjšanje količine GSH in povečano nastajanje ROS. Vendar pa je tretiranje celic z ND ZnO v primerjavi z ostalimi tremi vrstami ND povzročalo signifikantno zmanjšanje preživetja celic in večje oksidativne poškodbe. Glede na to da so bili delci SiO₂ in ZnO podobne kristalne strukture in velikosti, lahko sklepamo, da na razlike v toksičnosti ND vpliva kemijska narava delcev. To potrjuje tudi podatek, da so se veliko manjši ogljikovi ND v primerjavi z ND ZnO izkazali veliko manj citotoksični. Ti rezultati kažejo, da zgolj velikost ni parameter na podlagi katerega lahko sklepamo o toksičnosti ND [17].

1.4. 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 [18].

Pri *in vitro* testiranjih se najpogosteje uporabljajo naslednje vrste celic: fagociti, jetrne, epitelijske in endotelijske celice, rdeče krvničke ter različne rakave celične linije. Fagocitne celice se pogosto uporabljajo, saj je toksičnost ND velikokrat povezana z njihovim vstopom v telo, kjer se na prisotnost tujkov kot prve odzovejo imunske celice. Jetrne in krvne celice se uporabljajo, ker so ND takoj po vstopu v krvni obtok v neposrednem stiku z njimi. Epitelijske in endotelijske celice pa predstavlajo fiziološko bariero skozi katero ND lahko vstopajo v telo. Poleg teh celic se za *in vitro* testiranja uporabljajo rakave celične linije, ki so običajno enostavne za gojenje in lahko dostopne. Pri testiranju toksičnosti ND metode temeljijo na vrednotenju nastajanja ROS, celičnega preživetja, celičnega stresa, mofologije celic, fenotipizacije in privzema ND v celice (Preglednica II) [18].

a) Tvorba ROS

Izpostavljenost ND vodi v celicah do tvorbe ROS in prevladujoč model za določanje tvorbe ROS so fagocitne celice. Nekateri testi temeljijo na neposrednem merjenju količine ROS, drugi testi pa so posredni in temeljijo na opazovanju posledic nastanka ROS. Direktno merjenje ROS temelji na merjenju fluorescence, kot posledica reakcije nastalih ROS z dodanim reagentom ali 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 [18]. Z EPR metodo lahko določamo tudi reaktivne dušikove spojine o katerih je manj govora, kljub temu pa je radikal NO pogosto produkt fagocitov. NO lahko reagira s superoksidom do peroksi nitrita (ONOO⁻), ki je ena najbolj reaktivnih oksidacijskih spojin [19].

Indirektne metode pa obsegajo merjenje količine npr. GSH, ki ga kot odgovor na nastanek ROS začne tvoriti ogrožena celica [20]. Spet druge pa merijo obseg poškodb DNK ali membran celic, ki so posledica nastanka ROS [21].

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. nevtralno rdeče, tripansko modrilo, resazurin idr. Princip testov pa je lahko tudi merjenje količine sproščenih encimov npr. laktat dehidrogenaze, ATP-ja, adenilatne kinaze ali pa se meri npr. mitohondrijski membranski potencial [21, 22]. Edina trenutno validirana metoda testiranja toksičnosti, ki je bila tudi vključena v REACH direktivo (»Registration, Evaluation, Autorisation of Chemicals«), je privzem nevtralno rdečega (NRU – Nevtral Red Uptake) v fibroblaste celične linije NIH3T3, kjer se barvilo akumulira v lizosomih živih celic, kar lahko določimo z merjenjem absorbance ali fluorescence [23]. Drugi testi vrednotijo nastanek fragmentirane DNK v apoptotičnih celicah kot npr. ELISA ali TUNEL test ter tako posredno delež mrtvih celic v vzorcu [24].

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 [24]. 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 [25].

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 [26]. 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- κ B, GADD45 β , IL-6, NF κ BIA, EGFP ali proteine npr. laminin, β -aktin, ciklin D₃, kolagen IV [24].

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 LINCOplex, kjer določamo npr. osem citokinov [27]. 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 [58]. 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 [26]. Kot alternativa testom na sesalskih celicah se lahko uporabljajo tudi testi na bakterijskih in drugih enoceličarjih, npr. *E. Coli* ali *Tetrahymena thermophila* [29].

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 kot sta visoko ločljivostni TEM (HR-TEM) ali »energy-filtering« TEM (EFTEM) [30, 31, 32]. Dodatno se lahko za ugotavljanje privzema ND uporabljata tudi laserska »scanning« mikroskopija in »electron energy loss« spektroskopija (EELS) [33]. 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 [34].

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 [35].

Test citotoksičnosti	Princip detekcije
<u>Celično preživetje</u>	
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)
<u>Stresni odziv</u>	
DCF	fluorimetrična detekcija nastalih ROS
Vnetni odziv	
ELISA	kolorimetrična detekcija izločanja citokinov

Preglednica II: Nekateri in vitro testi določanja toksičnosti ND na celicah [36].

1.5. CINK IN CINKOV OKSID

Cink (Zn) je eden najpomembnejših elementov v sledovih v organizmu sesalcev. Zn je v telesu nujno potreben za delovanje številnih makromolekul in sodeluje pri več 300 encimskih reakcijah, kjer ima katalitično ali strukturno vlogo [36]. Zn je tudi bistvena sestavina receptorjev za androgene, DNK-popravljalnih encimov in encimov za sintezo, stabilnost in prepis tako DNK kot RNK. Zn ima v telesu antioksidativno vlogo, saj posredno stabilizira celično membrano. Poleg tega ima vpliv tudi na komponente imunskega sistema in na proces apoptoze [35, 36]. Pomanjkanje Zn v telesu se pojavlja

predvsem pri tistih ljudeh, ki zaužijejo velike količine fitinske kisline (nahaja se predvsem v zelenjavi), ki veže kovinske ione in tako onemogoča njihovo absorbcijo [36, 37]. Pomanjkanje Zn je povezano z negativnimi učinki na razmnoževanje, vključno z zmanjšano plodnostjo, nepravilnim razvojem plodu in zaostankom v rasti v pozni nosečnosti. Poročali so o nepravilnostih, prirojenih okvarah, in prezgodnjih porodih pri sicer zdravih ženskah vendar z nizko serumsko koncentracijo Zn [35].

ZnO je anorganska snov z molekulsko maso 81,39 g/mol. V naravi se pojavlja v obliki minerala cinkit s heksagonalno kristalno rešetko (Slika 4) [38]. ZnO je bel ali rumeno bel, amorfen prah brez vonja, ki na zraku postopoma absorbira ogljikov dioksid in tvori cinkov karbonat $[Zn_2(OH)_2CO_3]$. Je termokromen, saj v odvisnosti od temperature spreminja barvo. Pri segrevanju do 400 ali 500 °C se pretvori v rumeno barvo, ki z ohlajanjem izgine [37].



Slika 4 : Prikaz heksagonalne rešetke ZnO.

TOPNOST

Kemijska sestava nanodelcev je pomembna s stališča topnosti v vodi in bioloških tekočinah. Hidrofilnost je lastnost materiala, da se nanj veže voda, in je ravno nasprotna vodoodbojnosti (hidrofobnosti). Kot močenja in s tem stopnja hidrofilnosti sta močno odvisna od ukrivljenosti površine delca, torej od njegove velikosti. Za določene majhne okrogle ND je značilen t. i. lotusov efekt, ko voda sploh več ne omoči delca in preprosto ostane kot povsem okrogla kapljica na podlagi, prekriti s takšnimi ND. Kovinski ND so običajno delno topni in počasi s površine odpuščajo ione, ti pa lahko v organizmu sprožajo neželene kemijske reakcije. Kovinski oksidi so kemijsko stabilnejši, medtem ko oksidi prehodnih kovin lahko sprožajo kemijske reakcije zaradi večjega števila možnih oksidacijskih stanj kovinskega iona [5].

ZnO je amfoteren oksid [39]. Je netopen v vodi in alkoholu, reagira pa z razredčenimi kislinami in vodnimi raztopinami amonijevih spojin in tako tvori vodotopne produkte [38]. V bioloških sistemih je topnost ZnO opazna predvsem v kislih pogojih in v prisotnosti bioloških komponent, kot so amino kisline in proteini [40]. Topnost ZnO v vodnih raztopinah je močno odvisna od pH; pri pH 6 je topnost nekaj tisoč mg/L, pri pH 8 pa le približno 1 mg/L [41]. V literaturi navedeni podatki za topnost ZnO v vodi se precej razlikujejo in zajemajo vrednosti od 1,6 do 16 mg /L [41, 42].

1.6. TOKSIČNOST ZnO

SCCNFP (Znanstveni odbor za kozmetične in neprehrambene proizvode namenjene potrošnikom) je leta 2003 izdal toksikološko oceno ZnO. Poročali so, da je LD₅₀ ZnO za podgane po enkratnem peroralnem vnosu več kot 5 g/kg telesne teže, zato spada med nestrupene snovi. Vendar pa je SCCNFP navedel, da so za potrditev ustrezne varnosti potrebne še dodatne študije o varnosti ND ZnO vključno s preučitvijo morebitnega prodiranja v kožo in sistemski krvni obtok. Leta 2007 so bili izvedeni testi akutne peroralne toksičnosti ND ZnO z velikostjo 20 in 120 nm v odmerkih 1-5 g/kg telesne mase v skladu z OECD smernicami za kemikalije. Tako ND ZnO z velikostjo 20 nm kot tudi tisti z velikostjo 120 nm spadajo med netoksične kemikalije v skladu z GSH klasifikacijo (Globalno poenoten sistem razvrščanja in označevanja nevarnih kemikalij). Pri določevanju porazdelitve so ugotovili, da se Zn zadržuje predvsem v kosteh, ledvicah in trebušni slinavki. Povišanje viskoznosti krvi so povzročile nizki in srednji odmerki 20 nm ND ZnO in visoki odmerki ND ZnO z velikostjo 120 nm. Pri patološkem pregledu organov so odkrili, da z naraščanjem koncentracije ND ZnO velikosti 120 nm povzročajo poškodbe želodca, jeter, srca in vranice, medtem ko 20 nm ND ZnO povzročajo poškodbe jeter, vranice in trebušne slinavke. Povzeli so, da so jetra, vranica, srce, trebušna slinavka in kosti tarčna mesta za ND ZnO z velikostjo 20 in 120 nm po peroralnen vnosu [43].

Raziskave o genotoksičnosti Zn, njegovih soli in oksida dajejo dvoumne rezultate. Pred kratkim je Znanstveni odbor za toksičnost, ekotoksičnost in okolje EU sklenil, da Zn in njegove soli v mejah pričakovane izpostavljenosti niso mutagene ali rakotvorne za človeka [44]. Ti zaključki pa ne veljajo za ZnO, ki se pogosto uporablja v dermalnih pripravkih in sončnih kremah. Ti izdelki so v Evropski uniji regulirani z EU Direktivo o kozmetičnih

izdelkih. SCCNFP je izdal smernice, ki določajo, da je potrebno z ustreznimi testi preučiti genotoksičnost, fototoksičnost, fotopreobčutljivost ter fotogenotoksičnost UV-filtrov [45]. V skladu s tem so ugotavljali učinke ZnO v številnih študijah. Ugotovili so, da je ZnO fotostabilen, ni fotoreaktiven, ni fotocitotoksičen, ne povzroča fotoiritacije in ni fotoalergen pri ljudeh [46].

V raziskavah so ugotovili, da ZnO deluje klastogeno *in vitro*, ne pa tudi *in vivo*. Glede na to, da ZnO deluje približno štirikrat bolj klastogeno v prisotnosti UV svetlobe kot v temi pravimo, da je fotoklastogen, kar so preučevali na ovarijskih celicah kitajskega hrčka (CHO) v temi, v predhodno obsevanih (UV obsevanju celic je sledila izpostavitev ND ZnO) in sočasno UV obsevanih (celice so sočasno obsevali in izpostavili ND ZnO) CHO celicah. Citotoksičnost ND ZnO na celicah CHO pod različnimi pogoji obsevanja je bila naslednja: sočasno obsevane > predhodno obsevane > v temi [35].

Toksičnost ND je lahko povezana tudi s sproščanjem toksičnih ionov, kar zavisi od termodinamskih lastnosti snovi in posledično topnosti v mediju ali biološkem okolju. Tak primer so tudi ND ZnO, ki so delno topni v vodnem mediju, kjer se v medij sproščajo hidratirani Zn^{2+} kationi. Prav sproščanje Zn^{2+} ionov povezujejo z njegovo toksičnostjo [46].

Kljub temu, da je dokazana toksičnost delcev ZnO za sesalske celice *in vitro* in človeške pljučne celice *in vivo*, so mehanizmi toksičnosti še vedno nejasni, vključno s podatki v kakšni meri vpliva medij ali znotrajcelično okolje na raztapljanje in toksičnost. Izredno majhni delci ZnO lahko dosežejo alveole in povzročijo vnetje pljuč kar privede do simptomatskega odgovora v pljučih s povečanjem TNF alfa, IL-6 in IL-8. Čeprav lahko raztapljanje ZnO povzroči citotoksičnost in apoptozo v celicah sesalcev, večina študij to povezuje z oksidativnimi poškodbami.

Pri določanju toksičnosti ZnO na celičnih linijah BEAS-2B in RAW 264,7 so odkrili, da ND ZnO povzročajo tvorbo ROS, oksidativne poškodbe, vnetne procese in celično smrt (Slika 7). Toksičnost je bila neposredno povezana z raztapljanjem delcev in sproščanjem toksičnih Zn^{2+} ionov v rastni medij kakor tudi s privzemom delcev v endosome. Raztapljanje ZnO povzroči v celicah porušenje homeostaze Zn, kar povzroči poškodbe lizosomov in mitohondrijev. Kopičenje Zn^{2+} v lizosomih in kaveolih je povezano s porušenjem strukture organelov, oksidativnimi poškodbami celic, znotrajceličnim

sproščanjem Ca²⁺, mitohondrijskimi depolarizacijami, sproščanjem citokinov ter citotoksičnostjo [46].



Slika 7: Prikaz citotoksičnosti ND ZnO zaradi oksidativnega stresa [1].

Raztapljanju delcev ZnO sledi povečanje znotrajcelične koncentracije Zn²⁺, ki je povezana z močno povečano tvorbo ROS. Ugotovili so, da mitohondriji prispevajo k tvorbi ROS, saj pride do sprememb v samem organelu, kot tudi do sprememb v membarenskem potencialu organela. Študije na izoliranih mitohondrijih so pokazale, da Zn²⁺ zavira celično dihanje zaradi motenj v delovanju citokroma bc1 v kompleksu III, kakor tudi α -ketoglutarat dehidrogenaze v kompleku I. Prav tako pa lahko Zn²⁺ prispeva k tvorbi ROS zunaj mitohondrijev, vključno z aktivacijo NADPH oksidaze preko protein kinaze C, kot tudi s tvorbo NO, ki vodi do nastanka peroksinitrita (ONOO⁻). Ne le, da Zn²⁺ sproži nastanek ROS, ampak lahko oksidativne celične poškodbe spodbudijo nadaljnje sproščanje Zn²⁺ [47]. Zn zavira tudi ključne encime na glikolitični poti, kar vodi do pomanjkanja ATP-ja v celicah. Nenazadnje lahko visoke stopnje Zn²⁺ neposredno prispevajo k odprtju mitohondrijskih por in sproščanja citokroma C, zaradi česar pride do apoptoze/nekroze v izpostavljenih celicah [46].

1.7. DELOVANJE in UPORABA ZnO

ZnO ima polprevodniške lastnosti zato se veliko uporablja predvsem v elektroniki, zaradi fotokatalitične lastnosti pa se uporablja za čiščenje onesnaženih vod. Uporablja se tudi kot pigment v barvah in kot sestavina različnih materialov npr. plastike, stekla, gum, cementa, itd. [48]. ZnO se uporablja tudi v dentologiji kot sestavina zobnega cementa [37]. Jedro naših raziskav so bili ND ZnO kot sestavina dermatikov, zato smo se v nalogi osredotočili na antibakterijske in adstrigentne lastnosti ZnO ter z njimi povezano uporabo, kot tudi na lastnosti ZnO kot UV-filtra in njegovo uporabo v pripravkih za sončenje.

1.7.1. Antibakterijsko delovanje

ND kovinskih oksidov predstavljajo nov razred materialov, ki imajo široko paleto možnosti uporabe na področju medicine. Kovinski oksidi so zanimivi ne le zaradi njihovih fizikalno-kemijskih lastnosti, ampak tudi zaradi njihovega antibakterijskega delovanja. Kljub določenim raziskavam je še vedno malo znanega o antibakterijskem delovanju nanodelcev ZnO. Preliminarni podatki kažejo, da imajo nanodelci ZnO bistveno večje antibakterijske učinke na Staphylococcus aureus kot ND MgO, TiO₂, Al₂O₃, CuO in CeO₂. Poleg tega so študije jasno pokazale, da imajo ND ZnO širok spekter antibakterijskega delovanja ne le na S. aureus ampak tudi na številne druge mikroorganizme. Antibakterijska aktivnost ZnO je odvisna od velikosti delcev in od prisotnosti svetlobe [49]. Raziskovalec Banoee M. je skupaj s sodelavci preučeval kako ND ZnO vplivajo na antibakterijsko delovanje različnih antibiotikov na Staphylococcus aureus in Escherichia coli. Povprečna velikost ND ZnO je bila med 20 in 45 nm. Ugotovili so, da ND ZnO zmanjšajo antibakterijsko delovanje amoksicilina, penicilina G in nitrofurantoina na S. aureus, medtem ko povečajo antibakterijsko delovanje ciprofloksacina na obeh preizkušanih sevih. Dokazali so, da ima ciprofloksacin ob prisotnosti ND ZnO za 27 % povečano antibakterijsko delovanje na S. aureus in za 22 % na E. coli. Vpliv ND ZnO na antibakterijsko delovanje ciprofloksacina so preučevali na različnih kliničnih izolatih S. aureus in E. coli in ugotovili, da se z naraščajočo koncentracijo ND ZnO povečuje antibakterijska aktivnost ciprofloksacina na vseh preizkušanih sevih [50].

Pri določevanju toksičnosti ND ZnO na E. coli (gram pozitivna bakterija), S. aureus (gram negativna bakterija), človeške rakave celice osteoblastov in normalne celice osteoblastov, so ugotovili, da se antibakterijska aktivnost ZnO povečuje z naraščajočo koncentracijo in z zmanjševanjem velikosti delcev. Antibakterijska aktivnost je bila pri gram pozitivnih (E. *coli*) večja kot pri gram negativnih (S. *aureus*) bakterijah, kar naj bi bila posledica razlike v zgradbi bakterijske celične stene. Gram pozitivne bakterije so zaradi svoje debelejše bakterijske stene na račun peptidoglikanske plasti manj občutljive na delovanje ND ZnO. Toda membrane gram pozitivnih in gram negativnih bakterij so enako prehodne za ROS, kar pomeni, da so razlike v citotoksičnem delovanju ND ZnO po aktivaciji nastanka ROS, povezane z znotrajceličnimi dogodki in ne z razlikami v permeabilnosti med bakterijskima celičnima stenama. Pri poskusih na celični liniji človeških rakavih osteoblastov se je izkazalo, da je ZnO zelo citotoksičen za rakave celice. Toksičnost se pojavi že pri koncentraciji 100 µM. Ugotovili so, da ZnO obložen s polietilenglikolom (PEG) ali s škrobom ne izgubi toksičnosti za rakave celice in je hkrati manj toksičen za normalne celice prav zaradi obloge. Ta podatek je zelo pomemben, saj bi lahko v prihodnosti uporabljali ND ZnO kot citotoksično sredstvo, vendar pa je potrebno še veliko raziskav, predvsem glede selektivnosti za rakave celice [51].

Protitumorno delovanje

ND ZnO v večji meri delujejo citotoksično na rakave kot na normalne celice. V raziskavi so ugotovili, da lahko večjo selektivnost za rakave celice dosežemo z uporabo visokih koncentracij ND ZnO z velikostjo delcev od 4 do 20 nm, hkrati pa se toksičnost za zdrave celice zmanjša. Pomembne so tudi elektrostatske lastnosti ND ZnO, saj lahko imajo ND ZnO v fiziološkem okolju močno pozitiven naboj zaradi katerega reagirajo z rakavimi celicami, ki imajo na svoji zunanji membrani številne negativno nabite fosfolipide. Kljub dokazanim učinkom ND ZnO na rakave celice, še vedno vladajo različna mnenja o njihovem biološkem učinku in citotoksičnosti. Vsekakor pa nanotehnologija in kovinski oksidi predstavljajo veliko možnosti v razvoju medicine, tako kot dostavni sistem zdravljenja raka kot v diagnostiki rakavih obolenj [52].

ZnO kot sestavina dermatikov

ZnO ima šibke adstrigentne in antibakterijske lastnosti, ki so posledica hidrolize ZnO v kislem okolju na koži kar privede do sproščanja majhnih količin Zn²⁺ ionov. Uporablja se

kot sestavina mazil in praškov ter v cinkovi pasti za zaščito kože pri ulceracijah ali drugih obolenjih kože [38]. ZnO se uporablja tudi v obliki kalamina. Kalamin je prašek, ki vsebuje ZnO z majhnim deležem železovega oksida, zaradi katerega ima prašek značilno roza barvo. Za dermalno aplikacijo se kalamin uporablja v obliki mazil, praškov in v obliki losijona, ki se uporabljajo zaradi pomirjujočega, adstringentnega in zaščitnega učinka [37, 38].

ZnO kot sestavina deodorantov

ZnO se uporablja tudi kot sestavina deodorantov, saj zaradi svojih antibakterijskih lastnosti prepreči neprijeten vonj potu. Poleg tega delci adsorbirajo komponente potu, ki povzročajo neprijeten vonj. Primeren je tudi v deodorantih za občutljivo kožo, saj ne zapre znojnic, torej ne deluje kot antiperspirant [53].

1.7.2. ZnO kot UV filter v sončnih kremah

UV žarki in zaščita kože pred njihovim delovanjem

Zemlja je neprestano izpostavljena sončnemu sevanju; 56 % predstavlja infrardeče sevanje (valovna dolžina 780-5000 nm), 39 % vidna svetloba (valovna dolžina 400-700 nm), in 5 % UV sevanje (valovna dolžina 290-400 nm) [54]. Ultravijolično sevanje (UVR) se deli na UVA sevanje z nizko energijo in valovno dolžino od 320 do 400 nm in na UVB sevanje, ki ima višjo energijo in valovno dolžino od 280 do 320 nm. Razmerje med UVA in UVB sevanjem je približno 20:1 in zavisi od geografske širine, nadmorske višine, meseca v letu, ure in meteoroloških razmer. Sončno sevanje je zaradi zemeljske atmosfere močno spremenjeno. Ozon v stratotsferi absorbira večino visoko-energijskega kozmičnega sevanja in kratkovalovnega UVB sevanja (do 290 nm). Oblaki, onesnaženost in megla prav tako zmanjšajo intenziteto UV sevanja z absorbcijo in odbijanjem, medtem ko vidna svetloba in UVA sevanje potujeta skozi atmosfero bolj ali manj neovirano.

UVA sevanje prodira veliko globlje v kožo v primerjavi z UVB sevanjem (Slika 5). 70 % UVB sevanja se absorbira ali razprši od rožene plasti kože, 20 % UVB sevanja doseže žive epidermalne celice, 10 % pa celice dermisa. UVA sevanje slabše prehaja skozi roženo plast kože, vendar pa kar 30 % UVA žarkov doseže bazalne celice epidermisa, 20 % retikularne celice dermisa ter 1 % UVA žarkov prodre v usnjico [55].



Slika 5: UVA žarki imajo manjšo energijo in daljšo valovno dolžino, zato prodrejo globlje v kožo kot UVB žarki, ki imajo višjo energijo in krajšo valovno dolžino [55].

Ker UVA žarki prodrejo globlje v kožo, povzročijo spremembo v elastičnih vlaknih in tako prispevajo k nastanku tako imenovane solarne elastoze. Gre za propad elastičnih vlaken, ki ga povzroči sonce in za nastanek drobnih gubic in gub na predelu kože, ki je bila izpostavljena soncu [56]. Posledično se koža "stara". Akutno reakcijo kože pa predstavljajo sončne opekline, ki so posledica UVB žarkov. Negativne učinke UV sevanja na koži skušajo preprečiti naravni mehanizmi, ki varujejo telo pred sevanjem. UV sevanje, ki se ne odbije od zgornje rožene plasti, se absorbira z endogenimi kromofori v koži kot so melanin, RNK, DNK, proteini, aromatične amino kisline, kot sta na primer tirozin in triptofan [54, 55]. Absorpcija UV fotonov s kromofori povzroči različne fotokemične reakcije, ki vodijo do takojšnjih ali zakasnjenih UV učinkov (Slika 6).



Slika 6: Prikaz bioloških procesov, ki jih povzroči UV sevanje v koži [55].

Sončne kreme katerih namen uporabe je zaščita pred UV sevanjem vsebujejo molekule oziroma molekularne komplekse, ki lahko absorbirajo, odbijajo ali razpršijo fotone UV sevanja. To so tako imenovani zaščitni pripravki za sončenje, v razvoju pa so sončne kreme z aktivnimi komponentami, ki bodisi preprečijo, izboljšajo ali celo popravijo poškodbe kože zaradi sonca. Zaščitni pripravki za sončenje so učinkoviti predvsem pri preprečevanju rdečice in sončnih opeklin, ki jih povzročajo visoko energijski UVB žarki, medtem ko je njihovo delovanje na področju preprečevanja staranja kože odvisno od sposobnosti zaviranja nizko energijskega UVA sevanja [54]. Za karseda učinkovito zaščito pred učinki UV sevanja je torej edina smiselna uporaba kombinacije snovi, ki ščitijo tako pred UVA kot UVB žarki.

Glede na mehanizem delovanja delimo UV filtre na kemične UV filtre (spojine, ki UV svetlobo absorbirajo) in fizikalne UV blokatorje (snovi, ki UV svetlobo odbijajo in sipajo). Anorganski UV filtri so kemijsko inertni pigmenti, ki se zadržujejo v zgornjih plasteh dermisa in stratum corneuma. Njihova sposobnost odboja UV žarkov zavisi od velikosti in oblike delcev. Današnji UV filtri, ki temeljijo na anorganskih delcih nanometrskih velikosti, poleg odbijanja, svetlobo tudi absorbirajo in zato spadajo tako med fizikalne kot tudi med kemijske filtre [10].

Anorganska UV filtra, ki se največ uporabljata sta ZnO in TiO₂. Delci velikosti od 200 do 500 nm blokirajo UVA in UVB sevanje kot tudi vidno svetlobo in infrardeče sevanje. Vendar pa so v tej velikosti vidni in zato v kozmetičnih izdelkih nezaželjeni, zato pa se v kozmetiki pogosto uporabljajo fizikalni UV filtri z velikostjo delcev 10-50 nm. Z zmanjševanjem velikosti delcev se zmanjšuje odboj žarkov pri daljši valovni dolžini in se povečuje absorbcija žarkov pri krajši valovni dolžini. ND ZnO so boljši blokatorji UVA sevanja kot ND TiO₂, saj ND ZnO ščitijo pred zelo širokim spektrom UVA sevanja, vključno z UVA1, vendar pa so manj učinkoviti proti UVB sevanju [57]. ZnO je zelo stabilen na svetlobi in ne reagira z organskimi UV filtri. Prav tako ima tudi boljše kozmetične lastnosti v primerjavi z delci TiO₂, saj ima nižji lomni količnik in zato je na koži manj viden oziroma manj bel [54].

2. NAMEN DELA

Namen diplomske naloge je ugotoviti vpliv ND ZnO na keratinocite po krajšem (24, 48 in 72 h) in daljšem času izpostavitve (3 mesece). V raziskavi bomo kot vzorčne ND uporabili anorganske delce ZnO. Prvi cilj naloge bo pripraviti disperzijo ND za nanos na celice, saj celic v kulturi ne moremo izpostaviti ND v suhi obliki. Optimirali bomo metodo priprave disperzije ND z namenom, da bi pipravili disperzijo z minimalno povprečno velikostjo delcev, hkrati pa da bo metoda 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 rastnem 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 ZnO, 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 $0.005 - 100 \mu g/mL$ na celice po 24, 48 in 72 h izpostavitve. 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 ZnO 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 ZnO, s presevno elektronsko mikroskopijo bomo skušali ugotoviti ali ND vstopajo v celice in, če vstopajo, kje v celicah se nahajajo oziroma kje se kopičijo. Nadalje bomo ugotavljali, ali izpostavitev 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. EKPERIMENTALNI DEL

3.1 MATERIALI

3.1.1. Izhodne sestavine za izdelavo disperzije ND ZnO

- Cinkov (II) oksid, nanodelci velikosti < 100 nm, (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Nemčija);
- Medij: MEM (»Minimum essential medium«), (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija) z dodatki:
 - o 10 % (v/v) fetalni goveji serum (Gibco® Invitrogen, ZDA),
 - 0 1 % (v/v) neesencialne aminokisline (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija),
 - o 2 mM L-glutamin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija) in
 - o 100 U/mL antibiotik/antimikotik (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija).

3.1.2. Celična kulura in reagenti

- Celična kultura: keratinociti (NCTC2544), ICLC, (Univerza v Genovi, Italija);
- *Medij:* MEM (Minimum essential medium) z dodatki; glej zgoraj;
- *Pufri:* fosfatni pufer s pH 7,4 (PBS), pripravljen z raztapljanjem 8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 3,63 g Na₂HPO₄×12H₂O in 0,24 g KH₂PO₄ 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 in steriliziran.
- Barvila:
 - Za mitohondrije: *Mito Tracker*® Red CMXRos (Molecular probes, InvitrogenTM, Anglija)
 - Za jedra: *Hoechst 33342*, 2'-(4-Ethoxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1*H*-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^R Aqueus One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation, Madison, WI, ZDA)
- 0,25 % Tripsin × 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, InvitrogenTM, Anglija)
- *reagent za detekcijo reaktivnih kisikovih spojin (ROS)*, (reagent: 2',7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate; Molecular probes, InvitrogenTM, 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)
- Avtoklav (Kambič Laboratorijska oprema, Semič, Slovenija)
- Mikrotitrski čitalec (Safire^{2 TM} Tecan, Švica)
- pH meter (SevenMulti, Mettler Toledo, InLab® Expert Pro pH, Švica)
- Avtomatske pipete (BIOHIT za 2-20, 10-100 in 100-1000 μL, za velike volumne BIOHIT MIDI PLUS, Headquarters Biohit OYJ, Helsinki, Finska; EPPENDORF za 10 μL, Hamburg, Nemčija)

- Mikrotitrske ploščice s 96-imi vdolbinicami (TPP^R Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- plastične polistirenske ploščice za gojenje celičnih kultur s 6, 12 ali 24-imi vdolbinicami (TPP^R Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- plastične epruvete (TPP^R Techno Plastic Products, Transadingen, Švica)
- Invertni svetlobni mikroskop (Olympus CKX41, Japonska)
- Fluorescenčni mikroskop Olympus IX 81
- CO₂ inkubator (SORVALL^R 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 mm² (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)
- fotoaparat Olympus C-7070, Japonska
- Pretočni citometer (FacsCalibur cytometer; BD Biosciences, San Diego, USA)

3.3 PRIPRAVA DISPERZIJE ND ZnO

3.3.1. Sterilizacija ND

ND ZnO smo sterilizirali v zaprtem steklenem vsebniku v sladu s predpisom v 6. izdaji Evropske farmakopeje [58] s suho toploto pri 160 °C 2 uri.

3.3.2. Priprava disperzije ND ZnO

Vzorce smo pripravili z dispergiranjem ND ZnO v prečiščeni vodi in rastnem mediju. V plastično epruveto smo natančno natehtali približno 5 mg ND ZnO in jim dodali 5 mL

prečiščene vode oziroma rastnega medija. Dobili smo osnovno disperzijo s koncentracijo približno 1 mg/mL.

3.3.3. Soniciranje disperzije ND ZnO

Pripravljeno disperzijo ND ZnO s približno koncentracijo 1 mg/mL smo sonicirali z uporabo UZ kadičke ali/in UZ sonde. V različnih časovnih intervalih smo s fotonsko korelacijsko spektroskopijo (opisana v poglavju 3.3.4.) pomerili velikost delcev v odvzetih vzorcih, ter pomerili temparaturo disperzije.

Najprej smo sonicirali v UZ kadički. Plastično epruveto s pripravljeno disperzijo smo dobro zaprli, jo pretresli in pritrdili na stojalo, tako da je bila epruveta do pokrovčka potopljena v UZ kadičko. Pričeli smo s soniciranjem in po 5, 10, 15 in 20 min soniciranja odvzeli vzorce disperzije ter izmerili velikost delcev in temperaturo vzorca.

V drugem primeru smo sonicirali s pomočjo UZ sonde z amplitudo 30 %. Uporabili smo pulzni in kontinuirani način. Plastično epruveto s pripravljeno disperzijo smo vpeli v stojalo in v vzorec ustrezno namestili UZ sondo, ki smo jo predhodno obrisali s 70 % etanolom. Epruveta z disperzijo je bila ves čas potopljena v ledeni kopeli, da smo preprečili pretirano segrevanje vzorca. Pri kontinuiranem načinu smo odvzeli vzorce po 1, 2, 3, 4 in 5 min in jim izmerili velikost delcev ter temeperaturo disperzije. Pri pulznem načinu je pulz soniciranja trajal 9,9 s, čemur je sledil 9,9 s premor. Velikost delcev in temperaturo disperzije smo izmerili po 2, 5, 10 in 20 min.

3.3.4. Priprava disperzije ND ZnO za poskuse na celicah

Predhodno sterilizirane ND ZnO smo v aseptičnih pogojih natančno 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 dobro pretresli in sonicirali najprej 10 min v UZ kadički, nato pa še 10 min na UZ sondi po zgoraj opisanem pulznem načinu. Pripravljeno disperzijo smo redčili z medijem, tako da smo si pripravili serijo redčitev z naslednjimi koncentracijami: 0,01, 0,1, 1, 10, 20, 30, 50 in 100 μ g/mL pri testih akutne toksičnosti ter 1, 10 in 20 μ g/mL pri testih kronične toksičnosti.

3.3.5. Določanje velikosti ND ZnO

Vrstična elektronska mikroskopija (SEM)

Velikost in obliko ND smo vizualizirali z vrstičnim elektronskim mikroskopom. Prašek ND ZnO smo pritrdili 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 in 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: 173°
- število ponovitev: 3
- λ 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 meritev sta povprečna velikost delcev (hidrodinamski premer) in polidisperzni indeks (PI), ki podaja porazdelitev velikosti delcev v disperziji. PI je merilo porazdelitve velikosti delcev in lahko zavzema vrednosti med 0 in 1, pri čemer 0 pomeni monodisperzne, 1 pa polidisperzne delce. Vrednosti PI < 0,1 kažejo na dobro homogenost vzorca in ozko porazdelitev velikosti ND, Vrednosti PI > 0,3 pa na večjo heterogenost delcev v vzorcu [59].

3.4. In Vitro POSKUSI NA CELIČNI KULTURI

3.4.1. Izpostavitev keratinocitov ND ZnO za krajši čas

Pri kratkotrajni izpostavitvi keratinocitov ND ZnO smo nasadili mikrotitrsko ploščo 2,5 x 10^3 celic/vdolbinico v 50 µl medija v 4 paralelkah; v 3 paralelke pa smo dali le medij, kar nam je služilo kot kontrola. Sledila je 24 h inkubacija pri 37 °C in 5 % CO₂, da so se celice pritrdile na podlago. Po fazi pritrditve smo celicam dodali 50 µL disperzijo ND ZnO različnih koncentracij (0,005, 0,05, 0.5, 5, 10, 15, 25, 50, 100 µg/mL). Celice smo inkubirali 24, 48 ali 72 h, nakar smo proučevali preživetje celic in morebitne spremembe v njihovi morfologiji. Celic med poskusom nismo presajali.

3.4.2. Izpostavitev keratinocitov ND ZnO za daljši čas

Pri dolgotrajni izpostavitvi keratinocitov ND ZnO smo nasadili celice v polistirensko ploščico z 12-imi vdolbinicami po 1 x 10^4 celic/vdolbinico v 1 mL medija. Celice smo redno presajali in jim po 24 h dodajali 1 ml ND ZnO treh različnih koncentracij: 0,5, 5 in 10 µg/mL. V treh mesecih je to pomenilo 20 presajanj in 20 dodatkov ND. Eksperimente smo izvajali v treh paralelkah.

S celične kulture keratinocitov, ki je rastla pritrjena na podlago v polistirenski ploščici z 12-imi vdolbinicami, smo odlili rastni medij ter celice sprali s 500 μ L PBS. Nato smo v vsako vdolbinico dodali 300 μ L raztopine tripsina, tako da je prekril celotno površino celic. Tripsin smo pustili tako dolgo, da so se celice odlepile od podlage, kar smo spremljali pod invertnim mikroskopom. Delovanje tripsina smo inaktivirali z dodatkom 1 mL medija z dodanim fetalnim govejim serumom, ki inaktivira tripsin. S pipetiranjem smo celice sprali s podlage in jih iz vsake vdolbinice kvantitativno prenesli v svojo 15 mL centrifugirko. Sledilo je centrifugiranje disperzije celic (1200 obratov/min, 5 min). Po centrifugiranju smo supernatant odlili iz centrifugirke, celice pa smo redispergirali v 1 mL svežega medija in jih dobro premešali. Iz vsake centrifugirke smo prenesli 200 μ L celične suspenzije v eno vdolbinico nove ploščce z 12-imi vdolbinicami in dodali 800 μ L medija.

Pod mikroskopom smo preverili gostoto celic v vzorcu. Po 10, 15 in 20-em odmerku smo celice prešteli in jih redčili tako, da smo jih v novo ploščo nasadili v enakem številu tj. 1 x 10^4 celic/vdolbinico v 1 mL medija. Pred dodatkom disperzije ND k celicam, smo počakali 24 h, da so se celice pritrdile na podlago.

3.5. VREDNOTENJE UČINKOV ZnO NA KERATINOCITIH PO KRATKOTRAJNI IZPOSTAVITVI

3.5.1. Neposredno opazovanje celične kulture pod mikroskopom

Rast keratinocitov v kulturi smo spremljali s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa. Netretirane keratinocite (kontrola) in keratinocite, ki smo jih izpostavili ND ZnO v koncentraciji 0,05, 0,5, 5, 10, 15, 25, 50 in 100 μ g/mL smo poslikali neposredno v polistirenskih ploščicah za gojenje celičnih kultur z digitalnim fotoaparatom (Olympus C-7070, Japonska). Po 24, 48 in 72 h smo 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 tem tipu mikroskopa so objektivi 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 [60].

3.5.2. Fluorescenčna mikroskopija

Za preparate smo celice gojili v polistirenski ploščici s šestimi vdolbinami, tako da smo na dno vsake vdolbine položili predhodno sterilizirano krovno stekelce in nanj odpipetirali 3 mL disperzije celic tj. 5,0 x 10^5 keratinocitov in jih inkubirali 24 h pri temperaturi 37 °C in 5 % CO₂, da so se celice pritrdile na podlago. Nato smo celicam dodali disperzijo ND ZnO, da je bila koncentracija ND na celicah 0,5, 5 in 10 µg/mL. Vzorce smo inkubirali 24, 48 in 72 h ter nato pripravili preparate za fluorescenčno mikroskopijo. Odpipetirali smo medij in celice sprali s 500 μ L PBS. Najprej smo dodali 500 μ L 50 nM barvilo za mitohondrije. Celice smo inkubirali 30–45 min pri 37 °C in 5 % CO₂. Sledilo je spiranje s PBS in dodatek 500 μ L ledenomrzlega 4 % formalina in inkubacija pri sobni temperaturi v temi 10 min, da so se celice pritrdile na podlago. Po ponovnem spiranju s pufrom smo za permeabilizacijo celic dodali 500 μ L 0,25 % raztopine detergenta Triton-X 100 in inkubirali pri sobni temperaturi v temi 10 min. Ponovno smo celice sprali s 500 μ L PBS in dodali 500 μ L raztopine barvila za jedra v PBS s koncentracijo 5 μ g/mL in inkubirali 30 min v temi pri sobni temperaturi. Po spiranju s PBS smo dodali še 500 μ L raztopine barvila za aktin s koncentracijo 1 μ g/mL in še zadnjič inkubirali pri sobni temperaturi v temi 30 min. Sledilo je še dvakratno spiranje preparatov s 500 μ L PBS. Tako obravnavane celice smo skupaj s krovnim steklom prenesli na objektno steklo, ki smo ga predhodno premazali s snovjo, ki preprečuje bledenje fluorescence in tako poveča obstojnost fluorescenčnih barvil. Preparate smo pustili v temi vsaj 24 h in nato robove krovnega stekla premazali s prozornim lakom za nohte ter jih shranili v hladilniku zaščitene pred svetlobo.

Pripravljene preparate smo opazovali s fluorescenčnim mikroskopom. Celice smo posneli po rezinah pri filtrih, optimalnih za posamezno fluorescentno barvilo. Izbrane nastavitve mikroskopiranja za modro barvilo Hoechst 33342 pri filtru DAPI, za zeleno barvilo Phalloidin Fluorescein Isothiocyanate pri filtru FITC, za rdeče barvilo Phalloidin– Tetramethylrhodamine B isothiocyanate in *Mito Tracker* Red CMXRos pri filtru Tx-Red. 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, ker 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

Pri ugotavljanju preživetja celic z MTS testom smo keratinocite za 24, 48 ali 72 h izpostavili različnim koncentracijam ND ZnO (0,05, 0,5, 5, 10, 15, 20, 25 in 50 μ g/mL) ter nato dodali po 10 μ L MTS reagenta in inkubirali 3 h pri 37 °C in 5 % CO₂. S čitalcem za mikrotitrske ploščice smo 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 je kolorimetrična metoda za ugotavljanje števila živih celic v študijah prolifercije in toksičnosti. MTS test temelji na določanju aktivnosti encima mitohondrijske dehidrogenaze, ki je posredni kazalec preživetja celic. MTS reagent vsebuje [3-(4,5dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol] in elektrone povezujoči reagent fenazin etosulfat, ki izboljša kemijsko stabilnost reagenta v raztopini. MTS tetrazolijev kompleks se v prisotnosti živih celic reducira v rdeče obarvan produkt formazan, ki je topen v celičnem mediju (Slika 8). Pretvorbo omogoča NADPH ali NADH, ki nastane pod vplivom dehidrogenaznih encimov v metabolno aktivnih celicah. Količino nastalega formazana izmerimo pri valovni dolžini 490 nm in je direktno proporcionalna številu živih celic v celični kulturi [61].



Slika 8: Kemijski formuli MTS reagenta in formazana, ki nastane z encimsko reakcijo v metabolno aktivnih celicah.

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

Preživetje celic = $((A_{vz} - A_{vzO}) / (A_k - A_{kO})) \times 100 \%$

Kjer je A_{vz} = absorbanca vzorca, A_{vzO} = absorbanca ND v mediju, A_k = absorbanca kontrolnih celic v mediju, ki jim je bil dodan le MTS reagent, brez ND, A_{kO} = absorbanca medija.

3.6. VREDNOTENJE UČINKOV ZnO NA KERATINOCITIH PO DOLGOTRAJNI IZPOSTAVITVI

3.6.1. Neposredno opazovanje celične kulture pod mikroskopom

Pri vrednotenju učinkov ND ZnO na keratinocitih po daljšem času izpostavljenosti, smo pod invertnim svetlobnim mikroskopom spremljali gostoto celic, njihovo morfologijo in pritrditev na podlago. Poleg tega smo s štetjem ugotavljali številsko koncentracijo celic. Celice smo šteli s pomočjo hemocitometra v Neubauerjevi komori po 10, 15 in 20-em odmerku. Disperzijo tripsiniziranih celic smo dobro premešali in je 10 μ L nanesli 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 preštetih celic/število preštetih kvadratkov na mreži hemocitometra) × faktor redčenja × 10^4

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 smo pripravili po 10, 15 in 20-em dodanem odmerku ND ZnO. Preparate smo pripravili po enakem postopku kot je opisan v poglavju 3.5.2., nato pa smo jih pregledali in posneli s fluorescenčnim mikroskopom. Aktivnost mitohondrijev smo poleg MTS testa ugotavljali tudi kvalitativno preko primerjave intenzitete fluorescence mitohondrijev pri enakih nastavitvah parametrov fluorescenčnega mikroskopa.

3.6.3. Vrednotenje metabolne aktivnosti po dolgotrajni izpostavitvi ND ZnO

Tekom vrednotenja učinkov ND na celice po dolgotrajni izpostavitvi smo po 10, 15 in 20em 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 x 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 μ L MTS reagenta in inkubirali 3 h pri 37 °C in v atmosferi s 5 % CO₂, nato 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 ovrednotili s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije (SEM). Po trimesečni izpostavitvi keratinocitov ND ZnO, smo celice nanesli na inserte s porozno membrano (Cell Culture Inserts, BD Falcon, Heidelberg, Nemčija) in jih inkubirali 24 h pri 37 °C in 5 % CO₂, da so se pritrdile na podlago. Nato smo jih sprali s PBS in fiksirali z raztopino 2 % (m/v) paraformaldehida in 2 % (v/v) glutaraldehida v 0,1 M kakodilatnem pufru, pH 7,4, 2 h pri 4 °C. Po spiranju z 0,1 M kakodilatnim pufrom in postfiksaciji z 1 % (m/v) OsO₄, je sledila dehidracija vzorcev s serijo raztopin acetona in vode naraščajoče koncentracije. Nato smo preparate posušili pri kritični točki, jih naparili z zlatom in opazovali s pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa (Jeol JSM 840A).

3.6.5. Presevna elektronska mikroskopija

Presevno elektronsko mikroskopijo (TEM) smo uporabili za določanje privzema in lokalizacijo ND ZnO v keratinocitih ter za opazovanje morebitnih morfoloških sprememb znotrajceličnih organelov po trimesečni izpostavitvi celic ZnO. Postopek priprave vzorcev je bil enak kot je opisan v poglavju 3.6.4. 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 trimesečnem eksperimentu smo 2×10^5 celic v 2 mL medija nasadili v ploščico z 12-imi vdolbinicami in inkubirali 24 h, da so se celice pritrdile na podlago. Nato smo celice sprali z 2 mL PBS in jim dodali 300 µL raztopine tripsina, s katerim smo celice

ločili od podlage in porušili medcelične povezave (1 min). Tripsin smo inaktivirali z 1 mL medija z dodanim fetalnim govejim serumom. Celice smo s pipetiranjem sprali s podlage in jih kvantitativno prenesli v 15 mL centrifugirko. 10 μ L celic smo odvzeli in jim dodali 10 μ L barvila triptan modrega ter jih prešteli s pomočjo hemocitometra v Neubauerjevi komori, medtem ko smo ostale celice centrifugirali na 1500 obratov/min, 15 min. Po končanem centrifugiranju smo odlili supernatant, sediment pa smo dispergirali v ustreznem volumnu PBS, da je bila končna koncentracija celic 5 x 10⁵ celic v 200 μ L. Tako dobljeno suspenzijo celic smo dobro prepipetirali in jo prenesli v 4 mL ledeno mrzlega metanola in vzorec shranili v zamrzovalniku za 1-2 h. Sledilo je ponovno centrifugiranje na 1500 obratov/min 20 min. Metanol smo previdno odpipetirali in celicam dodali 500 μ L PBS ter dobro premešali. Nato smo dodali 10 μ L RNAze (začetna koncentracija = 100 mg/mL) in 20 μ L propidijevega jodida (začetna koncentracija = 1 mg/mL). Disperzijo smo dobro premešali in pustili na sobni temperaturi v temnem prostoru 0,5–1 h. Pred vsako meritvijo smo vzorec dobro premešali (vorteksirali) in nato določili celični cikel s pretočno citometrijo.

3.6.7. Znotrajcelični nastanek ROS

Po končanem trimesečnem tretiranju celic z ND ZnO smo določili v kolikšni meri je ZnO vplival na nastanek znotrajceličnih reaktivnih kisikovih spojin (ROS). Celice, ki so bile izpostavljene 20-im odmerkom ND, smo nasadili v koncentraciji 5 x 10^3 celic v 100μ L medija v črno mikrotitrsko ploščico s 96-imi vdolbinicami, ki je primerna za merjenje fluorescence. Celice smo inkubirali 24 h, da so se pritrdile na podlago, nato pa smo jih dvakrat spirali s 100 μ L PBS ter dodali 100 μ L reagenta za določanje ROS, ki smo ga predhodno redčili z medijem do delovne koncentracije 10 μ M. Celice smo inkubirali pri 37 °C, 20 min in nato reagent, ki ni vstopil v celice, odstranili s trikratnim spiranjem s celičnim medijem brez dodanega seruma. Fluorescenco smo merili z ekscitacijo pri 498 nm in emisijo pri 522 nm z mikrotitrskim čitalcem (Safire^{2 TM} Tecan, Švica).

Pri ugotavljanju znotrajceličnega nastanka ROS smo uporabili reagent 2',7'diklorofluorescin diacetat; DCFH-DA, ki lahko pasivno prehaja v celice, kjer ga deacetilirajo nepecifične esteraze. Molekula DCFH ostane ujeta v celici, kjer reagira z reaktivninimi kisikovimi spojinami (ROS) in se pretvori v fluorescentno obliko 2',7'diklorofluoresceina (DCF), ki je pokazatelj znotrajcelične oksidacije [62].

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. IZDELAVA IN VREDNOTENJE DISPERZIJE NANODELCEV ZnO

4.1.1. Vpliv načina in časa soniciranja na velikost delcev ZnO v disperziji

Lastnosti ND se lahko močno razlikujejo od lastnosti, ki jih imajo delci istega kemizma večje velikosti. To pomeni, da so biološki učinki delcev ZnO lahko odvisni od njihove velikosti, torej je pomembno ali so celice v stiku z delci nanovelikosti ali pa z agregati delcev, zato smo pred preučevanjem vpliva ND ZnO na celice optimizirali postopek izdelave disperzije, da bi se agregaciji v največji možni meri izognili.

Za dispergiranje delcev v vodi in rastnem mediju smo najprej uporabili ultrazvočno kadičko nato pa ultrazvočno sondo. Soniciranje v UZ kadički je za vzorec veliko manj obremenjujoče, saj je jakost ultrazvoka manjša kot pri soniciranju z UZ sondo. Vendar smo z uporabo UZ kadičke, tako v vodi kot v rastnem mediju, razbili le največje agregate, saj se povprečna velikost delcev ni spustila pod 400 nm, čeprav proizvajalec navaja, da je velikost delcev < 100 nm. Najmanjšo povprečno velikost smo izmerili v vodi po 20 min soniciranja in je znašala 425,3 +/- 2,1 nm, medtem ko se v rastnem mediju povprečna velikost delcev ni spustila pod 489,4 +/- 42,0 nm (Preglednica III). Ta razlika v izmerjeni velikosti je verjetno posledica sestave disperznega medija. Na agregacijo delcev močno vpliva površinska energija delcev, ki pa zavisi tudi od lastnosti disperznega medija (pH-ja, prisotnosti molekul in/ali ionov, ki se adsorbirajo na površino delcev, od koncentracije elektrolitov in od prisotnosti organskih snovi) [41]. Tako so na primer v rastnem mediju prisotni proteini (goveji serumski albumin), ki so makromolekule in 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 agregiranju [63].

Med soniciranjem v UZ kadički smo ves čas merili tudi temperaturo vzorca, ki pa se ni dvignila nad 35 °C, zato nam vzorcev ni bilo potrebni hladiti. Ugotovili smo, da se povprečna velikost delcev in temperatura disperzije s časom soniciranja bistveno ne spreminjata.

t [min]	Povprečna velikost	PI	T [°C]
	delcev [nm]		
5	547,7 +/- 10,1	0,386 +/- 0,028	27
10	531,9 +/- 17,3	0,375 +/- 0,042	29
15	516,6 +/- 41,0	0,289 +/- 0,025	32
20	489,4 +/- 42,0	0,233 +/- 0,033	35

Preglednica III : Povprečna velikost delcev ZnO, PI in temperatura disperzije v rastnem mediju po soniciranju v UZ kadički.

Pri uporabi UZ sonde smo ugotovili, da se velikost delcev v vodi in mediju signifikantno ne razlikuje. Nekoliko manjše delce smo izmerili v vodi, najverjetneje zaradi enakih vzrokov kot pri uporabi UZ kadičke. Najmanjša povprečna velikost izmerjena v vodi je bila 247,9 +/- 1,8 nm, medtem ko smo v mediju izmerili 254,3 +/- 2,1 nm. PI naših disperzij ND ZnO se je v vodi gibal od 0,13 do 0,23, v rastnem mediju pa od 0,15 do 0,26, kjer je bil v povprečju vseskozi nekoliko večji (Preglednica IV). Torej zaključimo lahko, da medij v katerem dispergiramo delce vpliva na njihovo disperzibilnost. Vrednost PI se ne zmanjšuje časovno odvisno in je v povprečju vseskozi približno enaka, odvisna je le od disperznega medija. Vrednosti PI kažejo, da delci v vzorcu niso monodisperzni in da so v vzorcu prisotni agregati različnih velikosti; torej je vzorec heterogen.

Preglednica IV: PI disperzije ZnO v rastnem mediju in v vodi po pulznem soniciranju z uporabo UZ sonde.

t [min]	PI (voda)	PI (rastni medij)
2	0,222 +/- 0,012	0,201 +/- 0,012
5	0,195 +/- 0,022	0,181 +/- 0,033
10	0,204 +/- 0,018	0,252 +/- 0,010
15	0,133 +/- 0,006	0,160 +/- 0,013
20	0,150 +/- 0,014	0,173 +/- 0,012

Pri kontinuirani uporabi UZ sonde vidimo trend zmanjševanja povprečne velikosti delcev s časom soniciranja. Minimalna povprečna velikost je bila 289,8 +/- 0,0 nm, ki smo jo dosegli že po 5 min soniciranja. Pri uporabi UZ sonde pride do vnosa velike količine energije in vzorec se močno segreva, zato smo soniciranje izvajali na ledeni kopeli, saj smo želeli preprečiti prekomerno segrevanje. Previsoka temperatura vzorca bi lahko

povzročila denaturacijo proteinov, ki so sestavina rastnega medija. Kljub uporabi ledene kopeli, se je vzorec močno segreval (Slika 9) in že po 3 min je temeperatura presegla 40 °C.



Slika 9: Povprečna velikost delcev (1. in 2. ponovitev) v odvisnosti od časa kontinuiranega soniciranja z UZ sondo ter časono spreminjanje temperature vzorca.

Pri uporabi UZ sonde v pulznem načinu soniciranja smo opazili podoben trend zmanjševanja delcev s časom soniciranja kot pri kontinuiranem načinu. Vendar smo že po 5 min soniciranja izmerili velikost delcev, ki je bila zelo podobna minimalni velikosti delcev po kontinuiranem soniciranju. Po 10 min pa smo izmerili minimalno povprečno velikost, ki je znašala 254,3 +/- 2,1 nm (Slika 10).



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

Začetna tempertura vzorca je bila zaradi predhodnega soniciranja v UZ kadički ~ 35 °C, potem pa se je med pulznim soniciranjem z UZ sondo zaradi hlajenja vzorca na ledeni kopeli, zniževala in se ustalila nekje pri 25 °C (Slika 10).

Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odočili, da bomo vzorce disperzije za nadaljne poskuse na celicah najprej 10 min sonicirali v UZ kadički in tako razbili največje agregate, nato pa bomo disperzijo 10 min pulzno sonicirali na ledeni kopeli z UZ sondo.

4.1.2. Vrednotenje velikosti in morfologije delcev ZnO

Proizvajalec ND ZnO v specifikaciji navaja, da je povprečna velikost delcev manjša od 100 nm. S fotonsko korelacijsko spektroskopijo smo ugotovili, da je bila povprečna velikost delcev ZnO v vodi približno 248 nm in PI od 0,15 do 0,22, v rastnem mediju pa je bila povprečna velikost delcev ZnO približno 250 nm, polidisperzni indeks pa se je gibal od 0,16 do 0,25. Iz tega lahko sklepamo, da imajo ND ZnO veliko težnjo po agregiranju tako v vodi kot v mediju in da je v vzorcu široka porazdelitev velikosti delcev, saj sorazmerno visoka vrednost PI kaže na heterogenost naše disperzije. Nadalje, obstoj agregatov že v suhi obliki potrjuje slika praškastih delcev ZnO posneta z vrstično elektronsko mikroskopijo, kjer vidimo agregate paličatih delcev ZnO, ki so prav tako kot v disperziji, zelo neenakomernih velikosti (Slika 11). Na sliki lahko vidimo, da ima ZnO tudi v praškasti obliki široko porazdelitev velikosti delcev.

Do podobnih rezultatov so prišli tudi drugi raziskovalci [41, 49, 64]. V raziskavi v kateri so določali velikost ND ZnO v praškasti obliki in v vodni diperziji (5 % ZnO, 2 % surfaktanta, 93 % vode, pH = 7,5) so s TEM ugotovili, da se ND ZnO v prahu in v disperziji nahajajo v obliki agregatov z velikostjo od nekaj sto nm do nekaj µm, čeprav je bila specificirana velikost 30 nm, in da soniciranje z visoko močjo razbije le večje skupke v manjše posamezne agregate. Nadalje so s PCS ugotovili da je povpečna velikost delcev po soniciranju ZnO v disperziji od 73 nm do 408 nm, njihova velikost v praškasti obliki pa je bila od 178 nm do 361 nm. Torej je bila povprečna velikost ND ZnO v praškasti obliki in v diperziji veliko večja od vrednosti 30 nm, ki jo je navajal proizvajalec [41]. Tudi v drugi raziskavi, kjer je bila specificirana velikost delcev ZnO od 24 do 71 nm, so z elektronsko mikroskopijo ugotovili, da so ND ZnO v obliki agregatov z velikostjo tudi do nekaj µm. Povprečno velikost delcev po 30 min soniciranja v vodni disperziji je znašala

249 nm, v 10 % vodni raztopini PVP 314 nm, v 10 % vodni raztopini PEG 400 pa 293 nm [64]. Majhni delci so zaradi velike številčne gostote močno podvrženi agregaciji in aglomeraciji, medtem ko večji delci ostanejo večinoma v neagregirani obliki [65].



Slika 11: Delci ZnO posneti z vrstično elektronsko mikroskopijo pri manjši (A) in pri večji (B) povečavi, kjer vidimo agregate neenakomernih velikosti.

4.2. KRATKOTRAJNA IZPOSTAVITEV CELIČNE KULTURE KERATINOCITOV NANODELCEM ZnO

Pred ugotavljanjem učinkov dolgotrajne izpostavitve celic ND ZnO smo določili koncentracijo, ki je pri kratkotrajni izpostavitvi "varna" za keratinocite. Ugotavljali smo učinke ND ZnO v koncetracijskem območju od 0,005 do 100 µg/mL po 24, 48 in 72-ih urah. Ugotovili smo, da čas izpostavitve ND nima signifikantnega vpliva na preživetje celic pri isti koncentraciji; kar velja zlasti za vzorce po 48 in 72 h. Koncentracije nad 15 µg/mL močno vplivajo na preživetje celic, saj je pri koncentarciji 20 µg/mL preživetje približno 80 % po 24 h in komaj 40 % po 48 in 72 h. Pri koncentraciji 100 µg/mL pa se zmanjša na 40 % že po 24 h in na manj kot 20 % po 48 in 72 h (Slika 12). Torej ND ZnO do koncetracije 15 µg/mL nimajo znatnega vpliva na preživetje celic v kulturi, nato pa se z naraščanjem koncetracije njihov citotoksični učinek povečuje vse do koncentracije 100 µg/mL, ko večina celic ne preživi. Naši rezultati citotoksičnosti ND ZnO so podobni rezultatom študije, kjer so človeške epidermalne celice A431 izpostavili ND ZnO v koncentraciji od 0,008 do 20 µg/mL za 3, 6, 24 in 48 ur. Z MTT testom so ugotovili, da je najvišja testirana koncentracija toksična že po 3 h, po 48 h pa se je preživetje celic zmanjšlo na 86 %, 42 % in 9 % pri koncentracijah 0,8, 5 in 8 µg/mL. Citotoksičnost so dokazali tudi s testom privzema barvila nevtralno rdečega (NRU) in z merjenjem sproščanja laktatne dehidrogenaze (LDH) [1].



Slika 12: Relativno preživetje celic glede na kontrolo (1. in 2. ponovitev) v odvisnosti od koncentracije in časa izpostavitve.

Dobljeni rezultat preživetja celic z MTS testom potrjujejo tudi slike celic v kulturi pod invertnim mikroskopom (Slika 13). Na slikah posnetih po 24 h tretiranju celic z ND ZnO vidimo, da je število celic, ki so bile izpostavljene ZnO v koncentraciji 10 µg/mL, manjše (Slika 13 B) kot pri kontroli (Slika 13 A). Pri koncentraciji 25 µg/mL se preživetje celic močno zmanjša, celice so med seboj slabo povezane, imajo spremenjeno morfologijo (kroglaste oblike) in veliko je nepritrjenih na podlago (Slika 13 C), kar potrjuje tokičnost ZnO za celice.



Slika 13: Kultura keratinocitov pod invertnim mikroskopom pri 100-kratni povečavi po 24 h: (A) kontrolne celice, (B) celice izpostavljene ND ZnO v koncentraciji 10 µg/mL, (C) celice izpostavljene ND ZnO v koncentraciji 25 µg/mL.

Glede na zbrane podatke smo prišli do ugotovitve, da koncentracije do 10 µg/mL ne povzročajo signifikantnih morfoloških sprememb in jih je smiselno uporabiti pri testiranju dolgotrajne izpostavitve celične kulture ND ZnO. Koncentracije nad 10 µg/mL pa že pri kratkoročni izpostavitvi povzoročajo signifikantno zmanjšanje preživetja celic in spremembe v morfologiji.

4.3. DOLGOTRAJNA IZPOSTAVITEV CELIČNE KULTURE KERATINOCITOV NANODELCEM ZnO

V okviru testiranja akutne toksičnosti nismo ugotovili nobenih znatnih učinkov ND ZnO na keratinocite v koncentracijah do 10 μ g/mL, zato smo izbrali koncentracije 0,5, 5 in 10 μ g/ml za kontinuirano trimesečno testiranje.

4.3.1. Spremljanje števila celic v kulturi

Rast celic smo opazovali pod invertnim svetlobnim mikroskopom in le pri koncentraciji 0,5 µg/mL so celice tekom celotnega poskusa kazale normalno celično rast in morfologijo primerljivo kontroli, pri višjih koncentracijah pa je prišlo do sprememb v številu celic, morfologiji, medsebojni povezanosti in pritrditvi na podlago. Metoda štetja, ki je absolutna metoda in se na njene rezultate lahko zanašamo z največjo gotovostjo, je v našem primeru pokazala rezultate, ki se ne ujemajo z rezultati ostalih testov oz. z rezultati štetja celic pri tujih študijah. Rezultati so pokazali intenzivno povečanje proliferacije po 10-em odmerku ne glede na koncentracijo ND, saj je bilo število celic približno 2-krat večje kot pri kontroli. Po 15-em odmerku pri koncentraciji 0,5 in 5 µg/mL je bila proliferacija še intenzivnejša, saj je bilo število celic kar 3-krat večje v primerjavi s kontrolo (Slika 14). Povsem pričakovani so rezultati po 20-em odmerku oziroma pri koncentraciji 10 µg/mL pri vseh odmerkih, kjer je relativno preživetje celic 70 % ali še manj glede na kontrolo. Zaključimo lahko, da visoke koncentracije ND ZnO delujejo citotoksično na keratinocite že po kratkotrajni izpostavitvi, nizke koncentracije pa privedejo do citotoksičnosti v času dolgotrajne izpostavljenosti. Rezultate, ki kažejo na inducirano proliferacijo keratinocitov

pa bi bilo potrebno z dodatnimi študijami raziskati, da se prepričamo o morebitnem vplivu ND ZnO na transformacijo normalnih celic v tumorske.



Slika 14: Število celic v vzorcu relativno glede na kontrolo v odvisnosti od koncentracije dodanih ND ZnO in števila dodanih odmerkov.

S pomočjo fluorescenčne mikroskopije smo opazovali obliko celic in morebitne spremembe v obliki celičnega jedra ter aktinskih filamentov. Pri kontrolnih celicah so aktinski filamenti lepo vidni, jedra so zaobljena ali rahlo ukrivljena, mitohondriji pa so slabše vidni (Slika 15 A). Na sliki celic po 15-em odmerku pri koncentraciji 5 μ g/mL opazimo, da so celice med seboj manj povezane, aktinski filamenti so slabo vidni, jedra so preživele celice bolj metabolno aktivne (Slika 15 B). Po 15-em odmerku pri koncentraciji 10 μ g/mL pa je signifikantno zmanjšano število celic, celice niso več povezane med seboj, saj ni vidnih aktinskih filamentov, poleg tega imajo spremenjeno morfologijo saj so kroglaste oblike (Slika 15 C). Na slikah po 20-em odmerku je gostota celic še manjša in pri koncentraciji 10 μ g/mL je popolnoma spremenjena morfologija celice. Zlasti izrazita je sprememba aktinskih filamentov, ki jih vidimo v »segmentirani« obliki. Torej ND ZnO delujejo citotoksično na keratinocite. Vplivajo na slabše medcelične povezave in povzročajo spremembe v obliki celic in v morfologiji jedra ter aktinskih filamentov.



Slika 15: Slike keratinocitov posnete s fluorescenčno mikroskopijo. Slike posnete po 15-em odmerku (A, B, C); kontrolne celice (A), celice izpostavljene ND ZnO s koncentracijo 5 μ g/mL (B) in 10 μ g/mL (C). Jedra so obarvana modro, aktinski filamenti zeleno in mitohondriji rdeče. Slike posnete po 20-em odmerku (D, E, F); kontrolne celice (D), celice izpostavljene ND ZnO s koncentracijo 5 μ g/mL (D) in 10 μ g/mL (F). Jedra so obarvana modro in aktinski filamenti zeleno. Merilo predstavlja 20 μ m.

4.3.2. Spremljanje metabolne aktivnosti

Metabolno aktivnost celic smo določali z MTS testom, kjer merimo aktivnost mitohondrijskih dehidrogenaznih encimov. Test smo izvedli tako, da smo v ploščo s 96-imi vdolbinicami nasadili po 10-em, 15-em ter 20-em odmerku enako število celic, jih izpostavili različnim koncetracijam ND ZnO in izvedli meritve. V tem primeru nam test ni služil kot posredno merilo preživetja celic, saj je bila koncentracija celic v vseh vdolbinicah enaka, temveč neposredno kot merilo mitohondrijske aktivnosti. Mitohondrijska aktivnost je pri koncentraciji 0,5 µg/mL ne glede na število odmerkov za 20 % večja v primerjavi s kontrolo, medtem ko je pri koncetraciji 5 µg/mL po 10-em in 15-em odmerku primerljiva kontroli, po 20-em odmerku pa za več kot 30 % večja v primerjavi s kontrolo, manjša po vseh dodanih odmerkih; po 10-em za 53 %, po 15-em za 46 % in po 20-em odmerku kar za 72 % manjša.



Slika 16: Relativna mitohondrijska aktivnost v odvisnosti od koncentracije ND ZnO in od števila dodanih odmerkov.

Poleg MTS testa smo mitohondrijsko aktivnost kvalitativno ovrednotili tudi na podlagi slik preparatov celic, kjer smo opazovali intenziteto fluorescence mitohondrijev. Mitohondrije smo obarvali s fluorescentim barvilom, nato pa smo preparate kontrolnih celic in celic tretiranih z ND ZnO posneli pri enakih nastavitvah mikroskopa, tako da smo lahko kvalitativno ocenili intenziteto rdečega obarvanja mitohondrijev. Ugotovili smo, da se z daljšanjem časa izpostavitve in z večanjem koncentracije ND zmanjšuje gostota celic v kulturi, njihova mitohondrijska aktivnost pa je do koncentracije 5 μ g/mL večja od kontrolnih celic (Slika 17). Pri koncentraciji 10 μ g/mL pokaže MTS test zmanjšano mitohondrijsko aktivnost, slika preparata pa pokaže nezaznavno intenziteto rdeče fluorescence v vzorcu.



Slika 17: Fluorescenčno označeni mitohondriji kontrolnih celic, celic, ki so bile izpostavljene 20-im odmerkom ND ZnO s koncentracijo 0,5 μg/mL in 10 μg/mL. Merilo predstavlja 20 μm.

4.3.3. Morfologija površine keratinocitov

Slike 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 18). Apikalna površina celic je tako pri enih kot pri drugih pokrita s številnimi membranskimi izrastki. Na slikah keratinocitov tretiranih z ND je povečano število medceličnih povezav, ki so vidne kot nanotubularne strukture, ki se raztezajo med celicami. Tovrstne medcelične povezave pri keratinocitih še niso bile opisane v literaturi, opisane pa so v diplomskem delu v katerem je bila preučevana toksičnost ND TiO₂ [65]. Keratinociti, ki so bili 3 mesece izpostavljeni ND TiO₂ v koncentraciji 5 μg/mL, so bili posneti z vrstičnim elektronskim mikroskopom in na slikah so vidni membranski izrastki in številne medcelične povezave, ki jih pri kontrolnih celicah ni [65]. Tovrstne medcelične povezave so v literaturi opisane pri imunskih celicah, astrocitih in pri celicah, ki aktivno migrirajo [66]. Te nanotubularne strukture predstavljajo način medcelične komunikacije, ki lahko omogoča prenos molekul in/ali celo organelov [67]. Domnevamo, da povečano število nanotubulov med keratinociti, ki so so bili izpostavljeni ND ZnO in ND TiO₂,

nakazuje na transformacijo normalnih celic v tumorske. Za potrditev domneve pa so vsekakor potrebne nadaljne raziskave.



Slika 18: SEM slike keratinocitov: Kontrolne celice pri manjši (A) in večji (C) povečavi, ter keratinociti, ki so bili izpostavljeni 20-im odmerkom ND ZnO s koncentracijo 5 μg/mL pri manjši (B) in večji (D) povečavi.

4.3.4. Privzem nanodelcev v celice

TEM slike keratinocitov, ki so bili 3 mesece izpostavljeni ND ZnO, potrjujejo znotrajcelični privzem ND ZnO. ND vidimo v citoplazmi v veziklih, predvsem v endosomih (Slika 19). 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 ZnO, so v primerjavi z endosomi kontrolnih celic nekoliko manjši. Do podobnih ugotovitev so prišli v raziskavi o toksičnosti ND ZnO za pljučne epitelijske celice. S TEM so ugotovili, da ND aglomerirajo v znotrajceličnih veziklih, agregatov pa niso opazili v jedru ali mitohondrijih.

V nekaterih celicah so opazili tudi difuzno razporejene agregate delcev, kar lahko nakazuje na sproščanje agregatov iz veziklov [49], medtem ko sta velikost in oblika vseh ostalih celičnih organelov primerljivi.



Slika 19: TEM sliki kontrolnih keratinocitov (A) in keratinocitov, ki so bili izpostavljeni 20-im odmerkom ND ZnO s koncentracijo 5 μ g/mL. ND vidimo znotraj endosomov. Merilo predstavlja 500 nm.

Na tem mestu je potrebno poudariti, da smo morali pri mikroskopiranju temeljito pregledati ves preparat, saj smo ND našli le znotraj nekaterih celic. Razlog je verjetno v dejstvu, da je ZnO delno topen v vodnem okolju, zato se delci v mediju (in tudi znotrajcelično) delno raztapljajo in v celicah lahko opazimo le privzete neraztopljene »ostanke« delcev oz. agregatov.

4.3.5. Vpliv izpostavitve celic nanodelcem ZnO na genetski material celic

Vpliv ND ZnO na genetski material smo ugotavljali z analizo celičnega cikla po trimesečni izpostavitvi keratinocitov ND ZnO. 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 celično delitev (faza S) ali so v fazi delitve, diploidne celice z dvokromatidnim kromatinom (faza G2/M). Prisotnost fragmentirane DNK (faza subG1) kaže na prisotnost apoptotičnih celic.

Analizo celičnega cikla smo izvedli po dodanih 12-ih in 20-ih odmerkih ND ZnO. Analiza kaže, da se število celic v fazi G1 pri koncentraciji ZnO 5 in 10 μ g/mL zmanjša, posledično pa se število celic v fazi S in G2/M poveča (Slika 20 in Slika 21).



Slika 20: Delež celic v posameznih fazah v odvisnosti od koncentracije ND ZnO po dodanem 12em odmerku.





Slika 21: Rezultat analize celičnega cikla s pretočno citometrijo: kontrolne celice in celice, ki so bile izpostavljene 20-im odmerkom ND ZnO s koncentracijo 0,5 µg/mL in 10 µg/mL.

Najbolj signifikantne razlike v celičnem ciklu opazimo po dodanem 20-em odmerku, ko se število apoptotičnih celic (faza subG1) pri koncentraciji 10 µg/mL poveča (Slika 22).



Slika 22: Delež apoptotičnih celic v odvisnosi od koncentracije dodanih ND ZnO po zaključenem trimesečnem tretiranju.

Glede na rezultate lahko sklepamo, da ND ZnO pri koncentraciji 0,5 μ g/mL nimajo vpliva na genetski material keratinocitov, medtem ko pri koncentraciji 5 μ g/mL opazimo večje število celic v fazi delitve in večje število apoptotičnih celic. Pri koncentraciji 10 μ g/mL pa se število celic v fazi subG1 in G2/M že znatno razlikuje v primerjavi s kontrolnimi celicami. Rezultati torej nakazujejo, da prisotnost ND ZnO v celični kulturi do neke mere vpliva na celični cikel in povzoči povečanje obsega delitve in apoptoze.

4.3.6. Znotrajcelični oksidativni stres

Toksičnost nanomaterialov je odvisna od velikosti, oblike in kemične sestave ND. Poglavitni mehanizem toksičnosti ND naj bi bilo znotrajcelično nastajanje ROS. Tvorba ROS lahko povzroči oksidativni stres, vnetne procese in posledično poškodbe proteinov, membrane in DNK. Ugotovljeno in dokazano je, da ND sprožijo oksidativni stres v celicah, ki so jim bile izpostavljene [1, 17, 49], kar je v skladu z našimi rezultati. Ugotovili smo, da je obseg znotrajcelične tvorbe ROS po 3 mesečni izpostavitvi ND ZnO pri koncentraciji 0,5 in 5 µg/mL zelo podobna kot pri kontroli, pri koncentraciji 10 µg/mL pa je za več kot 40 % večja v primerjavi s kontrolo (Slika 23). Torej ND ZnO povzročajo

povečano tvorbo ROS že pri koncentraciji 5 µg/mL, signifikantno povečana tvorba ROS pa nastopi pri najvišji preiskovani koncentraciji.



Slika 23: Vsebnost ROS v keratinocitih po izpostavitvi 20-im odmerkom ND ZnO v odvisnosti od koncentracije.

Oksidativni stres, kot posledica izpostavitve ND, so dokazali tudi v drugih študijah. V raziskavi toksičnost delcev ZnO z velikostjo 165 nm za človeške epidermalne celice A431 so raziskovalci s štirimi različnimi testi dokazali, da ND ZnO povzročajo oksidativni stres. Lipidno peroksidacijo so dokazali z merjenjem koncentracije vodikovega peroksida, katerega koncentracija je močno narastla že pri koncentraciji ND ZnO 0,008 μ g/mL. Ugotovili so, da ND ZnO močno vplivajo na zmanjšanje koncentracije GSH, da zmanjšajo katalizno aktivnost in da se aktivnost superoksidne dismutaze (SOD) signifikantno zmanjša tudi pri koncentraciji ND ZnO 0,008 μ g/mL po 24 h [1]. Vendar pa mehanizem tvorbe ROS, ki jo povzročijo ND, in toksičnosti ND ZnO še vedno ni popolnoma raziskan. Nekateri raziskovalci trdijo, da je toksičnost ND ZnO posledica delne topnosti le-tega v vodnem mediju, torej prisotnosti Zn²⁺ ionov [42]. Posledično pride do porušenja homeostaze Zn v celici, kar vodi v poškodbo lizosomov in mitohondrijev ter v končni fazi povzroči celično smrt. Spet v drugih študijah o toksičnosti ND ZnO pa so prepričani, da sproščanje Zn²⁺ ni glavni vzrok toksičnosti ND ZnO, zaradi zelo nizke vrednosti disociacijske konstante ZnO [49].

5. SKLEP

V raziskavi smo ugotovili, da je optimalna metoda izdelave disperzije ND ZnO 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 ~ 250 nm, kar kaže, da se večina ND v disperziji nahaja v obliki agregatov, ki so ~ 3-krat večji od deklarirane velikosti, ki jo navaja proizvajalec ND.

V študiji ugotavljanja kratkotrajnih (do 72 h) učinkov ND ZnO smo ugotovili, da čas izpostavitve ND nima signifikantnega vpliva na preživetje celic pri isti koncentraciji ND ZnO in da so koncentracije ND ZnO nad 10 µg/mL citotoksične. Z naraščajočo koncentracijo ND v kulturi se je število celic zmanjševalo in celice so imele spremenjeno morfologijo. Prav tako se je pri koncentracijah nad 10 µg/mL zmanjšala mitohondrijska aktivnost celic. Torej so koncentracije ND ZnO do 10 µg/mL varne in ne povzročajo akutne toksičnsoti v času 72 h, medtem ko povzročajo koncentracije nad to mejo signifikanto zmanjšanje preživetja in spremembe v morfologiji keratinocitov.

Za študij dolgoročnih učinkov smo izbrali tri različne koncentracije ND (0,5, 5 in 10 μ g/mL), ki so se v kratkotrajnih poskusih izkazale za "varne". Ugotovili smo, da ND ZnO pri koncentraciji 0,5 μ g/mL in trimesečni izpostavitvi niso citotoksični in ne povzročajo signifikantnih razlik v morfologiji celic ter ne sprožijo znatno povečane celične smrti. Pri koncentraciji 5 μ g/mL in trimesečni izpostavitvi povzročijo ND ZnO zmanjšanje števila celic, spremembe v obliki celic in njihovih jeder, ter povečajo metabolno aktivnost keratinocitov. Pri najvišji preiskovani koncentraciji (10 μ g/mL) pa so ND ZnO povzročili signifikantne spremembe pri vseh izvedenih testih. Preživetje celic je bilo minimalno, spremenjena je bila morfologija celic in njihovih jeder, celice so bile nepovezane med seboj, ugotovili smo povečano nastajanje ROS v celicah in analiza celičnega cikla je pokazala povečano število apoptotičnih celic. Torej so ND ZnO pri dolgotrajni uporabi citotoksični že pri koncentraciji 5 μ g/mL in več.

Potrdili smo tudi vstop ND ZnO v celice, kjer se nahajajo v obliki agregatov predvsem v endosomih celic. Nadalje smo ugotovili, da ND ZnO 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.

Metoda	Opazovani	Kratek čas	Daljši čas
	parameter	izpostavitve	izpostavitve
	Oblika celic	Z naraščanjem	Prisotnost kroglastih
Invertni		koncentracije se	celic.
mikroskop		povečuje število bolj	
		kroglastih celic.	
		Se manjša z	Se močno zmanjša pri
	Število celic	naraščajočo	koncentraciji 5 µg/mL
		koncentracijo	ali večji.
		(> 10 μg/mL).	
	Pritrjenost celic	Z naraščanjem	Slabo pritrjene
		koncentracije se	
		povečuje število	
		nepritrjenih celic.	
	Oblika jeder,	Pri višjih	Pri višjih
Fluorescenčna	aktinskih	koncentracijah slabše	koncentracijah slabo
mikroskopija	filamentov	povezane celice, manj	povezane celice, slabo
		vidni aktinski	vidni aktinski
		filamenti.	filamenti, spremenjena
			oblika jeder.
	Mitohondrijska	/	Narašča z naraščajočo
	aktivnost		koncentracijo.
MTS test	Metabolna	Pri koncentracijah > 10	Pri koncentraciji 10
	aktivnost	μg/mL močno pade	µg/mL močno pade.
	Površinska		Povečano število
SEM	morfologija	/	nanotubularnih
			struktur.
			Da, ND v endosomih.
ТЕМ	Privzem v celice	/	
Fluorescenčna			Se močno poveča pri
metoda	Tvorba ROS	/	koncentraciji 10 µg/mL
Pretočna	Spremembe v		Pri koncentracijah 5 in
citometrija	celičnem ciklu	/	10 μg/mL se poveča
			število apoptotičnih
			celic

Preglednica V: Povzetek rezultatov naše raziskave.

LITERATURA

 (1) Vyom S, Ritesh K. S, Neha S, Devendra P, Mukul D, Alok D: DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. Toxicology Letters, 2009: 211-8.

(2) Remškar M: nanodelci in nevarnost. Ministrstvo za zdravje, Urad RS za kemikalije, Ljubljana, 2009.

(3) Marty JP, Sanner T, J van Engelen, White IR; Opinion on safety of nanomaterials in cosmetic products. Scietific committe on Consumer Products, 2007

(4) SCENIHR: Opinion on the Appropriateness of the Risk Assessment Methodology in Accordance with the Technical Guidance Documents for New and Existing Substances for Assessing the Risks of Nanomaterials, (dostopano: 6. 9. 2010)

Dostopno na naslovu: http://files.nanobio-raise.org/Downloads/scenihr.pdf

(5) Čebulj M: Posebne lastnosti nanodelcev, Fakulteta za matematiko in fiziko, univerza v Ljubljani, 2007.

(6) Navodnik J; Slovenija je ustvarjena za nanotehnologijo: Izdelki in tehnologije prihodnosti. Navodnik, Celje, 2007.

(7) Limbach LK, Li Y: Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblast: Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations. Environ. Sci. Technol., 2005; 39: 9370–9376.

(8) Mirković B, Lah Turnšek T, Kosl J: Nanotehnologija pri zdravljenju raka. Zdravstveni Vestnik 2010; 79: 146–155.

(9) Vega-Villa Karina R, Takemoto Jody K, Clinical toxicities of nanocarrier systems, Advanced Drud Delivery Reviews, 2008, 60: 929-38.

(10) Nel A, Xia T, Madler L, Li N: Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. Science, 2006; Vol. 311: 622 – 627.

(11) Švelc T: Vpliv sestave nanodelcev na preživetje in funkcijo celic. Diplomska naloga.Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2006.

(12) Inohara S, Tatsumi Y, Cho H, Tanaka Y, Sagami S: Acctin filament and desmosome formation in cultured human keratinocytes. Arch Dermatol Res., 1990; 282: 210-12.

(13) Borm PJA, Schins RPF: Nanoparticle technology for drug delivery. Toxicological Characterization of Engineered Nanoparticles. ZDA, 2006; 159: 161-88.

(14) Cross SE, Roberts MS, Tsuzuki T, Robertson TA, McCormick P: Human skin penetration: In-vitro Asseeement of a Novel Micronized Zinc Oxide Formulation. Skin Pharmacology and Physiology, 2007.

(15) Pirot F, Panisset F, Agache P, Humbert P: Simultaneous study of percutaneous a absorption of cooper and zinc through human skin in vitro. Skin Pharmacol, 1996; 9: 43-52.

(16) Cassae FR, Muijser H, Duistermaat E, Freijer JJ, Geerse KB, Marijnissen JC, Arts JH: Particle size-dependent total mass deposition in lungs determines inhalation toxicity of cadmiumchloride aerodols in rats. Arch. Toxicol., 2002; 76: 277-286.

(17) Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z: Comparative study of cytotoxicity. Oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of partzicle size, shape and composition. J. Appl. Toxicol., 2009; 29: 69-78.

(18) Jones CF, Grainger DW: In Vitro assessments of nanomaterial toxicity. Advenced Drug Delivery Reviews, 2009; 61: 438-56.

(19) Fubini B, Hubbard A; Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species(RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. Free Radical Biol. Med. 34, 2003: 1507-1515.

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

(21) 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.

(22) Hussain SM.: In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. Toxicology in Vitro, Vol. 19, 2005; 7: 975-83.

(23) 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.

(24) Tian B: Cytotoxicity of single-wall carbon nanotubes on human fibroblasts. Toxicol. Vitro., 2006; 20: 1202–1212.

(25) Magrez A: Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. Nano Lett., 2006; 6: 1121–1125.

(26) Jones CF, Grainger DW: In Vitro assessments of nanomaterial toxicity. Advenced Drug Delivery Reviews, 2009; 438 – 456.

(27) Kim DH: Response of monocytes exposed to phagocytosable particles and discs of comparable surface roughness. Biomaterials 28, 2007: 4231–4239.

(28) (online) The most flexible way to multiplex with beads. BD[™] Cytometric Bead Array System 2007 (dostopano 20. 5. 2010);

Dostopno na naslovu: http://www.softflow.hu/Kereskedelem/XEUR1178-02%20-%20CBA%20brochure.pdf.

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

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

(31) Wilson MR: Interactions between ultrafine particles and transition metals in vivo and in vitro. Toxicol. Appl. Pharmacol., 2002; 184: 172–179.

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

(33) Lorenz MR: Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. Biomaterials 2006; 27: 2820–2828.

(34) 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.

(35) Dufour EK, Kumaravel T, Nohyneka GJ, Kirkland D, Clastogenicity, photo-

clastogenicity or pseudo-photo-clastogenicity: Genotoxic effects of zinc oxide in the dark, in pre-irradiated or simultaneously irradiated Chinese hamster ovary cells. Mutation Research, 2006; 607: 215-24.

(36) Tapiero H, Tew KD: Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. Biomedicine 6 Pharmacotherapy, 2003; 57: 399-42.

(37) O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE, Obenchain Jr. JR, Gallipeau JAR, D'Arecca MA: The Merck index, 13. Izdaja, Merck & Co., NJ, 2001; 1811.

(38) Block JH, Roche EB, Soine TO, Wison CO: Inorganic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry. Lea & Febiger, Philadellphia, 1974.

(39) Brenčič F, Lazarini JV: Splošna in anorganska kemija. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1992: 511.

(40) ATSDR Toxicological Profile for Zinc. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005. (41) Franklin N, Rogers N, Apte S: Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl2 to a Freshwater Microalga (Pseudokirchneriella subcapitata): The Importance of Particle Solubility. Environ Sci Technol, 2007; 41: 8484-90.

(42) Heinlaan M, Ivask A, Blinova I, Dubourguier HC, Kahru A: Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO2 to bacteria Vibrio fischeri and crustaceans Daphnia magna and Thamnocephalus platyurus. ScienceDirect 2008; 7: 1308-1316.

(43) Wang B, Feng W, Wang M, Wang ET, Gu Y, Zhu M, Ouyang H: Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. J Nanopart Res, 2008; 10: 263–276.

(44) EU Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the environment, opinion on the results of the risk assessment of zinc metal, zinc chloride, zinc sulphate, zinc distearate, zinc phosphate and zinc oxide, adopted by the CSTEE during the 39th Plenary Meeting of 10 September 2003 (C7/GF/csteeop/zincs/100903 D(03)), (dostopano 20. 6. 2010) Dostopno na naslovu: http://ec.europa.eu/food/fs/sc/sct/out197 en.pdf.

(45) The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products intended for consumers, The SCCNFP'S notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation (5th revision), adopted by the SCCNFP during the 25th Plenary Meeting of 20 October 2003 (SCCNFP/0690/03), (dostopano: 20. 6. 2010)

Dostopno na naslovu: http://ec.europa.eu/health/phrisk/committees/sccp/documents/out242 en.pdf.

(46) Xia T, Kovochich M, Liong M, Madler L, Gilbert B, Shi H, Yeh JI, Zink JI, Nel AE;
Comparison of the Mechanism of Toxicity of Zinc Oxide and Cerium Oxide Nanoparticles
Based on Dissolution and Oxidative Stress Properties. ACS Nano, 2008; 2 (10): 2121–2134.

(47) Frazzini V, Rockabrand E; Mocchegiani E; Sensi SL; Oxidative Stress and Brain Aging: Is Zinc the Link. Biogerontology, 2006, 7: 307–314.

(48) Wisheng L, Yi Xu, Chin-Huang C, Toxicity of nano- and micro-sized ZnO particles in human lung epithelial cells, J Nanopart Res, 2009; 11: 25-39.

(49) Jones N, Ray B, Ranjit KT, Manna AC; Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms. FEMS Microbiol Lett, 2008.

(50) Banoee M, Seif S, Nazari ZE, Jafari-Fesharaki P, Shahverdi HR, Moballegh A, Moghaddam KM, Shahverdi AR; ZnO nanoparticles enhanced antibacterial activity of ciprofloxacin against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Wiley Periodicals, Inc. J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater, 2010.

(51) Nair S, Sasidharan A, Divya Rani VV, Menon D, Nair S, Manzoor K, Raina S: Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. J Mater Sci: Mater Med, 2008; 20: 235-41.

(52) Rasmussen JW, Martinez E, Louka P, Wingett D: Zinc Oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. Expert Opin. Drug Deliv., 2010; 7(9): 1063-77.

(53) Ultarfine Zinc Oxide (ZnO), Sumitomo-Osaka Co. Ltd., Advanced materials division sales group, Japan.

(54) González S, Fernández-Lorente M, Gilaberte-Calzada Y; The latest on skin photoprotection. Clinics in Dermatology, 2008.

(55) Bens G; Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer. Landes Bioscience in Springer Science, 2008; 12: 137-161.

(56) Epstein JH, Wang SQ: Understanding UVA and UAB, Skin Cancer Fundation.

(57) Pinnell SR, Fairhurst D, Gillies R, et al. Microfine zinc oxide is a superior sunscreen ingredient to microfine titanium oxide. Dermatol Surg, 2000; 26: 309-16.

(58) Formularicum Slovenicum; druga izdaja, Ljubljana, 2005: 57.

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

(60) (online), Metode in tehnike, ki jih biologi uporbljajo pri svojem delu, (dostopano: 13.3.2010).

(61) Technical Bulletin: CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Instructions for use of products G3580, G3581 and G3582, Promega corporation, ZDA, 2007.

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

(63) Banazak Holl NM: Nanotoxicology: a personal Perspective. WIREs Nanomed Nanobiotechnol, 2009.

(64) Zhang L, Jiang Y, Ding Y; Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids). Journal of Nanoparticle Research, 2007.

(65) Brezovar T: Optimiranje izdelave disperzije nanodelcev TiO2 in ugotavljanje varnosti na celični liniji keratinocitov. Diplomska naloga. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2010.

(66) Vidulescu C, Clejan S, O'Connor KC: Vesicle traffic through intercellular bridges in DU 145 human prostate cancer cells. J. Cell. Mol. Med.8, 2004: 388-396.

(67) Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH; nanotubular highways for intercellular organelle transport. Science, 2004; 303: 1007-10.