

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA MARUŠIČ

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM
KOZMETOLOGIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIKA MARUŠIČ

**UGOTAVLJANJE GENOTOKSIČNOSTI NANODELCEV
CINKOVEGA OKSIDA S KOMETNIM IN
MIKROJEDRNIM TESTOM NA CELIČNI LINIJI MDCK**

**ASSESSMENT OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES
GENOTOXICITY ON MDCK CELL LINE WITH
COMET AND MICRONUCLEUS ASSAY**

SCIENCE OF COSMETOLOGY

Ljubljana, 2014

Diplomsko naložbo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, na različnih fakultetah: Fakulteti za farmacijo, eksperimentalni del diplomske naloge pa sem izvedla na Biotehniški fakulteti pod mentorstvom prof. Marije Sollner Dolenc in somentorstvom prof. Damjane Drobne. Analizo nanodelcev in mikrodelcev ZnO so opravili na Institutu Jožef Stefan. Program Komet so izdelali na Fakulteti za računalništvo in informatiko, Univerza v Ljubljani.

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. Mariji Sollner Dolenc za priložnost izdelave diplomske naloge pod njenim mentorstvom, vse strokovne nasvete, spodbudo, pomoč pri celotnem poteku izdelave diplomske naloge in izredno dostopnost. Zahvaljujem se tudi somentorici prof. Damjani Drobne za priložnost sodelovanja s skupino Bionanoteam, izvedbe eksperimentalnega dela diplomske naloge, uresničitev želje po delu v celičnem laboratoriju in vse pridobljene izkušnje. Iskrena hvala tudi mlademu raziskovalcu Venu Kononenku za uvedbo v delo v celičnem laboratoriju, vse nasvete, pomoč pri izvedbi določenih metod, za strokovne diskusije glede protokolov in mehanizmov ter za natančen pregled diplomske naloge. Zahvalila pa bi se še fantu Ladu Otrinu za navdušitev nad raziskovalnim delom in pomoč pri odkritju mojega velikega užitka v delu v laboratoriju, vso podporo, spodbudo za razmišljanje na vseh področjih ter stanje ob strani tudi v najbolj črnih dneh.

Izjava

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

Študentov lastnoročni podpis

KAZALO VSEBINE

1	POVZETEK	3
2	SEZNAM OKRAJŠAV	5
3	UVOD.....	6
3.1	NANODELCI	6
3.1.1	Nanodelci ZnO	7
3.2	OKSIDATIVNI STRES IN GENOTOKSIČNOST NANODELCEV	9
3.2.1	Citotoksičnost, oksidativni stres in genotoksičnost nanodelcev ZnO	10
3.3	METODE ZA PREUČEVANJE TOKSIČNOSTI NANODELCEV: UPORABLJENE METODE.....	13
3.3.1	Testi citotoksičnosti.....	13
3.3.2	Testi za meritve oksidativnega stresa	14
3.3.3	Testi genotoksičnosti	15
3.4	CELICE MDCK	17
4	NAMENI DELA IN DELOVNE HIPOTEZE	18
5	MATERIALI IN METODE	19
5.1	KARAKTERIZACIJA NANODELCEV IN MIKRODELCEV ZnO.....	19
5.2	GOJENJE CELIC MDCK	20
5.3	TESTI CITOTOKSIČNOSTI	21
5.3.1	Test MTT	22
5.3.2	Test z nevtralno rdečim	22
5.4	TESTI ZA MERITVE OKSIDATIVNEGA STRESA.....	22
5.4.1	Test s H ₂ DCFDA	22
5.4.2	Merjenje aktivnosti encimov	24
5.5	TESTI GENOTOKSIČNOSTI	27
5.5.1	Kometni test.....	27
5.5.2	Mikrojedrni test	29
6	REZULTATI IN RAZPRAVA	31
6.1	CITOTOKSIČNOST NANODELCEV ZnO.....	31
6.1.1	Metabolna aktivnost	31
6.1.2	Stabilnost lizosomov	32
6.2	OKSIDATIVNI STRES POVZROČEN Z NANODELCI ZnO	33
6.2.1	Rezultati testa s H ₂ DCFDA brez celic.....	33
6.2.2	Rezultati testa s H ₂ DCFDA s celicami	35
6.2.3	Rezultati merjenja aktivnosti GST	36
6.2.4	Rezultati merjenja aktivnosti CAT	37
6.3	GENOTOKSIČNOST NANODELCEV ZnO	38
6.3.1	Rezultati kometnega testa	38
6.3.2	Rezultati mikrojedrnega testa	42
7	SKLEPI.....	46
	LITERATURA	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Karakterizacija nanodelcev in mikrodelcev ZnO	20
Preglednica II: Sestava reagenta za GST.....	26
Preglednica III: Sestava raztopine za alkalno lizo in elektroforeznega pufra	29

KAZALO SLIK

Slika 1: Mehanizmi genotoksičnosti nanodelcev	9
Slika 2: Mehanizmi toksičnega delovanja nanodelcev ZnO	11
Slika 3: Celice MDCK.....	21
Slika 4: Umeritvena krivulja BSA.....	26
Slika 5: Rezultati testa MTT.....	31
Slika 6: Rezultati testa z nevtralno rdečim	33
Slika 7: Rezultati testa s H ₂ DCFDA brez celic	34
Slika 8: Rezultati testa s H ₂ DCFDA.....	35
Slika 9: Rezultati merjenja aktivnosti GST	37
Slika 10: Rezultati merjenja aktivnosti CAT.....	38
Slika 11: Rezultati kometnega testa.....	39
Slika 12: Rezultati mikrojedrnega testa.....	43

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Karakterizacija nanodelcev in mikrodelcev ZnO.
- Priloga B: Absorbanca nanodelcev ZnO.
- Priloga C: Sestava medija za gojenje celične linije MDCK.
- Priloga D: Postopek priprave suspenzije nanodelcev in mikrodelcev ZnO.
- Priloga E: MTT test: Slike celic MDCK tretiranih z nanodelci in mikrodelci ZnO.
- Priloga F: Rezultati dodatnih meritev za test s H₂DCFDA.
- Priloga G: Kometni test: Slike kometov kontrolnih celic in celic tretiranih z MMS.
- Priloga H: Rezultati mikrojedrnega testa in slike pobarvanih celic.

1 POVZETEK

Nanodelci cinkovega oksida (ZnO) se uporabljajo v kozmetičnih izdelkih za zaščito pred UV spektrom sončne svetlobe. Nanodelci ZnO po vstopu v telo skozi kožo (predvsem pri poškodbah in pri znižani obrambni sposobnosti kože) potujejo in zastajajo predvsem v krvi, pljučih, ledvicah, vranici, trebušni slinavki ali ostalih organih ter kosteh. Ker nanodelci lahko potujejo v ledvice in se tam tudi kopičijo, nas je zanimalo, če lahko v ledvičnih celicah povzročijo oksidativni stres ter poškodbe DNA in kromosomov. Za nanodelce ZnO do sedaj še ni bilo narejenih genotoksičnih študij na celicah MDCK. Zanimalo nas je tudi, če je razlog za toksičnost delcev ZnO njihova velikost ($< 100 nm$) – v izbranih testih smo primerjali učinek nanodelcev in mikrodelcev ZnO .

Nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) je eden od primarnih mehanizmov toksičnosti nanodelcev. Povzročijo lahko oksidativni stres, vnetje ter posledično poškodbe proteinov, membran in DNA. V naši raziskavi smo ugotavliali, ali pride do povečanja ravni ROS in do spremembe aktivnosti encimov, ki imajo antioksidativno delovanje (GST, CAT).

Celice MDCK smo 24 ur tretirali z različnimi koncentracijami nanodelcev ZnO ter ugotavliali, ali je prišlo do citotoksičnosti, oksidativnega stresa ter genotoksičnosti. Za določitev citotoksične koncentracije nanodelcev ZnO smo uporabili test s tetrazolijevim soljem (MTT) in test z nevtralno rdečim. Za oceno oksidativnega stresa smo uporabili test s H_2DCFDA in spremljali aktivnost encimov (GST in CAT). Potencialno genotoksičnost pa smo določali s kometnim in mikrojedrnim testom. Test s H_2DCFDA , kometni in mikrojedrni test je bil potrebno predhodno prilagoditi za celično linijo MDCK.

Rezultati so pokazali, da so nanodelci ZnO zmanjšali delovanje mitohondrijev in stabilnost lisosomov, povzročili povečanje ravni ROS, zmanjšali aktivnost GSH in CAT ter povzročili poškodbe DNA in kromosomov. Nad koncentracijo $10 \mu g/mL$ nanodelcev ZnO je prišlo do statistično značilnega zmanjšanja živih celic, zmanjšanja aktivnosti encimov in povečanja števila mikrojeder. Do statistično značilnega povečanja ravni ROS in povečanja poškodb DNA pa je prišlo pri vseh uporabljenih koncentracijah nanodelcev ZnO - 1, 5, 10 $\mu g/mL$. Mikrodelci ZnO so povzročili citotoksičnost pri isti koncentraciji kot nanodelci ZnO , prišlo je tudi do statistično značilnega povečanja ROS, niso pa povzročili poškodb DNA in kromosomov. Dobljeni rezultati nakazujejo na to, da imajo delci enake kemijske sestave a različne velikosti, različne biološke učinke.

Ključne besede: nanodelci ZnO , citotoksičnost, oksidativni stres, genotoksičnost, kometni test, mikrojedrni test, celice MDCK

ABSTRACT

Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) are used in cosmetics in sunscreen products as UV filter. After system exposure to ZnO NPs, they distribute and accumulate in blood, lungs, kidneys, spleen, pancreas and other organs and bones. Because NPs distribute to kidneys and accumulate there, we wanted to know if they cause oxidative stress as well as DNA and chromosomal damage. There were no genotoxicity studies yet made for ZnO NPs on MDCK cells. We were also investigating if the cause of particle toxicity is in their size (< 100 nm) – we have compared ZnO NPs and ZnO microparticles.

ROS production is one of the main primary mechanisms for NPs toxicity. It can cause oxidative stress, inflammation and consequently protein, membrane and DNA damage. In our study we investigate whether or not NPs increase the ROS levels and alter the activity of antioxidative enzymes (GST, CAT).

We treated MDCK cells for 24 hours with different concentrations of ZnO NPs and were observing if it came to cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity. In order to pinpoint the cytotoxic concentrations of ZnO NPs, we have performed MTT and Neutral red assay. For assessment of oxidative stress we used H₂DCFDA assay and measured enzymes activity (CAT, GST). We have determined the potential genotoxicity with Comet and Micronucleus assay. We had to pre-adapt H₂DCFDA assay, Comet assay and Micronucleus assay for MDCK cell line.

Results show that ZnO NPs lower mitochondrial activity and lysosomal stability, cause an increase in ROS levels, lower GSH and CAT activity and cause DNA and chromosomal damage. Above the concentration of 10 µg/mL of ZnO NPs, the amount of viable cells has been statistically significantly lowered, enzymes activity lowered and number of micronuclei increased. All tested concentrations of ZnO NPs, i.e. 1, 5 and 10 µg/mL have significantly increased ROS levels and DNA damage as observed in our experiments. ZnO microparticles caused similar cytotoxicity as ZnO NPs, ROS levels were statistically significantly increased as well, but they didn't cause DNA and chromosomal damage. The obtained results indicate that particles with the same chemical composition but different size have different biological effects.

Key words: ZnO nanoparticles, cytotoxicity, oxidative stress, genotoxicity, Comet assay, Micronucleus assay, MDCK cells

2 SEZNAM OKRAJŠAV

- AFM – mikroskopija na atomsko silo (ang. *Atomic force microscopy*)
BSA – goveji serumski albumin (ang. *bovine serum albumin*)
CAT – encim katalaza (ang. *catalase*)
cytob – citohalazin (ang. *cytochalasin B*): C₂₉H₃₇NO₅
dH₂O – deionizirana H₂O
DLS – dinamično sipanje svetlobe (ang. *Dynamic Light Scattering*)
DMSO – dimetil sulfoksid (ang. *dimethyl sulphoxide*)
EtBr – etidijev bromid (ang. *ethidium bromide*; 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide): C₂₁H₂₀BrN₃
FADU – fluorimetrična analiza odvijanja DNA (ang. *Fluorometric analysis of DNA unwinding*)
FBS – serum govejega zarodka (ang. *Fetal Bovine Serum*)
GST – encim glutation-S-transferaza (ang. *glutathione-S-transferase*)
H₂DCFDA – 2',7'-diklorodihidrofluorescein acetat (ang. *dichlorodihydrofluorescein diacetate*)
Hoechst 33258 – (ang. 2'-(4-hydroxyphenyl)-5-(4-methyl-1-piperazinyl)-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride hydrate, bisbenzimide H 33258): C₂₅H₂₄N₆O · 3HCl · xH₂O
K⁻ – negativna kontrola
K⁺ – pozitivna kontrola
LMP – nizka temperatura tališča (ang. *low melting point*)
MDCK – pasje ledvične celice (ang. *Madin-Darby Canine Kidney cells*)
MMS – metil metansulfonat (ang. *methyl methanesulfonate*)
MTT – 3-(4-5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid (ang. 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)
NMP – normalna temperatura tališča (ang. *normal melting point*)
ND – nanodelci
PI – propidijev jodid (ang. propidium iodide; 3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridinium diiodide): C₂₇H₃₄I₂N₄
ROS – reaktivne kisikove zvrsti (ang. *Reactive Oxygen Species*)
SCCS – ang. *Scientific Committee on Consumer Safety*
STXM – vrstična transmisija rentgenska mikroskopija (ang. *Scanning Transmission X-ray Microscopy*)
TEM – presevna elektronska mikroskopija (ang. *Transmission Electron Microscopy*)

3 UVOD

V zadnjem desetletju je nanotehnologija z raziskavami in izdelavo vedno večjega števila novih materialov nanometrskih velikosti postala nepogrešljiv del tako našega vsakdanjega življenja kot tudi kozmetične in farmacevtske industrije ter medicinske stroke. Za kozmetično industrijo so zanimivi predvsem nanomateriali, ki delujejo kot nosilni sistemi za kozmetično aktivne sestavine (vitamine, antioksidante), kozmetične sestavine nanometrskih velikosti na osnovi mineralov (TiO_2 , ZnO), ki jih uporabljajo kot UV filtre ter ostali materiali nanometrskih velikosti (fulereni).

3.1 NANODELCI

Nanodelci (ND) so delci, ki imajo eno ali več dimenzijs v območju do 100 nm (1). Razmerje med površino in volumnom delcev se veča z manjšanjem premera delca, zaradi česar so ND bolj (bio)reaktivni kot delci večjih dimenzijs. Ekstremna majhnost ND poveča možnost njihovega privzema v celice in interakcije z biološkimi molekulami in tkivom. Z manjšanjem velikosti se lahko lastnosti delcev drastično spremenijo – spremeni se npr. električna prevodnost, magnetne lastnosti, trdnost, aktivna površina, kemijska reaktivnost in biološka reaktivnost (2).

Kozmetični izdelki z ND ne predstavljajo tveganja le zaradi penetracije skozi kožo, temveč tudi zaradi izpostavitve ND preko drugih vstopnih točk, kot so dihala in prebavila. Izpostavitve preko različnih vstopnih točk lahko povzročijo različne učinke (3, 4).

Površinske lastnosti ND, vključno s kemijsko sestavo in nabojem, so pomembni dejavniki pri genotoksičnosti ND. Različna kemijska sestava površine ND povzroči različno obnašanje ND v suspenziji. Površinski nabolj pa določa, če so ND dispergirani v mediju ali če tvorijo aggregate. Močno aglomerirani ND ne morejo vstopiti v celično jedro in mitohondrije, medtem ko se lahko ND, ki ne aglomerirajo, porazdelijo po celotni celici (5, 6). ND so lahko v mediju dispergirani ali pa težijo k tvorbi aglomeratov/agregatov, odvisno od njihovega površinskega naboja (hidrofilen ali hidrofoben) in interakcij z medijem (pH medija, ionska jakost, vsebnost proteinov, idr.). Primarni ND se medsebojno povezujejo s kemijskimi vezmi in tako tvorijo aggregate. Jassby D (7) je pokazal, da je z agregacijo ND ZnO ovirana njihova zmožnost tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Agregati se nato še naprej združujejo s pomočjo Van der Walsovih privlačnih sil in tako

tvorijo aglomerate, ki dosegajo mikrometerske velikosti (8), s čimer se relativno zmanjša delež atomov na površini delcev (9), poleg tega pa so nastali skupki pod vplivom gravitacije nagnjeni k sedimentaciji (10). Aglomerirane ND lahko soniciramo (z uporabo ultrazvoka), s čimer skupke razbijemo na posamezne ND (11). Zaradi aglomeracije/agregacije so spremenjene fizikalno-kemijske lastnosti ND, kot so površinski naboj, velikost, porazdelitev velikosti, razmerje med površino in volumnom in reaktivnost površine ND, kar vpliva na biološko razpoložljivost in toksikološke odzive.

Študije varnosti uporabe ND se posvečajo predvsem njihovi citotoksičnosti. Te študije pa spregledajo celične spremembe, do katerih pride pri nižjih koncentracijah ND, katere ne povzročijo celične smrti, ampak lahko pripomorejo k tveganju za zdravje človeka. Najpomembnejše celične spremembe so poškodbe DNA, ker lahko vodijo k mutacijam in razvoju raka (12). S kometnim in mikrojedrnim testom je bilo v mnogih študijah že dokazano, da so oksidativne poškodbe DNA bistvene pri genotoksičnemu učinku ND (13).

3.1.1 Nanodelci ZnO

ND ZnO so med najbolj uporabljenimi ND (14, 15), zato je izpostavitev le-tem zelo pogosta. Veljajo za ene najbolj toksičnih ND, z najnižjo vrednostjo LD50 med industrijsko izdelanimi ND kovinskih oksidov (1). ND ZnO je bila dokazana toksičnost na človeških in drugih sesalčjih celičnih linijah ter pri talnih in vodnih organizmih, vendar mehanizem toksičnosti še ni popolnoma znan (16). Predvideva pa se, da pride do toksičnega učinka zaradi nastajanja ROS. Do nastajanja ROS v celicah tretiranih z ND ZnO prihaja ob odsotnosti in prisotnosti UV sevanja, le da ob slednjem prihaja do nastajanja ROS v še večji količini (17).

Uporaba nanodelcev ZnO

ND ZnO se uporabljam kot anorganski blokatorji UV žarkov v kozmetičnih izdelki, kot pigmenti v premazih (UV zaščita, fungicidi in barve) in kot katalizatorji. V kozmetičnih izdelkih za zaščito pred soncem se jih pogosto uporablja skupaj z ND TiO₂, ki so bolj učinkoviti v UVB (290-320 nm) območju, medtem ko so ND ZnO bolj učinkoviti v UVA (320-400 nm) območju (17). Prednost ND pred mikrodelci je v njihovi transparentnosti (mikrodelci so neprosojni, dajejo motnost kozmetičnemu izdelku in belo barvo kože po nanosu).

Čistost ND ZnO za uporabo v kozmetičnih izdelkih za zaščito pred soncem kot UV filter mora biti nad 96 %, nečistoči sta lahko le voda in ogljikov dioksid, medtem ko je ostalih nečistoč lahko skupaj le 1 % (18). Imeti morajo kristalno strukturo in fizikalni izgled skupkov, ki so paličastih, zvezdastih in/ali izometričnih oblik (18). Srednji premer (D50: 50 % vrednosti pod tem premerom) porazdelitve velikosti delcev morajo imeti nad 30 nm in D1 (1 % nad to velikostjo) nad 20 nm (18). Topnost pa mora biti pod 50 mg/L (18). ND ZnO z omenjenimi lastnostmi so varni za uporabo v kozmetičnih izdelkih za zaščito pred soncem kot UV filter do koncentracije 25 % (18).

ND ZnO, ki se uporabljajo v izdelkih za zaščito pred soncem so lahko brez obloge ali pa imajo oblogo – trietoksikaprililsilan, dimetikon, dimetoskidifenilsilantrietoksikaprililsilan cross-polimer in oktil trietoski silan (18). Ostale kozmetične sestavine se lahko uporabljajo kot obloge ND v primeru, če so potrjene s strani *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS) kot varne in ne vplivajo na lastnosti delcev (18).

Formulacija in obloga nanodelcev ZnO

Pri izdelavi kozmetičnih izdelkov za zaščito pred soncem z ND ZnO je pomemben tip obloge ND in način formulacije v izdelek. Ob upoštevanju teh dveh parametrov in njuni pravilni izbiri se lahko izognemo tveganju za neželene učinke, ki je prisotno zaradi uporabe ND. Možni neželeni učinki so povezani z vstopom ND v sistemski krvni obtok in kopičenje v organih, ugotovili so oksidativni stres v keratinocitih ter privzem ND z makrofagi in posledično nastajanje ROS, idr. Fotoaktivnost ND povzroči fotokatalitične redoks reakcije na površini ND in s tem razgradnjo organskih sestavin zaradi nastalih ROS (19). Z oblogo lahko preprečimo omenjene reakcije na površini nanodelca, poleg tega pa je z oblogo nanodelec izoliran od kože in nosilnega sistema; s tem so zmanjšane interakcije med nanodelcem in kožo.

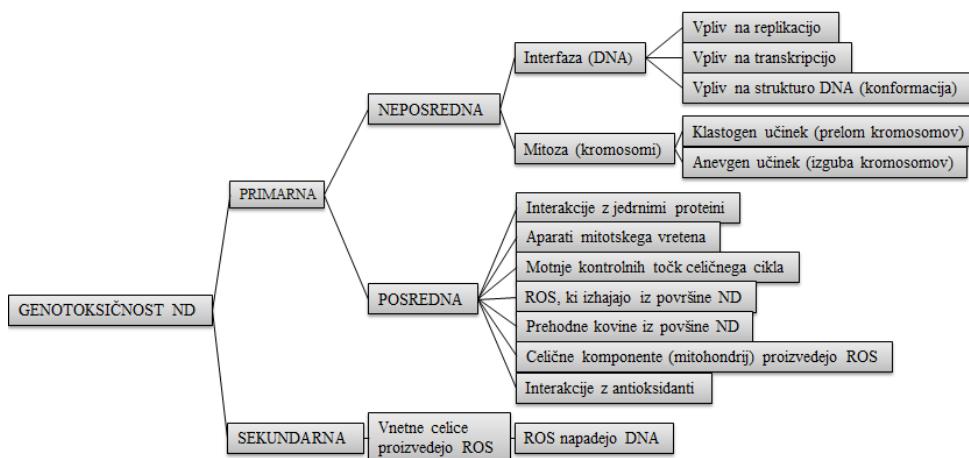
Ustrezni nosilni sistemi morajo preprečevati agregacijo ND, povečevati fotostabilnost kozmetičnega izdelka in povečevati njegovo učinkovitost, hkrati pa ne smejo povečevati dermalne permeabilnosti. Za fizikalne UV filtre v kozmetičnih izdelkih za zaščito pred soncem se kot nosilni sistem uporablja trdne lipidne nanodelce (SLN), nanostrukturirane lipidne nosilce (NLC) in mikrospužve dostavne sisteme (sestavljen iz medsebojno povezanih polimernih poroznih mikrokroglic) (20, 21).

3.2 OKSIDATIVNI STRES IN GENOTOKSIČNOST NANODELCEV

Osnovni mehanizmi toksičnosti ND so oksidativni stres, vnetje, imunotoksičnost in genotoksičnost. Oksidativni stres je neravnovesje v oksidativnem in antioksidativnem stanju celice, pri katerem je neravnovesje v prid prvemu in poraste koncentracija ROS (12).

ROS so visoko reaktivni ioni ali molekule (kisikovi ioni, prosti radikali in peroksidi). Pri normalnih pogojih v celičnih mitohondrijih nastaja nizka raven ROS, ki se odstranjujejo z antioksidativnimi encimi, kot sta katalaza (CAT) in glutation-S-transferaza (GST). Pri visoki ravni ROS pride do zmanjševanja koncentracije glutationa (GSH) in kopiranja njegovega oksidiranega produkta (GSSG) (22).

Mehanizmi genotoksičnosti ND so odvisni od naslednjih lastnosti: velikost, oblika, površinske lastnosti, sestava, topnost, agregacija/aglomeracija in privzem delcev. Do genotoksičnosti naj bi prišlo zaradi neposredne interakcije ND z genetskim materialom ali s posrednimi poškodbami le-tega povzročenimi z ROS, nastalih zaradi ND ali zaradi toksičnih ionov, sproščenih iz površine ND (12) (slika 1). Sekundarna genotoksičnost je lahko rezultat interakcij DNA z ROS, ki se sproščajo iz aktiviranih fagocitov (nevtrofilci, makrofagi) med vnetjem izzvanim z ND (12) (slika 1).



Slika 1: Mehanizmi genotoksičnosti nanodelcev

ND lahko povzročijo primarno in sekundarno genotoksičnost. Do primarne genotoksičnosti lahko pride neposredno (ND so v stiku z DNA) ali posredno (ND niso v neposrednem stiku z DNA). (23)

Neposredna primarna genotoksičnost

ND, ki preidejo celično membrano, lahko pridejo do jedra z difuzijo skozi jedrno membrano ali s transportom preko kompleksov jedrnih por, in interagirajo neposredno z

DNA (23). ND manjših velikosti lahko pridejo do jedra skozi jadrne pore (premer med 8 in 10 nm), medtem ko imajo večji ND (premer med 15 in 60 nm) dostop do DNA le v delečih se celicah, med mitozo, ko se jadrna membrana razgradi (23). Med interfazo lahko pridejo v stik ali se vežejo z molekulami DNA ter vplivajo na replikacijo DNA in transkripcijo DNA v RNA. Med mitozo lahko ND pridejo v stik s kromosomi in povzročijo klastogene ali anevgene učinke. ND lahko mehansko ali s kemijsko vezavo povzročijo prelome v kromosomih ali zmotijo proces mitoze (23).

Posredna primarna genotoksičnost

ND lahko preko vezave ali oksidativnih poškodb motijo delovanje proteinov, ki sodelujejo pri replikaciji, transkripciji ali popravilu DNA ter pri drugih celičnih procesih (23). Delci ali znotrajcelični kovinski ioni iz delcev lahko povečajo permeabilnost membrane lizosomov, kar lahko vodi do sprostitev DNaz v citoplazmo in njihovega prehoda v jedro, kjer pridejo v stik z DNA (12). ND lahko povzročijo nastanek ROS v celici, ti pa povzročijo posredne oksidativne poškodbe DNA. Poškodovane baze DNA preko napačnih popravil in replikacije povzročijo mutacije, te pa so potencialno karcinogene. Če ND reagirajo z mitohondriji v celici, vplivajo na njihovo delovanje in v odgovor na stres lahko mitohondriji pričnejo proizvajati ROS, reagirajo pa lahko tudi s samo mitohondrijsko DNA.

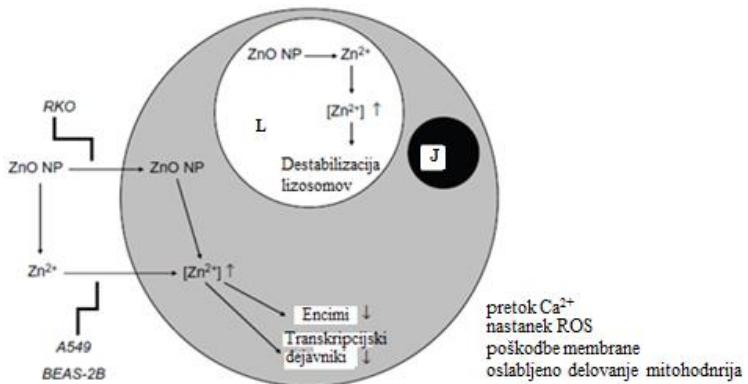
Ioni prehodnih kovin (kot so kadmij, krom, kobalt, baker, železo, nikelj, titan in cink), sproščeni iz ND, ki te kovine vsebujejo, lahko pretvorijo celične kisikove metabolne produkte, kot je vodikov peroksid (H_2O_2) in superoksidni anioni (O_2^-), v hidroksilni radikal ($\cdot OH$) (13). To pa je ena od primarnih spojin, ki povzročajo poškodbe DNA.

3.2.1 Citotoksičnost, oksidativni stres in genotoksičnost nanodelcev ZnO

Interakcije nanodelcev ZnO z biomolekulami in celičnimi komponentami

Mehanizmi toksičnosti (topnih) ND ZnO se razlikujejo v primerjavi z mehanizmi toksičnosti netopnih ND. Toksičnost ND ZnO namreč povzročijo prosti ali vezani Zn^{2+} znotraj celice, in ne reakcije na površini privzetih trdnih ND (19) (slika 2). Vprašanje pa je, ali je glavna pot privzetega Zn^{2+} privzem ionov Zn^{2+} ali ND ZnO. Gilbert B in sod. so s pomočjo vrstične transmisijске rentgenske mikroskopije (STXM) in mikroskopije na atomsko silo (AFM) na človeških bronhijskih epitelijskih celicah pokazali, da večina ND

vstopi v celico (16). Predhodno pa so dokazali tudi, da ND ZnO ne razpadejo popolnoma v rastnem mediju.



Slika 2: Mehanizmi toksičnega delovanja nanodelcev ZnO

ND ZnO se raztopijo v zunajceličnem mediju, kar povzroči povečanje zunajceličnega $[Zn^{2+}]$. To posledično vodi do povečanega znotrajceličnega $[Zn^{2+}]$, zaradi česar se zmanjša aktivnost encimov in transkripcijskih faktorjev odvisnih od Zn^{2+} . Druga možnost je, da ND ZnO vstopijo v celico in se nato v njej raztopijo v lizosomih. To vodi v povečan znotrajlizosomalni $[Zn^{2+}]$, česar posledica je destabilizacija lizosoma. Toksični učinki ND ZnO vključujejo regulacijo znotrajcelične $[Ca^{2+}]$, nastanek ROS, poškodbe membrane in oslabljeno delovanje mitohondrija. (24)

Poleg toksičnih učinkov prikazanih na sliki 2 prihaja še do drugih interakcij ND ZnO z biomolekulami. Ioni Zn^{2+} sproščeni iz površine ND ZnO lahko toksično delujejo tudi na naslednje načine:

- Inhibicija biomolekul. Ioni Zn^{2+} so sposobni tvorbe kelatov z biomolekulami (25). Kelati nastanejo tako, da koordinacijski atomi v molekuli (O, N) oddajo posamične elektrone ionom Zn^{2+} . Ker se koordinacijski atomi biomolekul večinoma nahajajo na njihovih aktivnih mestih, lahko vezava Zn^{2+} z biomolekulami inaktivira le-te ter s tem prepreči funkcije, ki ohranjajo normalne fiziološke procese.
- Zamenjava Mg^{2+} s Zn^{2+} . Različni kovinski ioni imajo različna vezavna mesta na proteinih in afiniteto do funkcionalnih proteinov. Zn^{2+} lahko iz določenih proteinov izpodrine Mg^{2+} (25).
- Ovirana transkripcija in translacija. ND ZnO v bližini perijedra (citoplazemska območje okrog jedra) lahko ovirajo celično transkripcijo in translacijo (26).
- Razgradnja mRNA. Sproščeni kovinski ioni lahko z interakcijo s stabilizacijskimi proteini mRNA povzročijo razgradnjo citoplazemske mRNA (26).
- Reakcije s signalnimi molekulami. ND ZnO lahko reagirajo tudi s celičnimi signalnimi molekulami, kar vodi do aktivacije signalnih kaskad, poškodb DNA in celične smrti (26).

Dosedanje objave o genotoksičnosti nanodelcev ZnO

Iz dosedanjih objav je razvidno, da so ND ZnO v večini primerov pokazali pozitiven rezultat pri kometnem testu (na človeških epidermalnih celicah, na celicah človeškega črevesnega adenokarcinoma (Caco-2), na primarnih mišjih embrionalnih fibroblastih, na človeški spermii itd.) (12, 15). Pozitivni učinek pomeni, da so testirani ND povzročili povečanje poškodb v primerjavi z netretiranimi celicami.

Karlsson HL in sod. (4), Yang H in sod. (27), Sharma V in sod. (28, 29), Osman IF in sod. (30), Demir E in sod. (31) ter Hackenberg S in sod. (32) so s kometnim testom preučevali genotoksične učinke ND ZnO. Karlsson HL in sod. (4) so 4 ure tretirali epitelijske celice človeškega pljučnega adenokarcinoma (A549) z 1, 20 in 40 µg/mL ND ZnO (71 nm) in dobili pozitivne rezultate pri vseh koncentracijah. Yang H in sod. (7) so 24 ur tretirali primarne mišje embrionalne fibroblaste s 5 in 10 µg/mL ND ZnO ($19,6 \pm 5,8$ nm) ter za obe koncentraciji pokazali genotoksičnost. Sharma V in sod. (28) so 6 ur tretirali človeške rakave epitelijske celice (A431) z 0,001, 0,008, 0,08, 0,8 in 5 µg/mL ND ZnO (30 nm) ter ugotovili, da je genotoksičnost ND ZnO koncentracijsko odvisna; rezultati kometnega testa so kazali na genotoksičen učinek 0,08 in 5 µg/mL ND ZnO. Sharma V in sod. (29) so 6 ur tretirali človeške epidermalne keratinocite z 8 in 14 µg/mL ND ZnO ter za obe koncentraciji pokazali genotoksičnost. Osman IF in sod. (30) so tretirali 2 in 4 ure človeške rakave celice žrela (HEp2) z 10, 20, 50 in 100 µg/mL ND ZnO. Po obeh tretiranjih so s kometnim in mikrojedrnim testom dobili pozitivne rezultate za vse koncentracije. Demir E in sod. (31) so *in vitro* preučevali genotoksičnost ND ZnO na človeških embrionalnih ledvičnih celicah (HEK293) in na mišjih embrionskih fibroblastih (NIH/3T3). S kometnim testom so pri koncentracijah nad 100 µg/mL opazili statistično značilno povečanje količine poškodb DNA. Nad 100 µg/mL je prišlo tudi do povečanja pogostosti pojavljanja mikrojeder, pri celičnem transformirajočem testu pa so ND inducirali neodvisno rast celičnih pritrdišč. Hackenberg S in sod. (32) so s kometnim testom naredili primerjavo med genotoksičnostjo ND ZnO in ZnO v obliki večjih delcev (< 5 µm) pri koncentracijah 0,01, 0,1, 5, 10 in 50 µg/mL na človeških celicah nosne sluznice. Za ND ZnO so pokazali genotoksičnost nad koncentracijo ND 10 µg/mL (vključno z 10 µg/mL), druga oblika ZnO pa ni imela genotoksičnega učinka.

Genotoksičen učinek ND ZnO pa je bil že dokazan tudi z drugimi genotoksičnimi testi. Valdiglesias V in sod. (15) so preučevali citotoksične in genotoksične učinke ND ZnO na

človeških SHSY5Y nevronskih celicah. Ugotovili so, da ND ZnO v nevronske celice niso vstopili; njihova prisotnost v mediju pa je koncentracijsko in časovno odvisno povečala citotoksičnost (vključno z apoptozo in spremembo celičnega cikla) ter genotoksičnost (vključno z nastanjem mikrojeder, fosforilacijo H2AX in poškodbami DNA). Prosti ioni Zn^{2+} , sproščeni iz ND ZnO, niso bili odgovorni za zmanjšanje živosti, vendar Valdiglesias V in sod. (15) poudarjajo, da to ne pomeni, da nimajo vloge pri nastanku ostalih celičnih poškodb. Dufour EK in sod. (33) so na celicah jajčnika kitajskega hrčka (CHO celice) s testom kromosomskih aberacij testirali genotoksičnost ND ZnO. Ugotovili so, da je bila najnižja koncentracija ND, ki je povzročila statistično značilne poškodbe DNA, 54 μ g/mL. Moreno-Villanueva M in sod. (34) so 5, 30 in 180 minut tretirali celice A549 z 0,4-160 μ g/mL ND ZnO. S FADU testom so pokazali genotoksičnost ND v celotnem uporabljenem koncentracijskem območju.

Z Ames testom, ki sicer ni najprimernejši test za oceno genotoksičnosti ND v povezavi s človekom (21), so Li CH in sod. (35) dobili negativne rezultate za ND (93,35 nm) in mikrodelce (1226,2 nm) ZnO. Negativne rezultate so dobili tudi na periferni krvi miši z *in vivo* mikrojedrnim testom.

Kvantitativna primerjava velikosti genotoksičnega učinka (povečanje DNA poškodb v primerjavi s kontrolo) ND je težka, saj v različnih študijah uporablja različne vrste celic in čase tretiranja. Prav tako je težko narediti splošen sklep, katere lastnosti ND povzročijo največ poškodb DNA, predvsem zaradi dejstva, da se med študijami razlikuje veliko dejavnikov (npr. vrsta celic, odmerek, disperzijska tehnika, čas tretiranja).

3.3 METODE ZA PREUČEVANJE TOKSIČNOSTI NANODELCEV: UPORABLJENE METODE

3.3.1 Testi citotoksičnosti

Test MTT

Test MTT je kvantitativna, kolorimetrična metoda, namenjena vrednotenju citotoksičnosti preučevane snovi. S testom MTT lahko hitro in relativno enostavno ocenimo vpliv testne snovi na mitohondrijsko aktivnost celice.

Tetrazoljeva sol MTT (1-(4-5 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazolijev bromid) vstopi v celice preko endocitoze ali z difuzijo (36), kjer se s pomočjo mitohondrijskega encima (sukcinat dehidrogenaza) reducira v vijolično obarvan formazan. Nastale netopne kristale formazana nato raztopimo v organskih topilih (npr. v dimetil-sulfoksidu - DMSO, izopropanolu) ter določimo njihovo koncentracijo z merjenjem absorbance pri 570 nm (37). Aktivnost encima sukcinat dehidrogenaza je odvisna od sposobnosti celic za encimsko pretvorbo tetrazolijeve soli (37). Pri izvedbi testa je potrebno upoštevati, da je izmerjena vrednost absorbance, poleg števila živih celic in njihove metabolne aktivnosti, odvisna tudi od koncentracije dodane tetrazolijeve soli in časa inkubacije s celicami (38).

Test z nevtralno rdečim

Test z nevtralno rdečim (3-amino-7-dimetilamino-2-metilfeanazin hidroklorid) nam poda kvantitativno oceno števila živih celic. Temelji na zmožnosti živih celic, da vključijo in vežejo barvilo nevtralno rdeče v lizosome (39). Ko celice začnejo odmirati, se zaradi zmanjšane stabilnosti lizosomov njihova sposobnost privzema nevtralno rdečega zmanjšuje. Tako izguba privzema nevtralno rdečega ustreza zmanjšanju živosti celic. Privzeto barvilo, raztopljeno v kisli etanolni raztopini, spektrofotometrično kvantificiramo z merjenjem absorbance (v našem primeru fluorescence) pri 530 nm.

3.3.2 Testi za meritve oksidativnega stresa

Test s H₂DCFDA

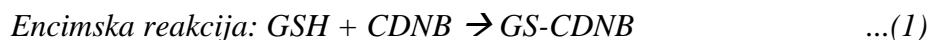
S testom s 2',7'-diklorodihidrofluorescein-diacetatom (H₂DCFDA) lahko kvantitativno določamo oksidativni stres v celicah, ki ga sprožimo z različnimi tvorci radikalov. Ko dodamo nepoškodovanim celicam nefluorescentni (neionski, nepolarni) derivat fluoresceina (H₂DCFDA), ta prestopi celične membrane in znotrajcelične esteraze ga encimsko hidrolizirajo v nefluorescentni H₂DCF (40). V prisotnosti ROS (H₂O₂, ·OH, ONOO⁻) se H₂DCF oksidira do visoko fluorescentnega diklorofluoresceina (DCF) (40). Tako lahko fluorescenco znotrajceličnega DCF uporabimo kot indikator za kvantifikacijo celotnega oksidativnega stresa v celicah. Problem te metode je v zunajceličnem induciraju fotooksidacije H₂DCF v DCF (41), zaradi česar tudi ne moremo gledati celic pod mikroskopom (težko kontroliramo čas izpostavitve svetlobi), poleg tega ni standardnega načina za kvantitativno določitev oksidativnega stresa s pomočjo mikroskopa. Za meritev fluorescence moramo uporabiti aparaturo s hitro eksitacijo svetlobe in hitrim zajetjem

fluorescence; to sta fluorescentni čitalec mikrotitrskih plošč in pretočni citometer s fluorescenčnim detektorjem (42).

Merjenje aktivnosti encimov

Glutation-S-transferaze (GSTji) so povsod prisotni multifunkcionalni encimi, ki imajo pomembno vlogo pri detoksifikaciji celice. Encimi varujejo celico pred toksini tako, da katalizirajo njihovo reakcijo z glutationom - elektrofilni ksenobiotiki reagirajo s tiolnimi skupinami glutationa, tako nevtralizirajo njihova elektrofilna mesta (43). Na tak način varujejo celice pred mutagenimi, karcinogenimi in toksičnimi vplivi spojin. Konjugati glutationa se metabolizirajo naprej v merkaptuno kislino in se nato izločijo (43).

Pri merjenju aktivnosti GST spremljamo hitrost konjugacije CDBN (1-kloro-2,4-dinitrobenzen) z GSH (glutation), kar katalizira GST (glutation-S-transferaza) (43) (enačba I).



Kinetiko nastajanja obarvanega produkta se meri s pomočjo merjenja absorbance pri 340 nm. Stopnja večanja absorbance je neposredno sorazmerna aktivnosti GST v celičnem lizatu.

Katalaza (CAT) je encim, ki katalizira razgradnjo H_2O_2 , kateri nastane med oksidativnim stresom (44). Pri merjenju aktivnosti CAT spremljamo hitrost razgradnje H_2O_2 pri 25 °C, preko upadanja absorbance H_2O_2 pri 240 nm (44).

Aktivnost GST in CAT lahko merimo v celičnih in bakterijskih lizatih, homogenatih tkiva ter v plazemskih in eritrocitnih lizatih. Lizat celic dobimo tako, da najprej postrgamo (adherentne) celice s strgalom, nato jih centrifugiramo, peletu dodamo PBS s surfaktantom in na koncu še soniciramo. Celice moramo imeti ves čas na ledu; v primeru, da jih ne bi testirali isti dan, jih je potrebno zamrzniti na -80 °C. Vzorec ostane stabilen najmanj en mesec.

3.3.3 Testi genotoksičnosti

Genotoksičnost ND se lahko testira *in vitro* ali *in vivo*. Pristop *in vitro* je primeren za testiranje primarne genotoksičnosti, medtem ko s pristopom *in vivo* lahko dobimo informacije tudi o sekunadrnih vplivih, kot je vnetje. Za testiranje genotoksičnosti ND obstaja več metod (*Salmonella* mikrosomalni (Ames) test, *in vitro* in *in vivo* kromosomske

aberacije, HPRT test idr.), pri čemer sta se kometni test in mikrojederni test izkazala za zelo občutljiva (23).

Kometni test

Kometni test (*ang. Comet assay* ali *single-cell gel electrophoresis*) je najpogosteje uporabljen test za celično testiranje genotoksičnosti ND *in vitro* in je pogosto izbrana metoda, če želimo zaznati nizko raven poškodb DNA. V dosedanjih raziskavah je večina testiranih ND povzročila prelome verige DNA ali oksidativne poškodbe DNA, kar ni presenetljivo zaradi občutljivosti samega testa in visoke reaktivnosti ND.

Obstaja več različic kometnega testa, pri čemer se je različica z uporabo visokega pH izkazala za visoko občutljivo. Pri alkalnem kometnem testu zaznamo enojne in dvojne prelome DNA in alkalno labilna mesta, če pa uporabimo specifične endonukleaze, lahko analiziramo tudi oksidativne poškodbe DNA (12). Alkalno labilna mesta vključujejo apurinska/apirimidinska mesta, ki nastanejo zaradi izgube poškodovanih baz sladkorja v ogrodju DNA.

Pri kometnem testu so celice vgrajene v agarozni gel na mikroskopskih stekelcih ter lizirane v raztopini z dodanim detergentom in visoki koncentraciji soli, pri tem se razgradijo membrane ter odstranijo histoni in ostali topni proteini (12). Prelomi DNA sprožijo sprostitev superzvite DNA, ki se med elektroforezo premakne proti anodi. Tako nastanejo repi kometov, ki so vidni s fluorescentno mikroskopijo. Relativna intenziteta repa kaže na pogostost prelomov. Zaznamo lahko od 100 do nekaj 1000 prelomov DNA na celico (12).

Pri določanju potencialne genotoksičnosti ND je pomembno, da uporabimo necitotoksične koncentracije ND. Med celično smrtjo (apoptozo ali nekrozo) lahko nastajajo dvojni prelomi vijačnice DNA in s tem povečana fragmentacija DNA, zato je potrebno meriti citotoksičnost skupaj z genotoksičnostjo, da preprečimo lažno pozitivne rezultate.

Mikrojedrni test

Mikrojedrni test (*ang. Micronucleus assay*) *in vitro* je test genotoksičnosti za detekcijo mikrojeder v citoplazmi interfaznih celic. Mikrojedra nastanejo iz fragmentov kromosomov ali celih kromosomov, ki niso mogli potovati na pole med anafazo celične delitve (45). Kromosomi, ki so izključeni iz jeder hčerinskih celic, ustvarijo v citoplazmi

eno ali več mikrojeder, katere zaznamo z vizualnim (ali avtomatskim) pregledom po barvanju. Nastanek nukleoplazmatskih mostičkov v dvojedrnih celicah pa kaže na prerazporeditev kromosomov. Kromosomske nepravilnosti so neposredna posledica in odraz poškodb na ravni DNA (46). Prelomi kromosomov nastanejo iz nepopravljenih dvojnih prelomov DNA, do kromosomske prerazporeditve pa pride zaradi napačno popravljenih prelomov verige v DNA (46). Najvišja koncentracija testne snovi lahko povzroči maksimalno $55 \pm 5\%$ citotoksičnosti (45). Višje koncentracije lahko povzročijo poškodbe kromosomov kot sekundarni učinek citotoksičnosti (45).

Občutljivost testa lahko povečamo z inkubiranjem tretiranih celic s citohalazinom B (cytoB) (23); ta zaustavi celično delitev, ne pa mitoze, tako se kopijo dvojedrne celice. S štetjem mikrojeder samo v dvojedrnih celicah se zmanjša možnost, da bi šteli mikrojedra, ki so nastala pred tretiranjem. Z dodatkom cytoB pa se izognemo tudi lažno negativnim rezultatom pri testnih snoveh, ki delujejo citostatično - inhibicija celičnega cikla, mitoza ne poteče in mikrojedra ne morejo nastati, četudi je DNA poškodovana. Primerna koncentracija cytoB je običajno med 3 in 6 $\mu\text{g/mL}$ (45). V kulturah tretiranih s cytoB je potrebno oceniti vsaj 2000 dvojedrnih celic na koncentracijo (vsaj 1000 dvojedrnih celic na vzorec) (45).

3.4 CELICE MDCK

Celice MDCK (ang. *Madin-Durby Canine Kidney*) so trajna celična linija, pridobljena iz epitela pasjih ledvic. Gojene v kulturi razvijejo tesne stike in ustvarijo monosloje. Po 3-5 dnevih gojenja dosežejo konfluentnost. Subkultiviramo jih, ko dosežejo 70-80 % konfluentnost. V svežo kulturo nasadimo $2-5 \times 10^4$ celic/ cm^2 z uporabo 0,25 % tripsina/EDTA pri 5 % CO_2 in 37 °C. Celice se trdno pritrdijo in potrebujejo vsaj dve spiranji s PBS predno dodamo tripsin/EDTA.

Ledvica so glavni filterni sistem za izločanje toksičnih snovi iz organizma in zato se tu kopijo tudi ND (47). Zato smo se odločili, da bomo testirali vpliv ND ZnO na celični liniji MDCK. Genotoksičnost ND ZnO do sedaj še ni bila testirana na izbrani celični liniji.

4 NAMENI DELA IN DELOVNE HIPOTEZE

Nameni naše naloge so:

- ugotoviti potencialni citotoksičen učinek nanodelcev ZnO na celice MDCK;
- optimizacija testa s H₂DCFDA brez celic in s celicami MDCK;
- zaznava oksidativnega stresa v celicah MDCK povzročenega z nanodelci ZnO;
- optimizacija kometnega in mikrojedrnega testa s celicami MDCK;
- ugotoviti potencialen genotoksičen učinek nanodelcev ZnO na celice MDCK;
- primerjati citotoksičen učinek, oksidativni stres in genotoksičen učinek med nanodelci in mikrodelci ZnO na celicah MDCK.

Naše hipoteze so:

- nanodelci ZnO povzročijo oksidativni stres v celicah MDCK;
- citotoksični učinek in oksidativni stres bosta sorazmerno naraščala s koncentracijo nanodelcev ZnO;
- zaradi oksidativnega stresa pride do genotoksičnosti.

5 MATERIALI IN METODE

Aparature in pribor, ki smo jih uporabljali pri večini metod:

- brezprašna komora s pretokom zraka in UV lučko (MC 12-1, Iskra PIO, Slovenija)
- celični inkubator (Memmert, Nemčija)
- invertni mikroskop s faznim kontrastom (Vert. A1, ZEISS, Nemčija)
- centrifuga (CENTRIC 322B, Tehnica, Slovenija)
- centrifugirke (Sterilin): 15 ml, 50 ml
- pipete (FINNDIPETTE F1, Thermo SCIENTIFIC): 10-100 μl , 100-1000 μl
- avtomastka pipeta (FINNDIPETTE, Thermo SCIENTIFIC)
- pasterjeve pipete: 15 cm (STERILE)
- serološke pipete (STERILE)
- nastavki za pipete (BRAND)
- Bürker-Türkova števna komora (ISO LAB)

Reagenti, ki smo jih uporabljali pri vseh metodah:

- medij za celice MDCK
- pufer PBS, brez Ca^{2+} in Mg^{2+} (Dulbecco, SIGMA-ALDRICH)

5.1 KARAKTERIZACIJA NANODELCEV IN MIKRODELCEV ZnO

Karakterizacija uporabljenih ND in mikrodelcev ZnO je bila izvedena na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Izvedene so bile sledeče analize: 1) analiza delcev s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM), 2) meritve zeta (ζ) potenciala in 3) meritve distribucije velikosti delcev z metodo dinamičnega sisanja svetlobe (DLS).

Karakterizacija je bila izvedena v vodnih raztopinah glukoze. Karakterizacija v raztopinah pufra PBS ni bila možna zaradi prisotnih ionov, ki motijo analize. Prav tako meritve DLS in zeta (ζ) potenciala niso izvedljive v mediju za gojenje celic zaradi visoke ionske jakosti. Rezultati karakterizacije so podani v preglednici I. V prilogi A so podane slike pridobljene s TEM in rezultati meritve DLS.

Preglednica I: Karakterizacija nanodelcev in mikrodelcev ZnO

	Izvor	Velikost	Oblika	Zeta potencial
Nanodelci ZnO	SIGMA-ALDRICH	10 - 100 nm	razpotegnjene heksagonalne ploščice	-15 mV (pH 6,6)
Mikrodelci ZnO	SIGMA-ALDRICH	100 - 500 nm	razpotegnjene heksagonalne ploščice	-26 mV (pH 6,5)

5.2 GOJENJE CELIC MDCK

Pribor, ki smo ga uporabljali pri gojenju celic:

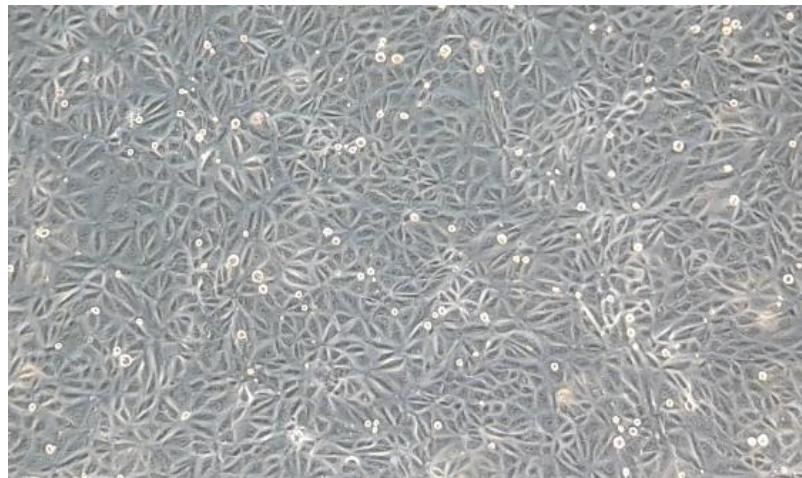
- posode za gojenje: površine dna 25 cm^2 in 75 cm^2 (Nunclon Delta Surfoa, Thermo SCIENTIFIC, Danska)

Reagent, ki smo ga uporabljali pri gojenju celic:

- Triple select (GIBCO Life Tehnology)

Poskuse smo izvajali na trajni celični liniji MDCK (ATCC) (slika 3). Pri poskusih smo uporabljali celice od 10. do 50. pasaže. Gojili smo jih v gojitvenih posodah s površino dna 25 cm^2 (po potrebi tudi v gojitvenih posodah s površino dna 75 cm^2). Pri ~80 % konfluentnosti smo jih presadili v novo gojitveno posodo. Za gojenje smo uporabljali medij za celice MDCK (priloga C). Medij smo hranili v hladilniku; pred uporabo smo ga segreli na 37°C . Subkultivacija je potekala v laminariju pri aseptičnih pogojih. Subkultivirali smo jih tako, da smo najprej odstranili medij, nato smo celice $2 \times$ sprali s 3 mL PBS. Sledila je tripsinizacija – dodali smo 1 mL proteolitičnega encima Triple select in inkubirali ~15 minut oz. toliko časa, da so se celice sprostile od podlage (največ 20 minut). Delovanje encima smo zaustavili tako, da smo dodali 6 mL medija s FBS. Suspenzijo celic smo centrifugirali 5 minut pri 200 g. Po centrifugiranju smo odstranili supernatant in peleto s celicami resuspendirali v svežem mediju (peleti smo dodali 7 mL svežega medija in dobro premešali s pomočjo serološke pipete). $10 \mu\text{L}$ suspenzije celic smo prestavili na Bürker-Türkovo števno komoro in celice prešeli pod fazno-kontrastnim svetlobnim mikroskopom. Iz izračunane koncentracije celic smo določili, kolikšen volumen suspenzije celic potrebujemo za nasaditev v novo gojitveno posodo, da smo dobili končno število celic $2-5 \times 10^4 \times 25$ (za gojitveno posodo z dnom 25 cm^2) oz. $2-5 \times 10^4 \times 75$ (za gojtveno posodo z dnom 75 cm^2). V gojtveno posodo s površino dna 25 cm^2 oz. 75 cm^2 smo

odpipetirali medij in suspenzijo celic ter jo prestavili v inkubator na 37 °C, 5 % CO₂ in 95 % vlažnost. Steklovino in nastavke smo pred uporabo avtoklavirali.



Slika 3: Celice MDCK

Slika je bila posneta pri 400 × povečavi z invertnim svetlobnim mikroskopom s faznim kontrastom.

5.3 TESTI CITOTOKSIČNOSTI

Aparature in pribor, ki smo jih uporabljali pri izvedbi testov citotoksičnosti:

- vorteks (Select vortexer, Select BioProducts)
- spektrofluorimeter (BioTek, Nemčija)
- mikrotitrskra plošča s 96 vdolbinami (Thermo SCIENTIFIC, Nemčija)

Reagenti, ki smo jih uporabljali pri izvedbi testov citotoksičnosti:

- reagent MTT (čistost ≥ 98 %, SIGMA-ALDRICH)
- barvilo nevtralno rdeče (čistost ≥ 90 %, SIGMA-ALDRICH)
- DMSO (čistost ≥ 99,9 %, SIGMA-ADLRICH)
- topilo za nevtralno rdeče: 50 % EtOH, 1 % ocetne kisline, 49 % dH₂O
- H₂O₂ (Merck, Nemčija): 0,75 mM

Nasaditev celic in izvedba testiranja:

Celice MDCK smo nasadili v mikrotiterske plošče s 96 vdolbinami; v vsako vdolbino smo odpipetirali 100 µL celic v mediju za celice MDCK ($0,7 \times 10^4$ celic / 100 µL). Mikrotitrskre plošče z nasajenimi celicami smo prestavili v inkubator na 37 °C, 5 % CO₂ in 95 % vlažnosti. Po 24-urni inkubaciji smo celicam dodali toliko reagenta, da je bila količina 1, 5, 10, 15, 30 in 60 µg/mL ND in mikrodelcev ZnO. Priprava suspenzij ND in mikrodelcev

ZnO je podana v prilogi D. Za negativno kontrolo (K^-) smo uporabili celice z medijem za celice MDCK, za pozitivno kontrolo (K^+) pa celice, ki smo jim dodali 0,75 mM H_2O_2 . Mikrotitrski plošče s celicami smo nato prestavili v inkubator in celice inkubirali 24 ur. Nasaditev celic in testiranje smo izvedli po enakem postopku za test MTT in za test z nevtralno rdečim.

5.3.1 Test MTT

V vdolbine na mikrotitrski plošči z nasajenimi tretiranimi celicami smo dodali 15 μL reagenta MTT s koncentracijo 5 mg/mL in celice inkubirali 3 ure, kar je optimalen čas za pretvorbo reagenta MTT v formazan (48) (slike celic so podane v prilogi E). Po inkubaciji smo odsesali vso tekočino iz vdolbin in nastale kristale formazana raztopili v 100 μL DMSO. Po raztopitvi formazana smo s pomočjo spektrofotometra izmerili absorbanco raztopljenega formazana pri 570 nm.

5.3.2 Test z nevtralno rdečim

V vdolbine na mikrotitrski plošči smo dodali 16 μL 0,4 % reagenta nevtralno rdeče in celice s tretmajem in reagentom nevtralno rdeče inkubirali 2 uri. Po inkubaciji smo odsesali vso tekočino iz vdolbin. V vsako vdolbino smo dodali celicam s privzetim nevtralno rdečim 100 μL topila, previdno vorteksirali in nato počakali 10 minut. S pomočjo spektrofluorimetra smo izmerili fluorescenco nevtralno rdečega pri 530 nm.

Tako pri testu MTT, kot pri testu z nevtralno rdečim, smo izračunali povprečja različno tretiranih vzorcev in jih normalizirali glede na K^- ($K^- = 100 \%$). V Microsoft Excelu smo normalizirane vrednosti prikazali s stolpičnimi grafikoni. Izračunali smo standardno deviacijo in s t-testom določili, katere vrednosti se statistično značilno razlikujejo od K^- (p vrednost < 0,05).

5.4 TESTI ZA MERITVE OKSIDATIVNEGA STRESA

5.4.1 Test s H₂DCFDA

Aparature in pribor, ki smo jih uporabljali pri testu s H₂DCFDA:

- spektrofluorimeter (DYNEX Technologies, MRX Microplate Reader, Nemčija)
- črna mikrotitrská plošča s 96 vdolbinami (Thermo SCIENTIFIC, Nemčija)

Reagenti, ki smo jih uporabljali pri testu s H₂DCFDA:

- H₂DCFDA (SIGMA-ALDRICH)
- propidijev jodid (PI) (SIGMA-ALDRICH)
- fiksativ po Carnoyu: ocetna kislina + metanol (V:V = 1:1)
- NaOH: 10 mM (čistost ≥ 98 %) (SIGMA-ALDRICH)
- medij za celice MDCK brez fenol rdečega

Test s H₂DCFDA brez celic

Pri metodi brez celic (cell-free) smo z dodatkom 9,09 mM NaOH H₂DCFDA odcepili diacetilno (DA) skupino. V mikrotitrsko plošče s 96 vdolbinami smo odpipetirali po 100 µL 1, 5, 10 in 15 µg/mL ND ZnO ter 10 µg/mL mikrodelcev ZnO. Za K⁻ smo uporabili medij za celice MDCK brez fenol rdečega, za K⁺ pa 0,025 mM H₂O₂. H₂O₂ ter suspenzijo ND in mikrodelcev ZnO smo pripravili z medijem za celice MDCK brez fenol rdečega (fenol rdeče lahko moti meritev fluorescence). Nato smo suspenzijam ND in mikrodelcev, H₂O₂ ter mediju za celice MDCK brez fenol rdečega dodali 75 µL pripravljenega H₂DCF. Po 24-urni inkubaciji smo izmerili fluorescenco DCF (ekscitacija/emisija: 495/520).

Test s H₂DCFDA s celicami

Nasaditev celic, barvanje s H₂DCFDA in izvedba testiranja:

Celice MDCK smo nasadili v črno mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinami ($2,5 \times 10^4$ celic / 100 µL); v 3 stolpce na plošči smo odpipetirali le sam medij. Po 24-urni inkubaciji smo odstranili medij in celice 2-krat splaknili s 75 µL PBS. Nato smo v polovico vdolbin na plošči dodali 75 µL 25 µM H₂DCFDA (pripravljen v PBS). Sledila je 45-minutna inkubacija. Po inkubaciji smo H₂DCFDA odstranili in celice sprali s 75 µL PBS. Celicam v vdolbinah v črni mikrotitrski plošči smo nato dodali 100 µL enakih testnih koncentracij ZnO kot pri testu s H₂DCFDA brez celic. Za K⁻ smo uporabili celice z medijem za celice MDCK brez fenol rdečega, za K⁺ pa celice z dodanim 0,025 mM H₂O₂. Celice z dodanimi suspenzijami ZnO smo inkubirali 24 ur.

Fiksacija celic in barvanje s PI:

Po končani inkubaciji smo na spektrofluorimetru izmerili fluorescenco H₂DCFDA (ekscitacija/emisija: 495/520). Količino celic v vdolbinah smo določili z barvanjem celic s PI. Ker pa PI ne vstopa v žive celice (celice z nepoškodovano membrano), smo pred

barvanjem celice fiksirali, s tem so nastale pore v celični membrani in PI je lahko vstopil vanje. Celice smo fiksirali s 60 µL fiksativa po Carnoyu. Po 5 minutah smo iz vdolbin odsesali tretmaje in fiksativ ter ponovno dodali 60 µL fiksativa. Po 10 minutah smo odstranili fiksativ in v vdolbine s celicami odpipetirali 60 µL PI (10 µg/mL; v PBS). Ponovno smo počakali 10 minut, nato pa splagnili celice s 75 µL PBS. V vdolbine s celicami smo odpipetirali 75 µL PBS in s spektrofotometrom izmerili fluorescenco PI (ekscitacija/emisija: 535/625).

Mikrotitersko ploščo smo imeli med celotnim poskusom v temi (pokrito z alufolijo), zato da ne pride do fotooksidacije H₂DCF v DCF.

Izračuni:

Rezultate testa s H₂DCFDA po izpostavitvi celic MDCK ND in mikrodelcem ZnO smo predstavili kot relativni delež K⁻, pri čemer je fluorescencija K⁻ predstavljala 100 %. Končne vrednosti fluorescence smo dobili tako, da smo upoštevali količino ROS v celici in količino celic; fluorescenco izmerjeno za H₂DCFDA smo normalizirali z relativno vsebnostjo celic (fluorescencija PI). Izračun je predstavljen v enačbi 2. Pri fluorescenci izmerjeni za H₂DCFDA smo upoštevali samo fluorescenco, ki izvira iz DCF ter odšteli fluorescenco ostalih komponent; vrednostim fluorescence celic, ki so bile pobarvane s H₂DCFDA, smo odšteli povprečno vrednost fluorescence celic, ki niso bile pobarvane s H₂DCFDA (enačba 3). Pri fluorescenci izmerjeni za PI pa smo vrednostim fluorescence v vdolbinah, kjer so bile celice, ki so bile pobarvane s H₂DCFDA, odšteli povprečno vrednost fluorescence vdolbin brez celic - ozadje (enačba 4). Rezultate smo grafično predstavili s stolpičnimi grafikonimi s pomočjo programa Microsoft Excel. Izračunali smo standardno deviacijo in statistično značilna odstopanja od K⁻ (t-test).

$$\text{končna vrednost} = \frac{\text{H}_2\text{DCFDA}}{\text{PI}} \quad \dots 2$$

$$\text{H}_2\text{DCFDA} = \text{H}_2\text{DCFDA} (\text{celice s H}_2\text{DCFDA}) - \text{H}_2\text{DCFDA} (\text{celice brez H}_2\text{DCFDA}) \quad \dots 3$$

$$\text{PI} = \text{PI} (\text{celice s PI}) - \text{PI} (\text{ozadje}) \quad \dots 4$$

5.4.2 Merjenje aktivnosti encimov

Aparature in pribor, ki smo jih uporabljali pri merjenju aktivnosti encimov:

- palični sonikator (SONICS, Sonics & Materials, Združene države Amerike)
- UV/Vis spektrofotometer (DYNEX, DYNEX Technologies, Nemčija)
- spektrofluorimeter (ANTOS, Nemčija)

- mikrocentrifugirke: 1,5 ml (STERILE)
- plošča s 6 vdolbinami (Thermo SCIENTIFIC, Nemčija)
- strgal (STERILE)

Reagenti, ki smo jih uporabljali pri merjenju aktivnosti encimov:

- 10 % Triton X-100 (OmniPur)
- 30 % H₂O₂ (MERCK, Nemčija)
- standard BSA (Thermo SCIENTIFIC)
- reagent A – *Pierce BSA Protein Assay* (Thermo SCIENTIFIC)
- reagent B – *Pierce BSA Protein Assay* (Thermo SCIENTIFIC)
- EDTA (čistost \geq 98,5 %, SIGMA-ALDRICH)
- GSH (Thermo SCIENTIFIC)
- CDNB (Thermo SCIENTIFIC)

Nasaditev celic in izvedba testiranja:

V 2 plošči s 6 vdolbinami smo nasadili $2 \times 10^4 \times 9,6$ celic MDCK / mL (2 mL suspenzije celic / vdolbino). Po 24-urni inkubaciji smo celicam dodali testne koncentracije ZnO, te so bile: 5, 10 in 15 µg/mL ND ZnO in 10 µg/mL mikrodelcev ZnO. Za K⁺ smo uporabili celice z medijem za celice MDCK, za K⁺ pa celice, ki smo jim dodali 0,2 mM in 0,5 mM H₂O₂. Celice smo tretirali 24 ur.

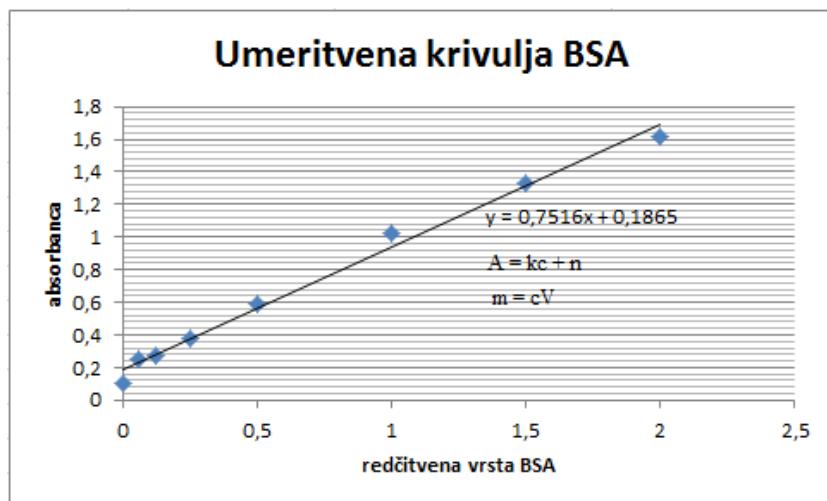
Priprava homogenata celic:

Po 24-urah smo postrgali celice s strgalom. Postrgane celice v PBS smo odpipetirali v 1,5 mL mikrocentrifugirke in jih centrifugirali 10 min na 290 g. Po končanem centrifugiranju smo odstranili supernatant in dodali 350 µL 0,1 % Triton X-100. Mikrocentrifugirke smo prestavili na led.

Sledila je homogenizacija celic s soniciranjem. Vzorce celic smo sonicirali v treh ciklih (15 sekund *on*, 10 sekund *off*) pri 40 % amplitudi. Mikrocentrifugirke so bile med soniciranjem potopljene v čašo z ledom, da smo preprečili denaturacijo proteinov zaradi segrevanja. Tako smo imeli pripravljene vzorce za nadaljnje merjenje količine proteinov ter testiranje aktivnosti GST in CAT.

Merjenje koncentracije proteinov s kitom *Pierce BSA protein assay*:

Količina encimov v homogenatih celic je v veliki meri odvisna od količine celic v vzorcih. Da smo lahko podatke o aktivnosti encimov v celičnih homogenatih primerjali med posameznimi vzorci, smo podatke normalizirali na količino celokupnih proteinov v vzorcih. V mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinami smo odpipetirali po $20 \mu\text{L}$ vzorca na vdolbino. Za izračun koncentracije proteinov smo pripravili umeritvene krivulje z redčitveno vrsto BSA (2, 1,5, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 in 0 mg/mL). Vzorcem smo dodali $200 \mu\text{L}$ mešanice reagentov A in B ($\text{V:V} = 50:1$). Sledila je 30-minutna inkubacija. Po 30 minutah smo izmerili absorbanco obarvanega produkta. Iz absorbance proteinov redčitvene vrste BSA smo pridobili enačbo umeritvene krivulje, ki nam je služila za izračun koncentracije proteinov v naših vzorcih (slika 4).



Slika 4: Umeritvena krivulja BSA

Merjenje aktivnosti GST

Meritve aktivnosti GST smo izvedli v mikrotitrski plošči s 96 vdolbinami. V vdolbine smo odpipetirali $70 \mu\text{L}$ homogenata celic MDCK in dodali $180 \mu\text{L}$ reagenta za GST. Sestava reagenta je podana v preglednici II. Kot ozadje smo uporabili pufer za homogenizacijo (dH_2O z 0,1 % Triton-X100).

Preglednica II: Sestava reagenta za GST

Reagent za GST	980 μL PBS z EDTA	10 mL PBS 3 mg EDTA $\text{pH} = 6,5$ (umerjen s KOH)
	10 μL GSH	
	10 μL CDNB	

Takoj po dodatku reagenta je sledila meritev absorbance pri 340 nm. Absorbanco smo merili 4 minute vsake 30 sekund. Določili smo spremembo $\Delta\text{A}_{340}/\text{min}$ za vzorce in za

ozadja. Vrednost ozadja smo odšteli od vsakega posameznega vzorca. Hitrost nastajanja GS-DNB ($\Delta c/\text{min}$ [$\mu\text{M}/\text{min}$]) smo izračunali s pomočjo Beer-Lambertovega zakona (enačba 5), pri čemer smo upoštevali ekstinkcijski koeficient (\mathcal{E}) za GS-DNB pri 340 nm, ki znaša $0,0096 \mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Pot svetlobe skozi vzorec (l) je znašala 0,624 cm. Po enačbi 6 smo iz spremembe koncentracije na minuto (c) preračunali spremembo množine na minuto (n) in jo podali v [$\mu\text{mol}/\text{min}$]. Hitrost nastajanja produkta smo delili z masami proteinov v vzorcih in končni rezultat podali kot spremembo množine GS-DNB na minuto na maso proteinov v vzorcu [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg proteinov}$].

$$A = \mathcal{E}lc \quad \dots(5)$$

$$n = cV \quad \dots(6)$$

Merjenje aktivnosti CAT

Aktivnost CAT smo merili v 1,5 mL kivetah, prepustnih za UV svetlogo. V kiveto smo odpipetirali 950 μL PBS z 0,033 % H_2O_2 in dodali 50 μL celičnega homogenata. Tako po dodatku vzorca smo začeli meriti absorbanco pri 240 nm. Absorbanco smo merili 3,5 min vsakih 30 sekund.

Spremembo $\Delta A_{240}/\text{min}$ smo izračunali enako kot pri merjenju aktivnosti GST. Nato smo preračunali spremembo koncentracije H_2O_2 na minuto [$\mu\text{M}/\text{min}$] z upoštevanjem, da je \mathcal{E}_{240} za H_2O_2 $43,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ in da je pot svetlobe skozi vzorec 1 cm (širina kivete). Po enačbi 6 smo iz spremembe koncentracije H_2O_2 na minuto preračunali spremembo množine H_2O_2 na minuto [$\mu\text{mol}/\text{min}$]. Končni rezultat smo podali v spremembi množine H_2O_2 na minuto na maso proteinov v vzorcu [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg proteinov}$].

Tako pri merjenju aktivnosti GST, kot pri merjenju aktivnosti CAT, smo izračunali povprečja različno tretiranih vzorcev in jih normalizirali glede na K^- ($K^- = 100 \%$). V Microsoft Excelu smo normalizirane vrednosti prikazali s stolpičnimi grafikoni ter izračunali standardno deviacijo in s t-testom določili, katere vrednosti se statistično značilno razlikujejo od K^- (p vrednost $< 0,05$). Merjenja aktivnosti CAT in GST smo ponovili $3 \times$, vsakič smo imeli vsaj dva enako tretirana vzorca.

5.5 TESTI GENOTOKSIČNOSTI

5.5.1 Kometni test

Aparature in pribor, ki smo jih uporabljali pri kometnem testu:

- elektroforezna banjica in napajalnik
- vodna kopel (Multi Temp III, Nanocenter)
- magnetno mešalo z grelnikom
- epifluorescentni mikroskop (Zeiss, Imager, Nemčija)
- tehtnici (KERN 572, KERN ALJ 160-4NM)
- plošča z 12 vdolbinami (Thermo SCIENTIFIC, Nemčija)
- gladka objektna mikroskopska stekelca (ISO LAB)

Reagenti, ki smo jih uporabljali pri kometnem testu:

- agarozna: LMP, NMP (Invitrogen, Life technologies)
- NaOH (čistost \geq 97 %, SIGMA-ALDRICH)
- EtBr (etidijev bromid, SIGMA-ALDRICH)
- tris: C₄H₁₁NO₃, MW:121,14 g/mol (*ang. Trizma base*) (čistost \geq 99,9 %, SIGMA-ALDRICH)
- EDTA (čistost \geq 98,5 %, SIGMA-ALDRICH)
- NaCl (čistost \geq 99,8 %, SIGMA-ALDRICH)
- N-lavroilsarkozinat (čistost \geq 94 %, SIGMA-ALDRICH)
- triton X-100: C₃₄H₆₂O₁₁ (OmniPur)
- MMS (čistost~99 %, SIGMA-ALDRICH)

Nasaditev celic in izvedba testiranja:

V plošče z 12 vdolbinami smo nasadili $3,7 \times 3 \times 10^4$ celic MDCK / mL. Po 24-urni inkubaciji smo celice izpostavili ND in mikrodelcem ZnO za 24 ur. Suspenzijo ND ZnO smo uporabili v treh koncentracijah – 1, 5 in 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, suspenzijo mikrodelcev ZnO pa v koncentraciji 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Za K⁻ smo uporabili celice z medijem za celice MDCK, za K⁺ pa celice, ki smo jim dodali 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MMS.

Kometni test:

Dan pred izvedbo kometnega testa smo nanesli 300 μL 0,5 % NMP agaroze na mikroskopska stekelca (1. sloj).

Tretirane celice smo tripsinizirali ter prešteli s pomočjo Bürker-Türkove komore. Po tripsinizaciji smo celice skozi celoten postopek priprave hranili na ledu in v temi.

Celice suspendirane v PBS smo zmešali z 1,6 % LMP agarozo (2. sloj) ogreto na 38 °C, nanesli 300 µL suspenzije na stekelce (~ 5000 celic / stekelce) in jih pokrili z novimi stekelci. Po 5 minutah na ledu smo zgornja stekelca previdno odstranili, nanesli 400 µL 1,0 % LMP agarose (3. sloj), jih ponovno pokrili s stekelci ter jih po 5 minutah odstranili.

Po nanosu vseh treh slojev smo stekelca 90 minut namakali v raztopini za alkalno lizo. Po 90 minutah smo stekelca previdno sprali s prečiščeno vodo in jih nato namočili v elektroforezni pufer za 30 minut ($\text{pH} > 13$). Sestava raztopine za alkalno lizo in elektroforeznega pufra je podana v preglednici III. Sledila je 40-minutna elektroforeza pri 1 V/cm (25 V, 400 mA, 20 W). Nato smo stekelca s celicami nevtralizirali v 0,4 M Tris-HCl, pH 7,5, 10 minut.

Preglednica III: Sestava raztopine za alkalno lizo in elektroforeznega pufra

Raztopina za alkalno lizo	1 M NaCl
	0,1 M EDTA
	10 mM Tris-HCl
	0,1 % N-lavrilsarkozinat
	1 % triton X-100 (20 %)
	30 mM NaOH
Elektroforezni pufer	0,3 M NaOH
	1 mM EDTA

Stekelca smo pobarvali s 30 µl EtBr (10 µg/mL) ter jih pregledali z epifluorescentnim mikroskopom pri $400 \times$ povečavi. Slike smo obdelali s programom Komet, ki nam je izračunal delež DNA v repu kometa, dolžino repa kometa in moment repa. Na vsakem stekelcu smo ocenili 60 kometov. Dobljene podatke smo statistično obdelali s programom GrafPad Prism 5 in izvedli Kruskal-Wallisov test z neparametričnim Dunnovim večkratnim primerjalnim posttestom. Za vsak tretma smo naredili šest ponovitev.

5.5.2 Mikrojedrni test

Aparature in pribor, ki smo jih uporabljali pri mikrojedrnem testu:

- epifluorescentni mikroskop (Zeiss, Imager, Nemčija)
- plošča z 12 vdolbinami (Thermo SCIENTIFIC, Nemčija)
- objektna in krovna stekelca (ISO LAB)

Reagenti, ki smo jih uporabljali pri mikrojedrnem testu:

- cytoB (čistost $\geq 98\%$, SIGMA-ALDRICH)
- fiksativ po Carnoyu: ocetna kislina + metanol ($V:V = 1:1$)

- PI (čistost \geq 94 %, SIGMA-ALDRICH)
- Hoechst 33258 (čistost \geq 98%, SIGMA-ALDRICH)
- mešanica glicerola in PBS (V:V = 1:1)
- MMS (čistost~99 %, SIGMA-ALDRICH)

Nasaditev celic in izvedba testiranja:

V plošče z 12 vdolbinami smo vstavili avtoklavirana krovna stekelca (15 mm premera) in nanje nasadili $3,7 \times 1,2 \times 10^4$ celic / mL (1 mL suspenzije celic / vdolbino). Po 24-urni inkubaciji na 37 °C, 5 % CO₂ in 95 % vlažnosti smo iz vdolbin odstranili medij in vanje dodali 1 mL testnih koncentracij nanodelcev in mikrodelcev ZnO. Uporabili smo enake testne koncentracije ZnO kot pri kometnem testu ter enako K⁻ in K⁺ kontrolo.

Izpostavitev celic cytoB, fiksacija ter barvanje s PI in Hoechst 33258:

Po 24-urni inkubaciji smo iz vdolbin odstranili tretma, stekelca s celicami sprali s 600 µL PBS in dodali v vsako vdolbino 600 µL 4 µg/mL cytoB. Celice s cytoB smo inkubirali 24 ur. Sledila je odstranitev $\frac{3}{4}$ medija in dodatek 1 mL fiksativa po Carnoyu. Po 5 minutah smo medij in fiksativ odstranili iz vdolbin, ponovno dodali 1 mL fiksativa in počakali 10 minut, da je potekla fiksacija. Po končani fiksaciji smo prvo stekelce sprali s 600 µL PBS. Nakar je sledilo barvanje DNA. S pinceto smo stekelce previdno vzeli iz vdolbine na mikrotitrski plošči, ga namočili v raztopini 1,5 µg/mL Hoechst 33258 v PBS (660 µL Hoechst 33258 v 2 mL PBS) in počakali 5 minut. Nato smo ga prestavili v raztopino 1,5 µg/mL Hoechst 33258 in 1 mg/mL PI v PBS (660 µL Hoechst 33258 in 20 µL PI v 2 mL PBS) ter počakali 10 minut. Sledilo je še spiranje stekelca v 2 mL PBS. Na objektno stekelce smo kapnili 1 kapljico (10 µL) mešanice glicerola in PBS (V:V = 1:1), s tem smo preprečili bledenje fluorescence. Krovno stekelce smo previdno položili na objektno tako, da smo ga obrnili na nasprotno ploskev od tiste, na kateri je ležalo v vdolbinah mikrotitrsko plošče; celice so bile vmes med obema stekelcema. Tako pripravljene celice smo ocenjevali pod epifluorescentnim mikroskopom in sproti številčili opažena mikrojedra.

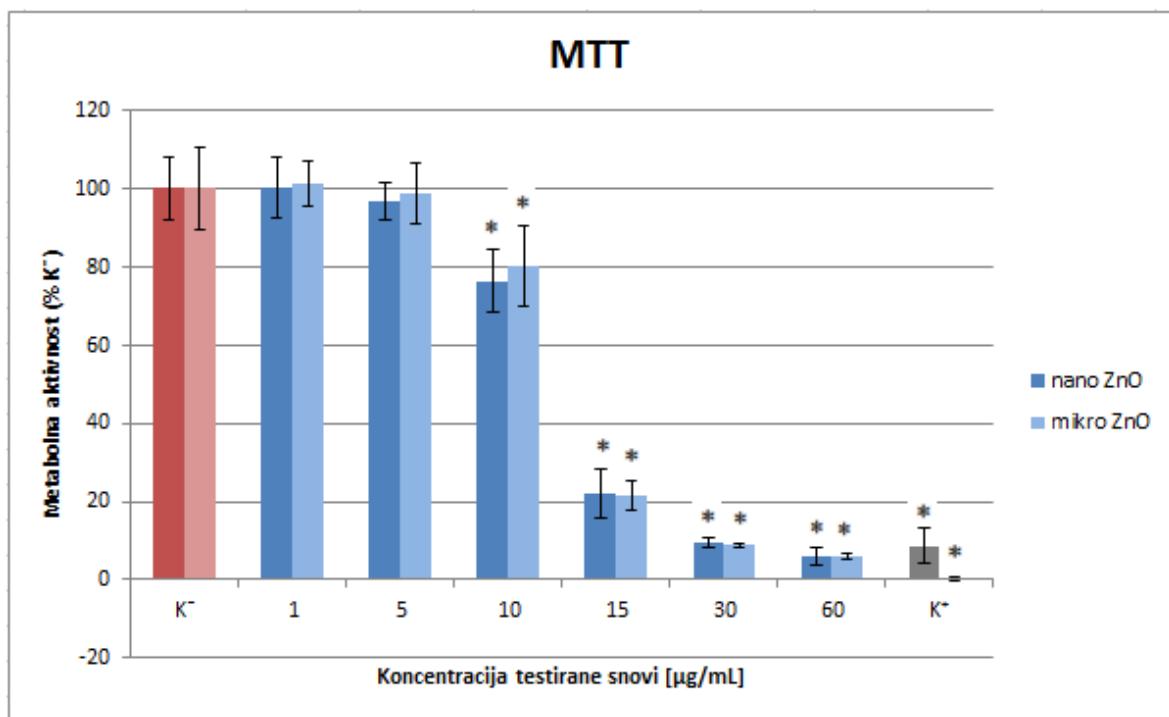
Mikrojedrni test smo ponovili 3 × in za rezultat vzeli povprečje vseh treh ponovitev. Rezultate smo grafično predstavili s stolpičnimi grafikoni s pomočjo programa Microsoft Excel. Izračunali smo še standardno deviacijo in statistično značilna odstopanja od K⁻ (t-test).

6 REZULTATI IN RAZPRAVA

6.1 CITOTOKSIČNOST NANODELCEV ZnO

6.1.1 Metabolna aktivnost

Rezultati testa MTT kažejo na citotoksičnost ND in mikrodelcev ZnO za celice MDCK po 24-urnem tretiraju (slika 5). Citotoksičnost obojih delcev se je povečevala s koncentracijo le-teh. Koncentracija, pri kateri se je vitalnost celic statistično značilno zmanjšala, je nad $10 \mu\text{g/mL}$ (vključno z $10 \mu\text{g/mL}$). To pomeni, da se pri koncentraciji $10 \mu\text{g/mL}$ metabolna aktivnost mitohondrijev zmanjša in se dalje zmanjšuje z naraščajočo koncentracijo delcev ZnO. Delci so se po vstopu v celico začeli kopičiti v mitohondriih in najverjetneje spremenili njihovo delovanje z interakcijo z dihalno verigo in z vplivom na encime, ki sodelujejo pri antioksidativni obrambi (58).



Slika 5: Rezultati testa MTT
ND (nano) in mikrodelce (mikro) ZnO smo 24 ur testirali na celicah MDCK. K^+ : celice, ki smo jih za 24 ur izpostavili $0,75 \text{ mM H}_2\text{O}_2$. Posamezen stolpec prikazuje povprečje rezultatov 10 ponovitev. Na sliki je prikazan tudi standardni odklon. Razlika med K^+ in ZnO je bila ocenjena s t-testom. *: razlika z K^+ je statistično značilna ($p < 0,05$).

Pri izvedbi testa MTT je potrebno preučiti možne interakcije testne snovi z izmerjeno vrednostjo absorbance pri uporabljeni valovni dolžini svetlobe (570 nm) (52). Nekateri

avtorji poročajo, da sestavine celičnega medija (npr. serumski albumini) ali pa sama testna snov lahko pretvorijo sol MTT v formazan in s tem povzročijo lažne rezultate (40). ND ZnO niso absorbirali pri 570 nm (priloga B).

Rezultati Guan R in sod. (1), Threes GS in Stanislav P (51), Kocbek P in sod. (52) ter Sharma V in sod. (53) kažejo na zmanjšanje mitohondrijske aktivnosti v celicah po tretiranju z ND ZnO. Guan R in sod. (1) so s testom MTT pokazali koncentracijsko odvisnost citotoksičnosti ND ZnO po 24-urni izpostavitvi celic HEK293 in LO2. Enako kot mi so ugotovili, da pride do statistično značilne razlike s kontrolo ($p < 0,05$) v metabolni aktivnosti mitohondrijev nad koncentracijo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Threes GS in Stanislav P (51) ter Kocbek P in sod. (52) so pokazali citotokičnost ND ZnO na keratinocitih. Ugotovili so citotoksičnost ND nad koncentracijo 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Po dolgotrajnejši izpostavitvi pa so Kocbek P in sod. (52) ugotovili, da je prišlo do zmanjšane mitohondrijske aktivnosti že pri 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (46). Rezultati Sharma V in sod. (53) kažejo na citotoksičnost ND ZnO pri koncentraciji 14-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ po izpostavitvi človeških celic jetrnega karcinoma (HepG2) za 12 ur. Pokazali so, da je zaradi ROS, nastalih med testiranjem, prišlo do zmanjšanega potenciala mitohondrijske membrane.

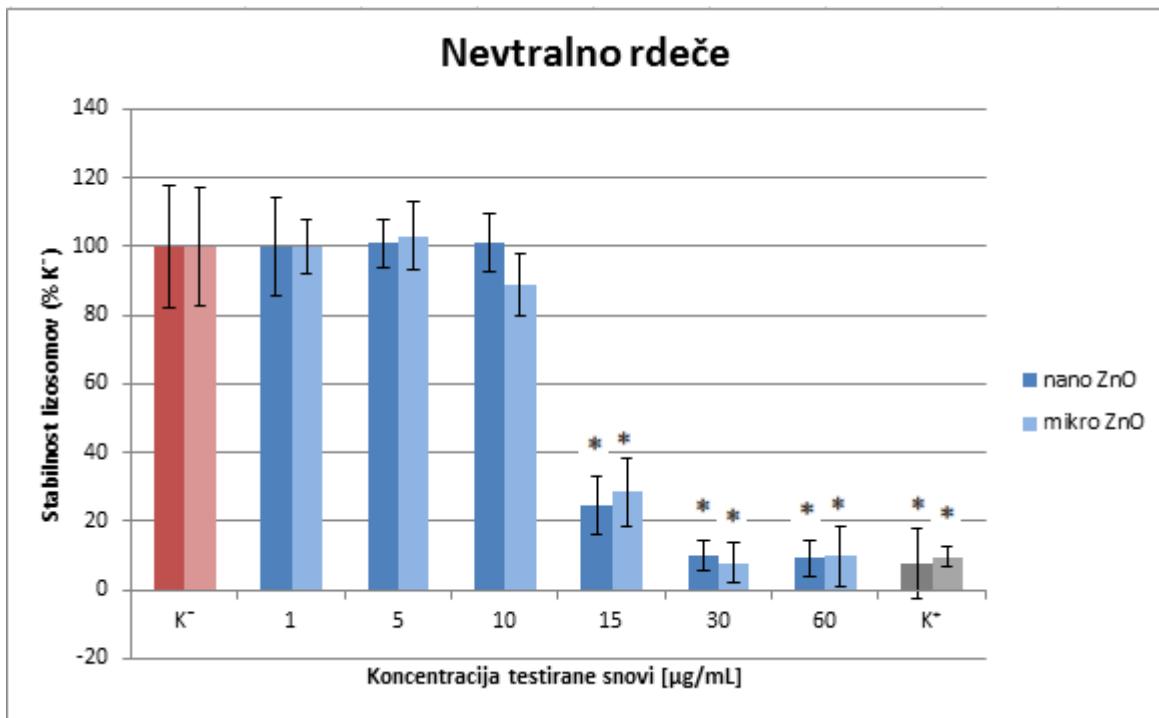
Kao YY in sod. (54) predpostavlja, da zaradi raztpljanja ND ZnO v znotrajceličnem endosому koncentracija citosolnega cinka naraste, citosolni Zn^{2+} se kopiči v mitohondriju, povišana koncentracija prostega mitohondrijskega Zn^{2+} pa vodi v moteno delovanje mitohondrija, aktivacijo kaspaz in apoptozo celice. Tudi rezultati Deng X in sod. (55) kažejo na to, da citotoksičnost ND ZnO izvira iz povišane koncentracije Zn^{2+} , ki je niso opazili le znotraj celice, ampak delno tudi že v gojitvenem mediju.

V literaturi najdemo trditve, da ND povzročijo večjo toksičnost kot mikrodelci z isto sestavo (56). Naši rezultati niso pokazali večje razlike v zmanjšanju mitohondrijske aktivnosti med celicami tretiranimi z ND in celicami tretiranimi z mikrodelci ZnO. Predpostavljam, da je prišlo do primerljive stopnje citotoksičnosti zaradi raztpljanja Zn^{2+} iz površine delcev. V primeru, če bi imeli netopne delce (npr. TiO_2), pa bi pričakovali večjo razliko med citotoksičnostjo ND in mikrodelcev.

6.1.2 Stabilnost lizosomov

Rezultati testa z nevtralno rdečim kažejo na citotoksičnost ND in mikrodelcev ZnO za celice MDCK po 24-urnem tretiranju (slika 6). Citotoksičnost obojih delcev se je

povečevala s koncentracijo le-teh. Koncentracija, pri kateri se je viabilnost statistično značilno zmanjšala je nad $15 \mu\text{g/mL}$ (vključno s $15 \mu\text{g/mL}$). To pomeni, da pri koncentraciji $15 \mu\text{g/mL}$ lizosomi niso več stabilni.



Slika 6: Rezultati testa z nevtralno rdečim

ND (nano) in mikrodelce (mikro) ZnO smo 24 ur testirali na celicah MDCK. K^+ : celice, ki smo jih za 24 ur izpostavili $0,75 \text{ mM H}_2\text{O}_2$. Posamezen stolpec prikazuje povprečje rezultatov 10 ponovitev. Na sliki je prikazan tudi standardni odklon. Razlika med K^- in ZnO je bila ocenjena s t-testom. *: razlika z K^- je statistično značilna ($p < 0,05$).

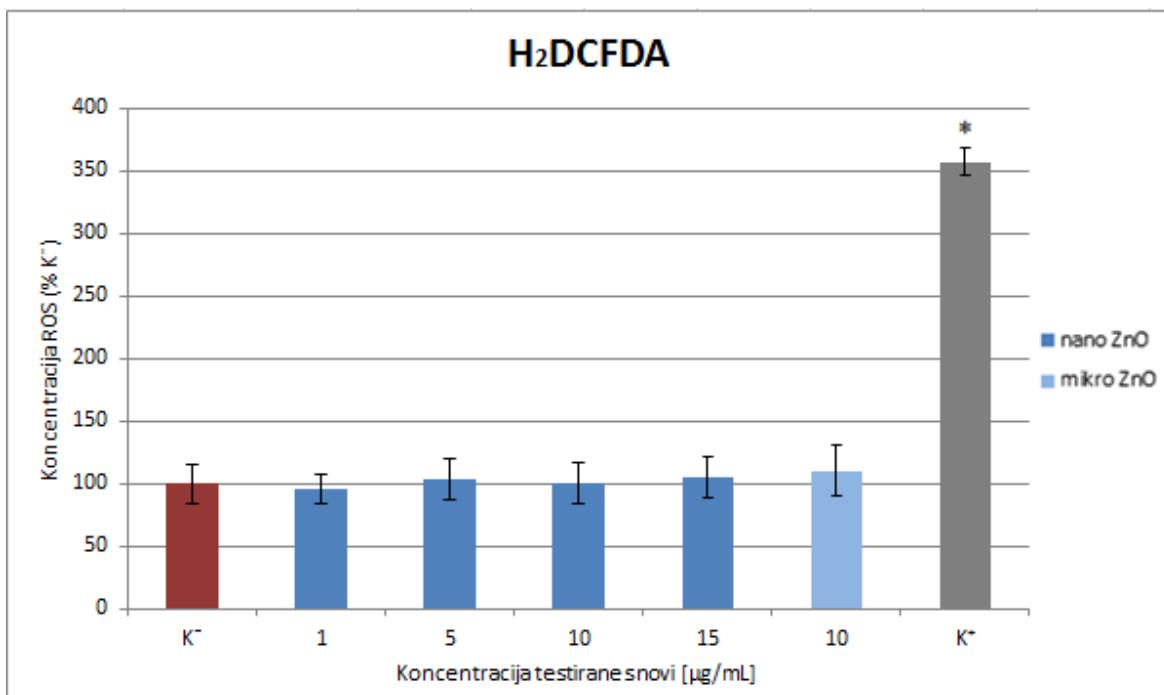
6.2 OKSIDATIVNI STRES POVZROČEN Z NANODELCI ZnO

6.2.1 Rezultati testa s H_2DCFDA brez celic

Rezultati testa s H_2DCFDA brez celic kažejo, da ND ZnO niso povzročili statistično značilnega povečanja ravni ROS v primerjavi z K^- (medij za celice MDCK brez fenol rdečega); to velja za vse uporabljenе koncentracije ($1, 5, 10, 15 \mu\text{g/mL}$) (slika 7). Tudi višje koncentracije ND ZnO (50 in $100 \mu\text{g/mL}$) ne povzročijo statistično značilnega povečanja ravni ROS (priloga F1).

Dosedanje objavljene raziskave mehanizma toksičnosti ND ZnO kažejo na to, da pride do nastanka ROS v večji meri zaradi sproščenih ionov (Zn^{2+}) iz površine ND (14, 16, 24) in na podlagi tega predpostavljam, da v samem mediju ND ZnO ne razpadejo na ione oz. so

v mediju za celice MDCK slabo topni. Tudi mikrodelci ZnO niso povzročili statistično značilnega povečanja ravni ROS v primerjavi z K⁺ (slika 7). Pri 0,025 mM H₂O₂ je bila vrednost fluorescence statistično značilno večja (slika 7). H₂O₂ je na svetlobi nestabilen in lahko generira ROS brez prisotnosti metabolizma celice.



Slika 7: Rezultati testa s H₂DCFDA brez celic

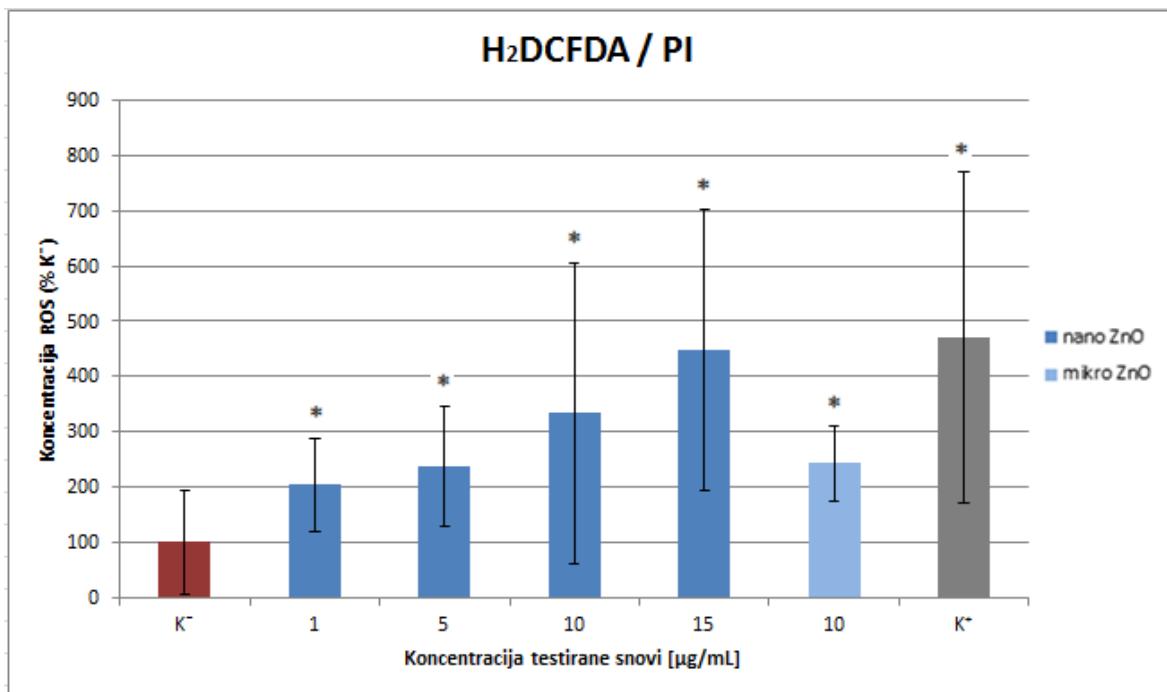
Posamezen stolpec prikazuje povprečje rezultatov 15 ponovitev za K⁺, 5, 10 in 15 µg/mL ND ZnO ter 6 ponovitev za 1 µg/mL ND ZnO, 10 µg/mL mikrodelcev ZnO in 0,025 mM H₂O₂ (K⁺). Na sliki je prikazan standardni odklon. Razlika med K⁺ in ZnO je bila ocenjena s t-testom. *: razlika z K⁺ je statistično značilna ($p < 0,05$).

Da bi ugotovili, če pride do interakcij med ROS in medijem za celice MDCK brez fenol rdečega ter če te vplivajo na fluoresenco, smo pred izvedbo testa izmerili fluoresenco medija z različnimi koncentracijami H₂O₂ (0,025, 0,25 in 2,5 mM) in jo primerjali s PBS z istimi koncentracijami H₂O₂. Do znatnih sprememb v fluoresenci ni prišlo, torej medij ni vplival na končne vrednosti fluorescence pri merjenju ROS (priloga F2).

Da sam test deluje, smo preverili z uporabo različnih koncentracij H₂O₂. Fluoresanca se je z naraščajočo koncentracijo H₂O₂ (0,025, 0,25 in 2,5 mM) spremenjala linearno (priloga F1), torej se je s povečevanjem koncentracije H₂O₂ večala fluoresanca DCF. To so pokazali tudi Wang H in Joseph JA (41).

6.2.2 Rezultati testa s H₂DCFDA s celicami

Rezultati testa s H₂DCFDA s celicami kažejo, da je raven ROS naraščala sorazmerno s koncentracijo ND ZnO (slika 8). Pri vseh koncentracijah ND ZnO in pri mikrodelcih ZnO je prišlo do statistično značilne razlike z K⁻ ($p < 0,05$). Tudi Yang H in sod. (27) so pokazali, da ND ZnO sprožijo nastanek ROS. Na nastajanje ROS vpliva sestava ND (prisotnost ionov prehodnih kovin) (4). Pri ND ZnO so glaven vzrok nastajanja ROS ioni Zn²⁺, ki se sprostijo iz ND po vstopu v celico (14, 16, 24). Nastajanje ROS pa spodbuja tudi velika površina ND (4). ND ZnO so pri enaki koncentraciji kot mikrodelci ZnO, t.j. 10 µg/mL, povzročili nastanek več ROS (razlika z K⁻ je večja), vendar razlika med njima ni statistično značilna ($p > 0,05$). Tudi mikrodelci ZnO so povzročili statistično značilno povečanje ROS v primerjavi z K⁻. Glede na rezultate testa s H₂DCFDA s celicami in primerjavo s testom H₂DCFDA brez celic lahko sklepamo, da so tako ND kot mikrodelci ZnO vstopili v celice in se v njih do neke mere razapljalji.



Slika 8: Rezultati testa s H₂DCFDA

ND (nano) in mikrodelce (mikro) ZnO smo 24 ur testirali na celicah MDCK. K⁺: celice, ki smo jih za 24 ur izpostavili 0,025 mM H₂O₂. Posamezen stolpec prikazuje povprečje 18 ponovitev. Na sliki je prikazan tudi standardni odklon. Razlika med K⁻ in ZnO je bila ocenjena s t-testom. *: razlika z K⁻ je statistično značilna ($p < 0,05$).

Pred izvajanjem samega testa nas je zanimalo, če H₂DCFDA vpliva na živost celic, ker bi s tem lahko nehote vplivali na rezultate meritev. S testoma MTT in nevtralno rdeče smo določali citotoksičnost treh koncentracij H₂DCFDA - 25, 50, 100 µM. Ugotovili smo, da se

pri 100 μM H₂DCFDA živost celic zmanjša za več kot 50 % v primerjavi s 25 μM H₂DCFDA (priloga F3). Zato smo v začetnih izvedbah testa uporabili dve koncentraciji H₂DCFDA; to sta 25 μM in 50 μM . Ugotovili smo, da je 25 μM zadostna koncentracija, da dobimo optimalne rezultate; zato smo se odločili, da bomo za nadaljnje ponovitve testa uporabljali 25 μM H₂DCFDA.

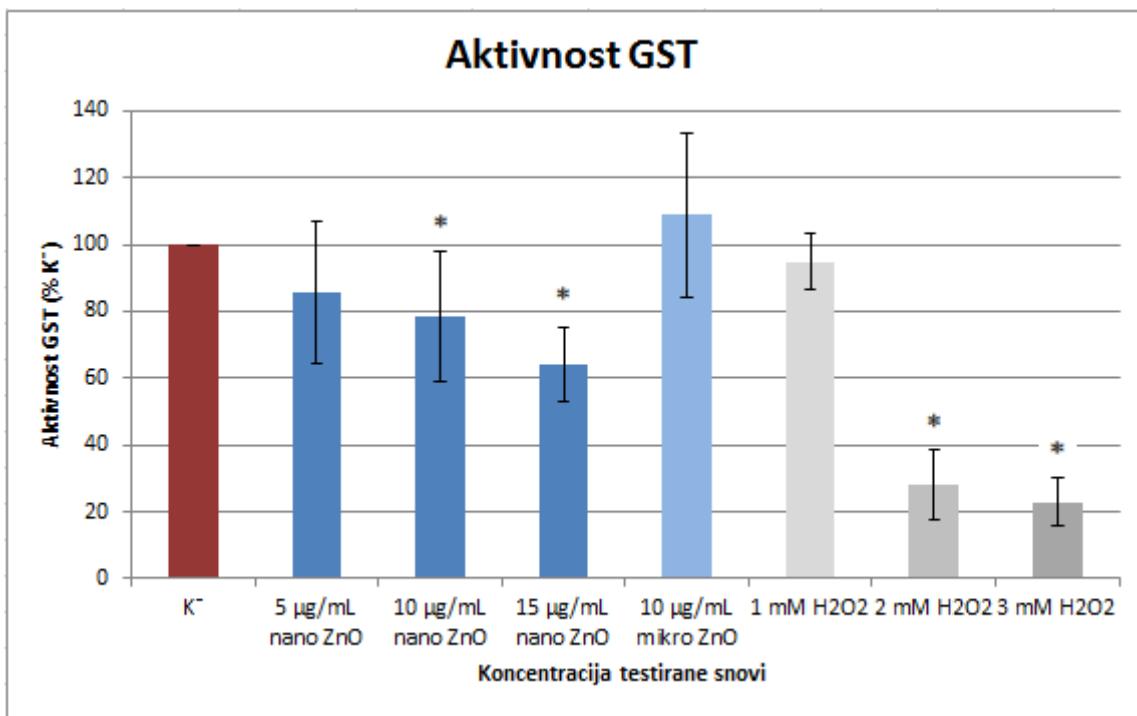
6.2.3 Rezultati merjenja aktivnosti GST

V celicah MDCK, ki smo jih za 24 ur izpostavili ND ZnO, je prišlo do koncentracijsko odvisnega zmanjšanja aktivnosti GST (slika 9). Aktivnost GST se je statistično značilno zmanjšala nad koncentracijo 10 $\mu\text{g/mL}$ (vključno z 10 $\mu\text{g/mL}$). Pri mikrodelcih ZnO ni prišlo do zmanjšanja aktivnosti GST (slika 9). Z višanjem koncentracije H₂O₂ pa se je aktivnost GST kot pričakovano manjšala (slika 9).

Zmanjšanje aktivnosti GST nam pove, da je zmanjšana zmožnost obrambe celic pred oksidativnim stresom. Pokazatelj zmanjšane antioksidativne obrambe celic in oksidativnega stresa je tudi raven glutationa v celicah oz. zmanjšanje le-te. Guan R in sod. (1) so celice HEK293 in LO2 za 24 ur izpostavili ND ZnO. Dokazali so, da pride do koncentracijsko odvisnega zmanjšanja ravni glutationa. Raven glutationa se je statistično značilno zmanjšala nad koncentracijo 50 $\mu\text{g/mL}$ (ND ZnO so imeli pri tej koncentraciji citotoksičen učinek na oba tipa celic). Tudi rezultati raziskave Yang H in sod. (27) ter Sharma V in sod. (28) kažejo na zmanjšanje koncentracije glutationa v celicah po izpostavitvi ND ZnO. Glede na naše rezulata in rezultate Guan R in sod. (1) pride do zmanjšanja antioksidativne obrambe v celicah pri citotoksičnih koncentracijah ND ZnO, pri nižjih koncentracijah pa se celica uspešno borí proti oksidativnemu stresu, kljub temu, da pride do povečanja koncentracije ROS.

Do zmanjšane aktivnosti GST pri ND ZnO in H₂O₂ je lahko prišlo zaradi oksidacije encima z ROS ali pa vezave ND ali/in ionov Zn²⁺ z encimom. Ioni Zn²⁺ imajo veliko afiniteto do tiolnih skupin (-SH), zato se lahko vežejo s cisteinom na S/C-GST enoti encima in tako zmanjšajo njegovo aktivnost. Reakcija GST z glutationom poteka namreč preko dveh podenot GST: Y-GST enota, ki aktivira glutation preko tirozinskega ostanka, S/C-GST enota pa preko serinskega ali cisteinskega ostanka. Mikrodelci ZnO se zaradi svoje velikosti najverjetneje niso vezali z GST. Aktivnost GST v celicah tretiranih z mikrodelci se je še nekoliko povečala v primerjavi z K⁻; iz tega lahko predpostavljam, da

ni nastalo dovolj velike ravni ROS, ki bi oksidirale encim oz. ioni Zn^{2+} niso bili v tako visoki količini, da bi zmanjšali aktivnost GST (nanodelci imajo večjo aktivno površino in zato pride do sprostiteve večje koncentracije ionov Zn^{2+}). Povečana aktivnost GST pomeni odgovor na stresno stanje celice, celica se brani pred ROS, ki pa nastajajo v dovolj nizkih koncentracijah, da ne onemogočajo delovanja GST. Omenjeni mehanizmi so le možne razlage, za potrditev le-teh pa bi morali narediti še dodatne raziskave.

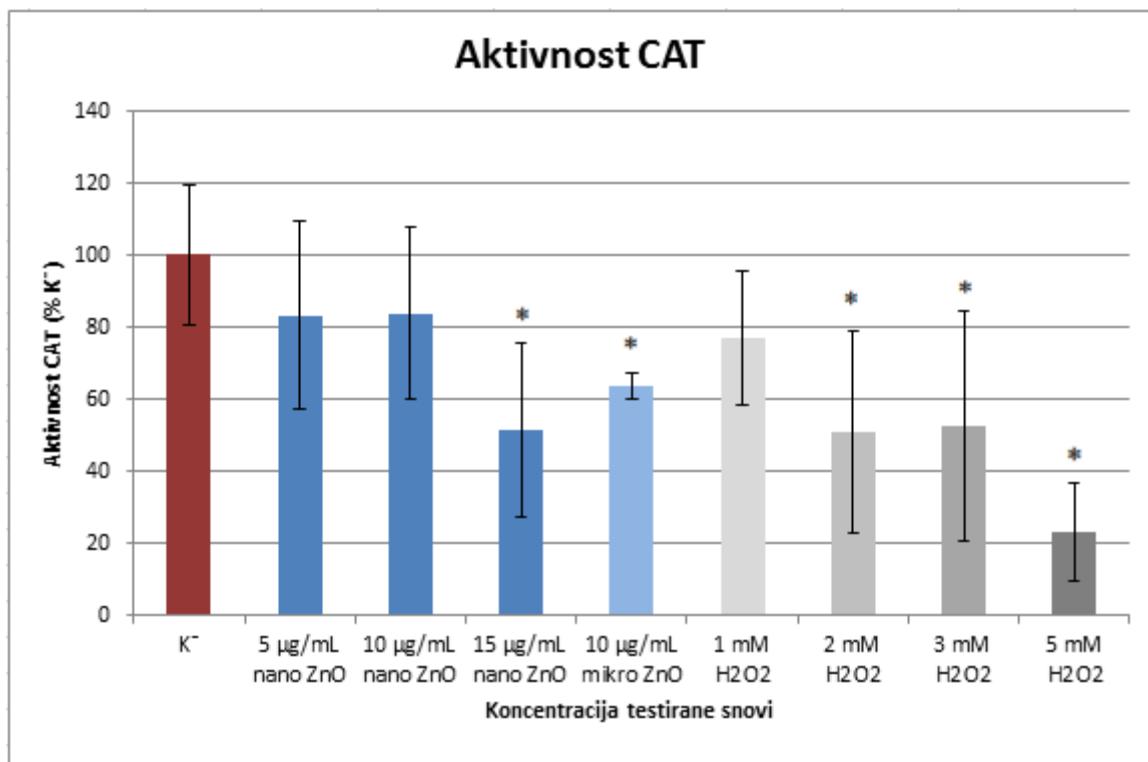


Slika 9: Rezultati merjenja aktivnosti GST

ND (nano) ZnO, mikrodelce (mikro) ZnO in H_2O_2 smo 24 ur testirali na celicah MDCK. Posamezen stolpec prikazuje povprečje 6 ponovitev za K^- , ND ZnO in H_2O_2 ter 2 ponovitvi za mikrodelce ZnO. Na sliki je prikazan standardni odklon. Razlika med K^- in ZnO je bila ocenjena s t-testom. *: razlika z K^- je statistično značilna ($p < 0,05$).

6.2.4 Rezultati merjenja aktivnosti CAT

V celicah MDCK, ki smo jih za 24 ur izpostavili ND ZnO, je prišlo do koncentracijsko odvisnega zmanjšanja ravni CAT (slika 10). Statistično značilna razlika z K^- je bila le pri najvišji uporabljeni koncentraciji - 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sharma V in sod. (28) so zaznali zmanjšanje aktivnosti CAT na človeških epidermalnih celicah že pri koncentracijah 0,8 in 0,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ND ZnO. Do statistično značilnega zmanjšanja aktivnosti CAT v primerjavi z K^- je prišlo tudi pri mikrodelcih ZnO. S koncentracijo H_2O_2 pa se je aktivnost CAT manjšala.



Slika 10: Rezultati merjenja aktivnosti CAT

ND (nano) ZnO, mikrodelce (mikro) ZnO in H₂O₂ smo 24 ur testirali na celicah MDCK. Posamezen stolpec prikazuje povprečje 6 ponovitev za K⁺, ND ZnO in H₂O₂ ter 2 ponovitvi za mikrodelci ZnO. Na sliki je prikazan standardni odklon. Razlika med K⁺ in ZnO je bila ocenjena s t-testom. *: razlika z K⁺ je statistično značilna ($p < 0,05$).

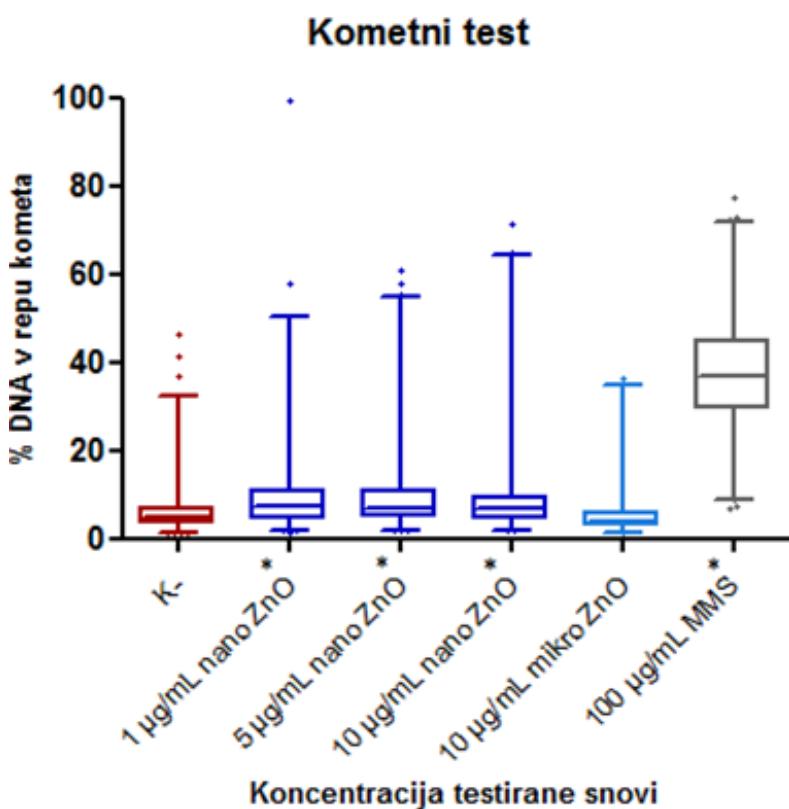
6.3 GENOTOKSIČNOST NANODELCEV ZnO

6.3.1 Rezultati kometnega testa

Pri vseh treh koncentracijah ND ZnO (1, 5, 10 µg/mL) je prišlo do statistično značilnega povečanja % DNA v repu kometa v primerjavi z K⁺ ($p < 0,05$) (slika 11). Iz statistične analize (Dunnov posttest) smo ugotovili, da se rezultati med različnimi koncentracijami ND ZnO niso statistično značilno razlikovali. Rezultati torej kažejo, da imajo ND ZnO (nizek) genotoksičen učinek, vendar ta ni koncentracijsko odvisen. Dosedanje objave o genotoksičnosti ND ZnO kažejo na koncentracijsko odvisnost (1), zato smo tudi mi to pričakovali. Guan R in sod. (1) so 24 ur tretirali celic HEK293 in LO2 z ND ZnO. Rezultati njihove raziskave kažejo na koncentracijsko odvisno povišanje % DNA v repu v primerjavi s kontrolnimi celicami, statistično značilno povečanje poškodb DNA pa so zaznali pri koncentracijah nad 5 µg/mL. Do koncentracijske neodvisnosti genotoksičnosti, ki smo jo dobili pri ND ZnO, je lahko prišlo zaradi tvorbe agregatov (sami jih nismo dokazovali, nanje lahko sklepamo iz DLS analize v vodni raztopini glukoze) pri višji

koncentraciji, ti pa so zaradi svoje velikosti onemogočili prehod ND v celico. Znotrajcelični delci lahko dobijo dostop do DNA po lizi med izvedbo samega testa (12). Možno je, da je do tega prišlo pri ND ZnO in smo zato zaznali koncentracijsko neodvisne poškodbe DNA. Na % DNA v repu kometa so lahko vplivali tudi ND ZnO v jedru, ki se še niso raztopili. Ti lahko ovirajo potovanje DNA in tako pride do manjše količine DNA v repu kometa (12).

Rezultati kometnega testa z mikrodelci ZnO se statistično značilno niso razlikovali od K⁺ (slika 11), torej niso imeli genotoksičnega učinka na celice MDCK. Rezultati kažejo, da je genotoksičnost povezana z velikostjo delcev ZnO; pri prehodu iz mikro na nano velikost se poveča njihov genotoksičen učinek. Do podobnega zaključka so prišli tudi Hackenberg S in sod. (32), ki so prav tako uporabili kometni test in z njim pokazali genotoksičnost ND ZnO in negenotoksičnost večjih delcev ZnO (< 5 µm).



Slika 11: Rezultati kometnega testa

Izbrane koncentracije ND (nano) in mikrodelcev (mikro) ZnO ter MMS (K⁺) smo 24 ur testirali na celicah MDCK. Zajetih je 410 kometov celic pri K⁺, 300 kometov celic pri vsaki koncentraciji ND ZnO, 120 kometov celic pri mikrodelcih ZnO in 360 kometov celic pri MMS. Okvirji z ročaji zajemajo 1-99 % vseh vrednosti. Razlika med kontrolnimi celicami in celicami tretiranimi s ZnO in MMS je bila ocenjena s Kruskal-Wallis-ovo statistiko, ter z uporabo neparametričnega Dunn-ovega primerjalnega testa. *: razlika z K⁺ je statistično značilna ($p < 0,05$).

Če je raven ROS v celicah izpostavljenih ND enaka kot v netretiranih, pričakujemo nizko genotoksičnost (14). V našem primeru je bila raven ROS statistično značilno večja kot pri kontrolnih celicah pri vseh koncentracijah ND ZnO, zato lahko sklepamo, da je prišlo do genotoksičnosti zaradi ROS.

Za tretiranje 24 ur smo se odločili, ker je v tem času omogočen dostop do jedra in s tem do DNA med celično delitvijo tudi ND, ki so preveliki, da bi prešli pore jedrne membrane ($> 10 \mu\text{m}$). Ker so DNA poškodbe povezane s celično smrtjo (12), je pomembno, da se izognemo pretirani citotoksičnosti. Zato smo predhodno izvedli testa citotoksičnosti – test MTT in test z nevtralno rdečim. Uporabili smo koncentracije delcev, pri katerih sta testa pokazala, da se viabilnost celic ne zmanjša za več kot 25 %. Če bi uporabili koncentracije, pri kateri se viabilnost zmanjša za več kot 25 %, bi lahko dobili lažno pozitivne rezultate, ki ne odražajo genotoksičnosti, ampak DNA poškodbe povezane s citotoksičnostjo (57).

Kometni test smo izvedli pri alkalnih pogojih ($\text{pH} > 13,0$) zato, da smo povečali njegovo občutljivost – pri $\text{pH} > 12,6$ se alkalno labilna mesta pretvorijo v enojne prelome dvovijačne DNA (57).

Celoten postopek optimizacije kometnega testa je bil dolgotrajen. Za celice MDCK namreč še ni uvedenega protokola za kometni test, tako da smo ga morali sami zasnovati. Poleg tega na sam test vpliva veliko dejavnikov - od okolja (temperatura, osvetljenost), do materialov (mikroskopska stekelca – gladka/brušena), aparatur (naprava za elektroforezo) in osebe, ki izvaja ocenjevanje kometov.

V fazi pred določitvijo optimalnega protokola za kometni test smo pri vsaki ponovitvi izvedli poskus le z $100 \mu\text{g/mL}$ MMS, kot K^- pa smo celicam dodali sam medij za celice MDCK. Za MMS je znano, da povzroča poškodbe DNA (57), zato smo ga uporabili kot K^+ .

Prilagoditev protokola za kometni test za celice MDCK:

1) Prilagoditev pogojev

Lažno pozitivni rezultati. V začetnih stopnjah izvedbe kometnega testa smo dobivali poškodbe DNA (visok % DNA v repu kometa) pri K^+ in pri K^- . Ugotovili smo, da pride do poškodb DNA zaradi temperature (pri sobni temperaturi so aktivne DNaze, ki razgrajujojo DNA). V nadaljnjih ponovitvah testa smo imeli mikrocentrifugirke s

celicami ves čas na ledu in s tem preprečili neželene poškodbe DNA (poškodbe, ki jih niso povzročili tretmaji). Poleg tega smo imeli celice med celotnim poskusom v temi (pokrite s folijo) in tudi s tem preprečili neželene poškodbe (poškodbe baz DNA zaradi svetlobe).

2) Prilagoditev elektroforeze

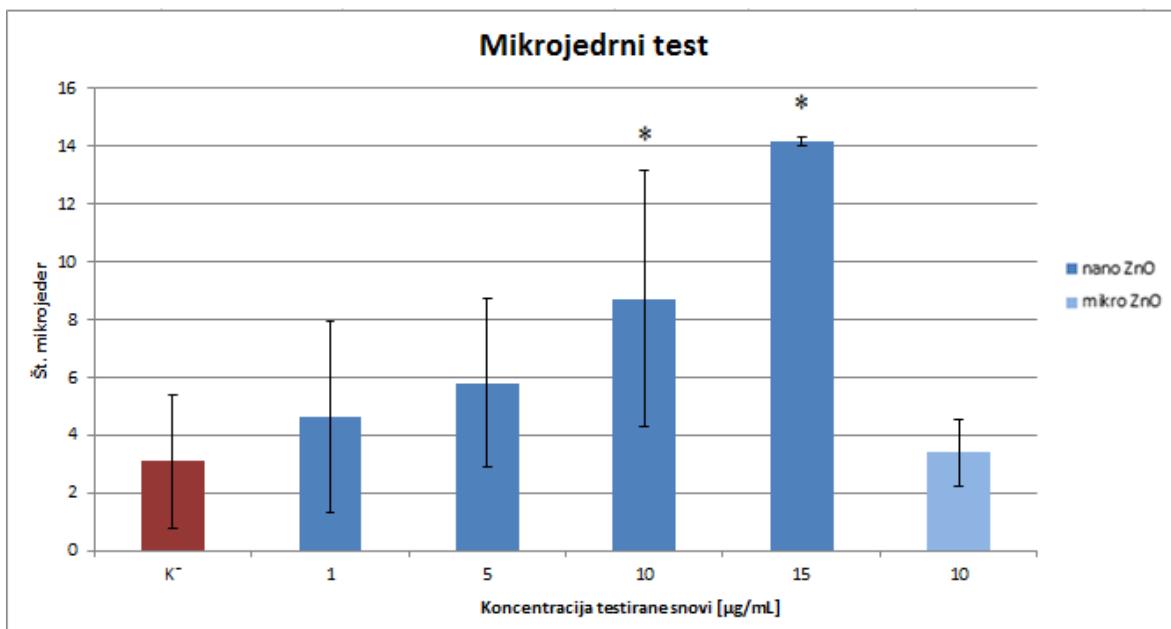
Lažno negativni rezultati in '*halo*' oblika kometov. Elektroforezo smo najprej izvajali 20 minut na 25 V, 200 mA in 20 W. Dobili smo le glave kometov – brez poškodb pri K⁺. Nato smo elektroforezo podaljšali na 30 minut. Dobili smo '*halo*' oblike DNA namesto kometov pri K⁺, pri K⁻ pa le glave kometov. Na dolžino repa oz. na to, da prelomljena DNA lahko potuje med elektroforezo, vplivata predvsem elektroforeza sama in pa alkalna liza. Najprej smo povečali tok, to je na 400 mA in podaljšali čas elektroforeze na 40 minut. Pri tem smo dobili komete, ki bi se jih že dalo oceniti – pri K⁻ ni bilo repov, pri K⁺ pa kratki repi, vendar je bil v njih visok % DNA. Vseeno pa smo se odločili, da spremenimo še pogoje alkalne lize: zmanjšali smo koncentracijo soli. Z zmanjšano koncentracijo soli in 40 minutno elektroforezo pri 25 V, 200 mA in 20 W smo dobili komete želene oblike (poškodovana DNA se ni nabirala okrog jedra ('*halo*' oblika), ampak je bila v repu kometa). Slike kometov K⁻ in K⁺ kontrole so podane v prilogi G.

Program Komet nam je izračunal delež DNA v repu kometa, dolžino repa kometa in moment repa. Pri rezultatih smo uporabili odstotek DNA v repu, ta namreč zajame največje območje poškodb in je linearno povezan s številom prelomov v tem območju (12). Program Komet je bil izdelan na Fakulteti za računalništvo in informatiko. Za ocenjevanje kometov obstaja več programov; poleg programa Komet, ki ga uporablja v raziskovalni skupini Bionanoteam na Biotehniški fakulteti, se uporablja še program Comet Assay IV idr.. Programska oprema za kometni test je zelo draga, odprtakodna pa v večini primerov zelo nenatančna. V letošnjem letu pa so Gyori BM in sod. (58) izdelali odprtakodni program OpenComet, ki omogoča natančno avtomatsko analizo kometov. Program Komet, ki smo ga uporabili, prav tako omogoča avtomatsko analizo, vendar ne omogoča zadostne točnosti (pravilne ločitve med repom in glavo kometa), zato smo se odločili za ročno ocenjevanje kometov s pomočjo omenjenega programa.

6.3.2 Rezultati mikrojedrnega testa

Pojav mikrojeder v deleči se celici nam pove, da je prišlo do prelomov kromosoma, izgube centromer in/ali da celi kromosomi niso mogli potovati na pole vretena med mitozo (46, 49). Rezultati mikrojedrnega testa kažejo, da se poškodbe kromosomov stopnjujejo s povečevanjem koncentracije ND ZnO (slika 12). Pri koncentracijah 1 in 5 µg/mL je v primerjavi z K⁺ prišlo do povečanja števila mikrojeder, vendar se vrednosti ne razlikujeta statistično značilno od K⁺. Pri 10 in 15 µg/mL pa se rezultata statistično značilno razlikujeta od K⁺ ($p < 0,05$). To pomeni, da imajo ND ZnO pri koncentraciji nad 10 µg/mL (vključno z 10 µg/mL) genotoksičen učinek na celice MDCK. Povzročili so lahko strukturne nepravilnosti kromosomov (klastogeni učinki), do katerih je prišlo zaradi dvojnih prelomov DNA in/ali številčne nepravilnosti kromosomov (anevgeni učinki), nastale zaradi lezij v proteinih mitotskih aparatov (49). Sklepamo lahko, da v primeru, da bi ND ZnO prišli do ledvic, kar bi bilo možno po dolgotrajnih izpostavitvah samim ND ZnO ali kozmetičnim izdelkom z ND ZnO, bi najverjetneje delovali genotoksično na epitelijске ledvične celice. Tako je pomembno, da pri uporabi višjih koncentracij ND ZnO v kozmetičnih izdelkih uporabimo take ovoje, nosilne sisteme in formulacije, ki bodo preprečile potencialen prehod v žive plasti kože oz. ne bodo povečevale dermalne permeabilnosti in s tem preprečile možnost prehoda v sistemski krvni obtok ter ledvica.

Pri mikrodelcih ZnO ni prišlo do statistično značilnega povečanja števila mikrojeder (slika 12), kar pomeni, da pri koncentraciji 10 µg/mL nimajo genotoksičnega učinka na celice MDCK.



Slika 12: Rezultati mikrojedrnega testa

Izbrane koncentracije ND (nano) in mikrodelcev (mikro) ZnO smo 24 ur testirali na celicah MDCK. Vsak stolpec predstavlja povprečje 6 ponovitev. Mikrojedra so bila vsakič prešteta na 500 dvojedrnih celicah. Prikazana je standardna deviacija. *: statistično značilno odstopanje od K^+ ($p < 0,05$). Na grafu ni prikazane K^+ zaradi bolj nazornega prikaza genotoksičnosti ZnO (priloga H).

Pri tej metodi smo želeli dobiti celice z dvema jedroma, zato smo celice tretirali z inhibitorjem polimerizacije aktina - cytoB, ki zaustavi delitev celice (citokinezo), ne pa delitev jedra (mitoze) (46). Za 24-urno testiranje ZnO smo se odločili zato, ker v tem času pride pri celicah MDCK do mitoze. Med mitozo se namreč jedrna membrana odstrani, s čimer pridobijo ND možnost direktnega stika s kromatinom in mitotskim aparatom. Celice smo izpostavili cytoB po končani inkubaciji z ND ZnO zato, da smo se izognili zmanjšanemu privzemju ND v celice, do katerega bi lahko prišlo zaradi inhibicije aktina. V primeru, če bi izpostavili celice ZnO in cytoB istočasno za 24 ur, bi lahko dobili manjše povečanje mikrojeder (59). Poleg tega smo želeli zajeti vse celice v procesu prve delitve jedra, torej kot dvojedne – potrebna je bila 24-urna inkubacija s cytoB. CytoB potrebuje do 6 ur, da inhibira citokinezo (46), zato je bilo pomembno, da smo ga dodali takoj po 24-urnem testiranju.

ND ZnO smo testirali v štirih koncentracijah na celicah MDCK, te so bile: 1, 5, 10 in 15 $\mu\text{g/mL}$. Predvsem nas je zanimalo, če pride do klastogenega učinka pri koncentracijah 1, 5 in 10 $\mu\text{g/mL}$. Koncentracije 15 $\mu\text{g/mL}$ ne smemo upoštevati pri vrednotenju vpliva ND ZnO na mutacije kromosomov, saj se viabilnost celic pri teh koncentracijah zmanjša za več kot 55 % in bi s tem lahko vrednotili sekundaren učinek citotoksičnosti in ne (primarnega)

klastogenega učinka (45). Koncentracijo 15 µg/mL smo uporabili zgolj za boljšo ponazoritev koncentracijske odvisnosti ND ZnO na poškodbe kromosomov. Poleg tega je zaradi prisotnosti ND na mikroskopskih stekelcih, ki lahko motijo ocenjevanje, mikrojedrni test težko uporabiti za višje koncentracije ND (12).

Pri barvanju DNA smo uporabili 2 barvili: PI in Hoechst 33258. PI smo uporabili, ker je poleg DNA blago obarval celotno celico (rdeča fluorescencija) in smo tako lažje ločili meje med celicami pri ocenjevanju poškodb DNA. Hoechst 33258 pa obarva samo jedro (svetlo plava fluorescencija) in smo tako lahko jasno ločili jedra in mikrojedra od celotnih celic (priloga H). Poškodbe DNA smo ocenjevali tako, da smo prešeli mikrojedra v vseh celicah z dvema jedroma; lahko bi šteli še mostičke, brste in apoptotske celice (46). Ocenili smo 500 dvojedrnih celic na vzorec (stekelce). Samo dvojedrne celice smo šteli zato, ker ne vemo, kaj se zgodi z mikrojedri po več kot eni delitvi jedra (46); celice z več jedri so končale več delitev jedra, enojedrne pa se še niso delile, tako da ne more sploh priti do nastanka mikrojedra.

Razprava o oksidativnem stresu, genotoksičnosti ter varnosti nanodelcev ZnO

Za ND ZnO je bilo do sedaj dokazano, da sprožijo oksidativni stres v celicah A549, bronhialnih epitelnih celicah (BEAS-2B), monocitih in limfocitih, da pride do nastanka ROS pa je bilo dokazano poleg v že naštetih celicah, tudi v keratinocitih (NCTC2544), primarnih srčnih mikrovaskularnih celicah, hepatoceličnih rakavih celicah (HepG2), glomerulnih mezangijskih celicah (IP15), proksimalnih epitelnih celicah, celicah človeškega amelanotičnega melanoma (A375) in primarnih astrocitih (24, 60, 61). Poleg tega, da ND ZnO sprožijo oksidativni stres in povročijo povečanje ravni ROS, je bilo zanje dokazano tudi, da povzročijo genotoksičnost, in sicer v človeških epidermalnih keratinocitih, človeških jetrnih celicah (HepG2), A549, mišjih embrionalnih fibroblastih, A431, Hep2, človeških embrionalnih ledvičnih celicah (HEK293), LO2, mišjih embrionskih fibroblastih (NIH/3T3), človeških celicah nosne sluznice, človeških SHSY5Y nevronskega celica in CHO celicah (1, 4, 7, 15, 24, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34). V naši raziskavi pa smo pokazali, da pride do oksidativnega stresa in genotoksičnega učinka tudi v celicah MDCK.

V večini raziskav o penetraciji ND ZnO skozi kožo je bilo dokazano, da ND ZnO ne preidejo v žive plasti kože (ostanejo v roženi plasti), v nekaj primerih pa je bilo dokazano

tudi obratno – manjši delež ND ZnO se je pojavil tudi v živih plasteh kože (te študije so bile večinoma narejene na brezdlakavih miših, ki imajo tanjšo kožo od človeške). Potrebne pa so še študije s simulacijo realnih življenjskih razmer, predvsem v povezavi z izpostavitvijo UV svetlobi in s sončnimi opeklinami. Pri sončnih opeklinah ali drugih motnjah rožene plasti (ureznine, dermatoze) je zaradi poškodovane kožne bariere penetracija povečana (29) in s tem je povezana zmožnost ND ZnO, da vstopijo v sistemski krvni obtok ter nadalje potujejo po telesu in kopičijo v organih. Do sistemskih izpostavitev ND ZnO lahko pride tudi z vdihavanjem in zaužitjem med proizvodnjo samih ND ZnO in izdelavo kozmetičnih izdelkov z ND ZnO. Pri zaužitju ND ZnO je bilo dokazano, da pride do sistemskih izpostavitev in kopičenja v določenih organih, med drugimi tudi v ledvicah (1, 3, 4); s tem so delavci, ki niso zadostno zaščiteni, izpostavljeni potencialni genotoksičnosti ND ZnO.

7 SKLEPI

Naši rezultati kažejo, da ND ZnO povzročijo citotoksičnost in oksidativni stres v celicah MDCK. Opazili smo tudi poškodbe DNA in kromosomov, do katerih najverjetneje pride zaradi oksidativnega stresa.

- ND in mikrodelci ZnO so pokazali koncentracijsko odvisen citotoksičen učinek na celice MDCK. Metabolna aktivnost mitohondrijev se je statistično značilno zmanjšala pri $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, stabilnost lizosomov pa pri $15 \mu\text{g}/\text{mL}$. Med citotoksičnostjo ND in mikrodelcev ni bilo večje razlike, oboji so imeli citotoksičen učinek nad koncentracijo $10 \mu\text{g}/\text{mL}$.
- Raven ROS se je povečevala s koncentracijo ND ZnO, statistično značilno se je povečala že pri najnižji uporabljeni koncentraciji, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$. Sami ND niso sprožili nastanka ROS v mediju, koncentracija ROS se je povečala šele v kombinaciji celic in ND. ROS so lahko nastali zaradi ionov Zn^{2+} sproščenih iz površine ND ali zaradi motenega metabolizma celice, zlasti pri oviranem delovanju dihalne verige, ki poteka v mitohondrijih. Tudi mikrodelci ZnO so pri uporabljeni testni koncentraciji, to je $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, povzročili povečanje ravni ROS v celicah.
- Aktivnost GST in CAT v celicah MDCK se je po tretiranju z ND ZnO zmanjšala. Aktivnost GST se je statistično značilno zmanjšala nad koncentracijo $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, aktivnost GST pa nas $15 \mu\text{g}/\text{mL}$. To kaže, da je prišlo do oksidativnega stresa v celicah, ki ga je povzročilo neravnoesje med nastanjem ROS in antioksidativno obrambo celice (1). Rezultati testa s H₂DCFDA in testiranja aktivnosti encimov se dopolnjujeta; s testom s H₂DCFDA smo dokazali povečanje ravni ROS v celicah, s spremljanjem aktivnosti GST in CAT pa smo pokazali zmanjšano zmožnost obrambe celic pred oksidativnim stresom. Mikrodelci ZnO so pri koncentraciji $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ povzročili statistično značilno zmanjšanje aktivnosti CAT, ne pa zmanjšanja aktivnosti GST.
- ND ZnO imajo genotoksičen učinek na celice MDCK, povzročijo prelome DNA ter klastogene oz. anevgene učinke. Vse uporabljene testne koncentracije ND ZnO, 1 , 5 , $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, so povzročile statistično značilno povečanje % DNA v repu kometa. Do statistično značilnega povečanja števila mikrojeder pa je prišlo pri koncentraciji $10 \mu\text{g}/\text{mL}$. Mikrodelci ZnO niso pokazali genotoksičnosti.

Za ND ZnO lahko torej sklepamo, da so poškodbe DNA in kromosomov ter citotoksičnost povezane z zmanjšanjem aktivnosti GST in CAT ter nastankom znotrajceličnih ROS.

Uspešno smo optimizirali test s H₂DCFDA, kometni test in mikrojedrni test za celice MDCK. Omenjeni testi se bodo lahko uporabljali za testiranje tudi drugih tipov ND, za katere nas zanima potencialna sprožitev oksidativnega stresa in potencialen genotoksičen učinek.

Testiranja, ki bi dopolnila našo raziskavo in bi jih bilo še vredno izvesti, so: izvedba testov oksidativnega stresa in genotoksičnosti za različne koncentracije mikrodelcev ZnO na celicah MDCK ter izvedba testov citotoksičnosti, oksidativnega stresa in genotoksičnosti za ZnCl₂ na celicah MDCK. S testiranjem mikrodelcev ZnO pri različnih koncentracijah in primerjavo z ND ZnO bi dobili bolj nazorno sliko, če velikost delcev res vpliva na nastanek oksidativnega stresa v celicah in njihov genotoksičen učinek. S testiranjem ZnCl₂ pa bi ugotovili, če do citotoksičnosti, oksidativnega stresa in genotoksičnosti pride le zaradi iz ND sproščenih ionov (Zn²⁺) ali zaradi ND samih.

LITERATURA

1. Guan R, Kang T, Lu F, Zhang Z, Shen H, Liu M: Cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity in human hepatocyte and embryonic kidney cells exposed to ZnO nanoparticles. *Nanoscale Research Letters* 2012; 7: 602.
2. Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Möller L: Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol* 2008; 21(9): 1726-32.
3. Wang B, Feng W, Wang M, Wang T, Gu Y, Zhu M, Ouyang H, Shi J, Zhang F, Zhao Y, Chai Z, Wang H, Wang J: Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *J Nanopart Res* 2008; 10(2): 263-276.
4. Zheng Y, Li R, Wang Y: In vitro and in vivo biocompatibility of ZnO nanoparticles. *Int J Mod Phys B* 2009; 23: 1566–1571.
5. Ahamed M, Karns M, Goodson M, Rowe J, Hussain SM, Schlager JJ, Hong Y: DNA damage response to different surface chemistry of silver nanoparticles in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008; 233(3): 404-10.
6. Dhawan A, Sharma V, Parmar D: Nanomaterials: A challenge for toxicologists. *Nanotoxicology* 2009; 3(1): 1-9.
7. Jassby D: Impact of Particle Aggregation on Nanoparticle Reactivity. Disertacija, Duke University 2011.
8. TMDA: About Titanium Dioxide. 2012.
http://www.cinkarna.si/si/files/default/tio2/tdma_about_tio2__final_29032012.pdf
(20. 7. 2014)
9. Davé R, Gupta R, Pfeffer R: Deagglomeration and Mixing of Nanoparticles. NFS Nanoscale Science and Engineering Grantees Conference 2006; Grant # : 0506722.
10. Pujalté I, Passagne I, Brouillaud B, Tréguer M, Durand E, Ohayon-Courtès C, L'Azou B: Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic

- nanoparticles on human kidney cells. Particle and Fibre Toxicology 2011; 10: 1-16.
11. Brown RB, Audet J: Current techniques for single-cell lysis. J R Soc Interface 2008; 5(2): S131-S138.
 12. Karlsson HL: The comet assay in nanotoxicology research. Anal Bioanal Chem. 2010; 398(2): 651-66.
 13. Singh N, Manshian B, Jenkins GJ, Griffiths SM, Williams PM, Maffeis TG, Wright CJ, Doak SH: NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. Biomaterials 2009; 30(23-24): 3891-914.
 14. Triboulet S, Aude-Garcia C, Armand L, Gerdil A, Diemer H, Proamer F, Collin-Faure V, Habert A, Strub JM, Hanau D, Herlin N, Carrière M, Van Dorsselaer A, Rabilloud T: Analysis of cellular responses of macrophages to zinc ions and zinc oxide nanoparticles: a combined targeted and proteomic approach. Nanoscale 2014; 6(11): 6102-14.
 15. Valdiglesias V, Costa C, Kiliç G, Costa S, Pásaro E, Laffon B, Teixeira JP: Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. Environ Int 2013; 55: 92-100.
 16. Gilbert B, Fakra SC, Xia T, Pokhrel S, Mädler L, Nel AE: The fate of ZnO nanoparticles administered to human bronchial epithelial cells. ACS Nano 2012; 6(6): 4921-30.
 17. Smijs TG, Pavel S: Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness. Nanotechnol Sci Appl 2011; 4: 95–112.
 18. SCCS: ADDENDUM to the OPINION SCCS/1489/12 on Zinc oxide (nano form). 2014.
 19. Yin H, Casey PS, McCall MJ: Surface modifications of ZnO nanoparticles and their cytotoxicity. J Nanosci Nanotechnol 2010; 10(11): 7565-70.
 20. Jain SK: Multiparticulate carriers for sun-screening agents. Int J Cosmet Sci 2010; 32(2): 89-98.

21. Xia Q, Saupe A, Müller RH, Souto EB: Nanostructured lipid carriers as novel carrier for sunscreen formulations. *Int J Cosmet Sci* 2007; 29(6): 473-82
22. Yin H, Casey PS, McCall MJ, Fenech M: Effects of Surface Chemistry on Cytotoxicity, Genotoxicity, and the Generation of Reactive Oxygen Species Induced by ZnO Nanoparticles. *Langmuir* 2010; 26(19): 15399–15408.
23. Magdolenova Z, Collins A, Kumar A, Dhawan A, Stone V, Dusinska M: Mechanisms of genotoxicity. A review of in vitro and in vivo studies with engineered nanoparticles. *Nanotoxicology* 2014; 8(3): 233-78.
24. Vandebriel RJ, De Jong WH: A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnol Sci Appl* 2012; 5: 61–71.
25. Dudev T, Lim C: Metal binding affinity and selectivity in metalloproteins: Insights from computational studies. *Ann Rev Biophys* 2008; 37: 97–116.
26. Chang YN, Zhang M, Xia L, Zhang J, Xing G: The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials* 2012; 5(12): 2850-2871.
27. 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 particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol* 2009; 29(1): 69-78.
28. Sharma V, Shukla RK, Saxena N, Parmar D, Das M, Dhawan A: DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol Lett* 2009; 185(3): 211-8.
29. Sharma V, Singh SK, Anderson D, Tobin DJ, Dhawan A: Zinc Oxide Nanoparticle Induced Genotoxicity in Primary Human Epidermal Keratinocytes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2011; 11(5): 3782-3788(7).
30. Osman IF, Baumgartner A, Cemeli E, Fletcher JN, Anderson D: Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEp-2 cells. *Nanomedicine (Lond)* 2010; 5(8): 1193-203.
31. Demir E, Akça H, Kaya B, Burgucu D, Tokgün O, Turna F, Aksakal S, Vales G, Creus A, Marcos R: Zinc oxide nanoparticles: genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential. *J Hazard Mater* 2014; 15(264): 420-9.

32. Hackenberg S, Scherzed A, Technau A, Kessler M, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Burghartz M, Hagen R, Kleinsasser N: Cytotoxic, genotoxic and pro-inflammatory effects of zinc oxide nanoparticles in human nasal mucosa cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 2011; 25(3): 657-63.
33. Dufour EK, Kumaravel T, Nohynek GJ, Kirkland D, Toutain H: 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. *Mutat Res* 2006; 607(2): 215-24.
34. Moreno-Villanueva M, Eltze T, Dressler D, Bernhardt J, Hirsch C, Wick P, von Scheven G, Lex K, Bürkle A: The automated FADU-assay, a potential high-throughput in vitro method for early screening of DNA breakage. *ALTEX* 2011; 28(4): 295-303.
35. Li CH, Shen CC, Cheng YW, Huang SH, Wu CC, Kao CC, Liao JW, Kang JJ: Organ biodistribution, clearance, and genotoxicity of orally administered zinc oxide nanoparticles in mice. *Nanotoxicology* 2012; 6(7): 746-56.
36. Maioli E, Torricelli C, Fortino V, Carlucci F, Tommassini V, Pacini A: Critical Appraisal of the MTT Assay in the Presence of Rottlerin and Uncouplers. *Biological Procedures Online* 2009; 11: 227-240.
37. Mosmann T: Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983, 65: 55-63.
38. Twentyman PR, Luscombe M: A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer* 1987; 56: 279-285.
39. Repetto G, del Peso A, Zurita JL: Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008; 3(7): 1125-31.
40. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC: Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992; 5(2): 227-31.
41. Wang H in Joseph JA: Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999; 27(5-6): 612-6.

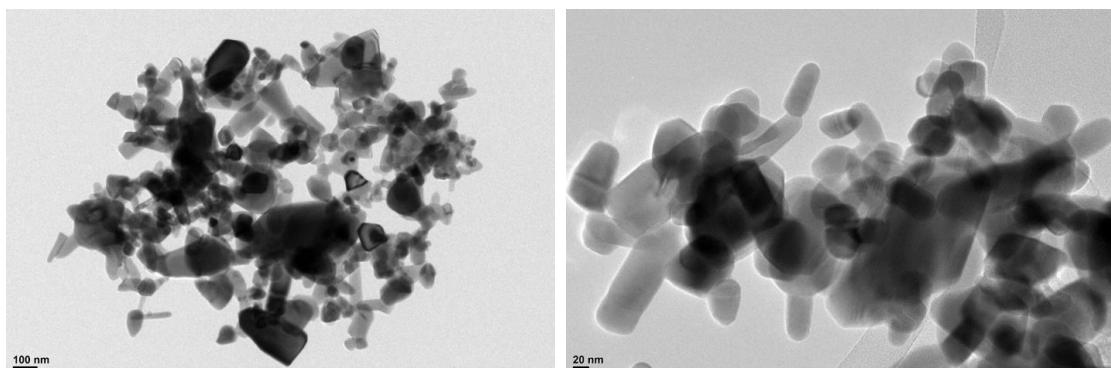
42. Ameziane-El-Hassani R, Dupuy C: Detection of Intracellular Reactive Oxygen Species (CM-H2DCFDA). Bio-protocol 2013. <http://www.bio-protocol.org/wenzhang.aspx?id=313> (25. 7. 2014)
43. Cayman chemical: Glutathione S-Transferase Assay Kit (Item No. 703302). <https://www.caymanchem.com/pdfs/703302.pdf> (27. 7. 2014)
44. Costantini D, Monaghan P, Metcalfe NB: Loss of integration is associated with reduced resistance to oxidative stress. *J Exp Biol* 2013; 15(216): 2213-20.
45. OECD: OECD guideline for the testing of chemicals: Proposal for updating Test Guideline 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. 2012.
46. Fenech M: The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000; 20/455(1-2): 81-95.
47. Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Ali D, Olin S, Riviere MN, Warheit D, Yang H: Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. Part Fibre Toxicol 2005; 6: 2-8.
48. Mosmann T: Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 65: 55-63.
49. Botta A in Benameur L: Nanoparticles Toxicity Mechanisms: Genotoxicity. *Nanoethics and Nanotoxicology* 2011; 111-146.
50. Stone V, Johnston H, Schins PFR: Development of in vitro systems for nanotoxicology: methodological considerations. *Critical Reviews in Toxicology* 2009; 39(7): 613-626.
51. Threes GS in Stanislav P (2011): Titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles in sunscreens: focus on their safety and effectiveness 2011; 4: 95–112.
52. Kocbek P, Teskac K, Kreft ME, Kristl J: Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO₂ nanoparticles. *Small* 2010; 6(17): 1908-17.

53. Sharma V, Anderson D, Dhawan A: Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis* 2012; 17(8): 852-70.
54. Kao YY, Chen YC, Cheng TJ, Chiung YM, Liu PS: Zinc oxide nanoparticles interfere with zinc ion homeostasis to cause cytotoxicity. *Toxicol Sci* 2012; 125(2): 462-72.
55. Deng X, Luan Q, Chen W, Wang Y, Wu M, Zhang H, Jiao Z. Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. *Nanotechnology* 2009; 20(11): 115101.
56. Chang YN, Zhang M, Xia L, Zhang J, Xing G: The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials* 2012; 5(12): 2850-2871.
57. Žegura B, Filipič M: Application of In Vitro Comet Assay for Genotoxicity Testing. *Methods in Pharmacology and Toxicology* 2004; 301-313.
58. Gyori BM, Venkatachalam G, Thiagarajan PS, Hsu D, Clement MV: OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. *Redox Biology* 2014; 2: 457-465.
59. Oesch F, Landsiedel R: Genotoxicity investigations on nanomaterials. *Arch Toxicol* 2012; 86(7): 985-94.
60. Wang J, Deng X, Zhang F, Chen D, Ding W: ZnO nanoparticle-induced oxidative stress triggers apoptosis by activating JNK signaling pathway in cultured primary astrocytes. *Nanoscale Research Letters* 2014; 9: 117.
61. Alarifi S, Ali D, Alkahtani S, Verma A: Induction of oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in a malignant human skin melanoma cell line after exposure to zinc oxide nanoparticles. *Int J Nanomed* 2013; 8: 983-93.

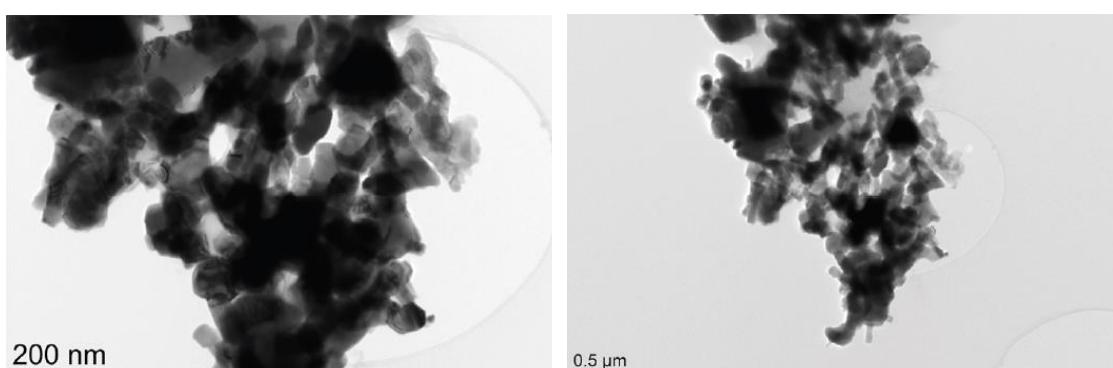
PRILOGE

Priloga A

KARAKTERIZACIJA NANODELCEV IN MIKRODELCEV ZnO



TEM analiza nanodelcev ZnO
(foto: Makovec in Dušak, 2012)



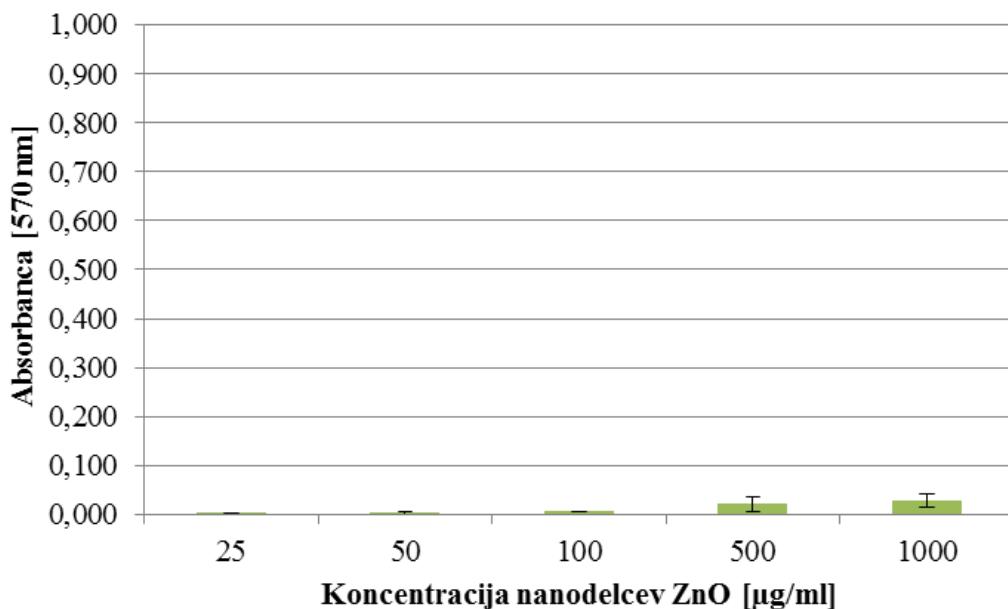
TEM analiza mikrodelcev ZnO
(foto: Makovec in Dušak, 2012)

Meritve DLS nanodelcev in mikrodelcev ZnO

Meritve delcev so bile izvedene v vodni raztopini glukoze. Določen delež nanodelcev in mikrodelcev ZnO je agregiral.

Nanodelci ZnO	20 – 200 (agregati) nm
Mikrodelci ZnO	200 – 850 (agregati) nm

Priloga B



Rezultati merjenja absorbance različnih koncentracij nanodelcev ZnO pri A₅₇₀
Testne koncentracije so podane na sliki. Posamezen stolpec prikazuje povprečje rezultatov 10 ponovitev.
Na sliki je prikazan tudi standardni odklon. (Veno Kononenko, 2013)

Priloga C

Sestavine medija za gojenje celične linije MDCK

Sestavine medija	Proizvajalec, kataloška številka	Končna koncentracija v mediju [%]
A-DMEM	Gibco, 12491-015	47,8
F-12 (mešanica hranil)	Gibco, 21127-022	47,8
FBS	Gibco, 10108-165	2,4
Glutamax / L-glutamine	Gibco, 35050-038	1,9
Penicilin-Streptomycin	Gibco, 15140-122	0,1

Priloga D

PRIPRAVA SUSPENZIJ NANODELCEV IN MIKRODELCEV ZnO

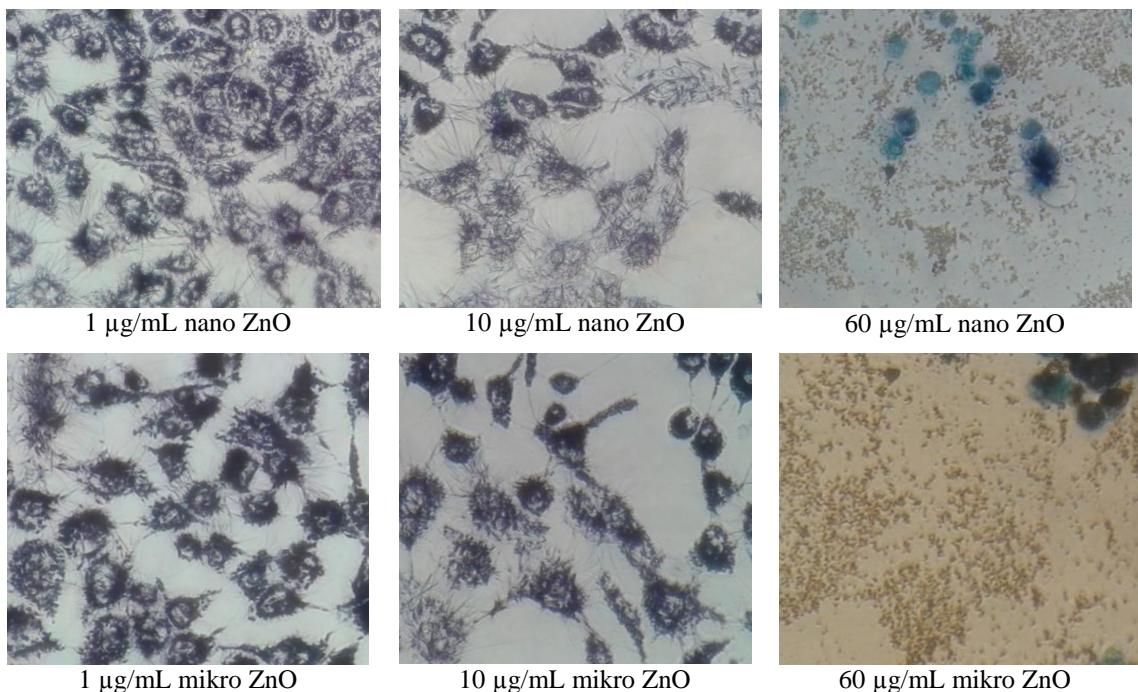
Za testiranje citotoksičnosti, oksidativnega stresa in genotoksičnosti smo pripravili založne suspenzije nanodelcev in mikrodelcev ZnO v dH₂O (nanodelci so bili v določenem deležu agregirani). Nanodelce in mikrodelce smo imeli v obliki praškov, zato smo pred pripravo

založnih suspenzij zatehtali ustreznne mase le-teh. Pripravljeni založni suspenziji smo sterilizirali z avtoklaviranjem pri standardnih pogojih (1,3 bar, 121 °C, 15 min). Pred vsako uporabo smo suspenziji nanodelcev in mikrodelcev 30 min sonicirali v ultrazvočni vodni kopeli. Končne koncentracije nanodelcev in mikrodelcev smo pripravili v mediju za gojenje celic MDCK.

Koncentracije nanodelcev in mikrodelcev ZnO

Delci	Koncentracija založne suspenzije	Koncentracija končne suspenzije
nano ZnO (<100 nm)	10 mg/mL	1 µg/mL 5 µg/mL 10 µg/mL 15 µg/mL 30 µg/mL 60 µg/mL
mikro ZnO (<1000 nm)	10 mg/mL	1 µg/mL 5 µg/mL 10 µg/mL 15 µg/mL 30 µg/mL 60 µg/mL

Priloga E

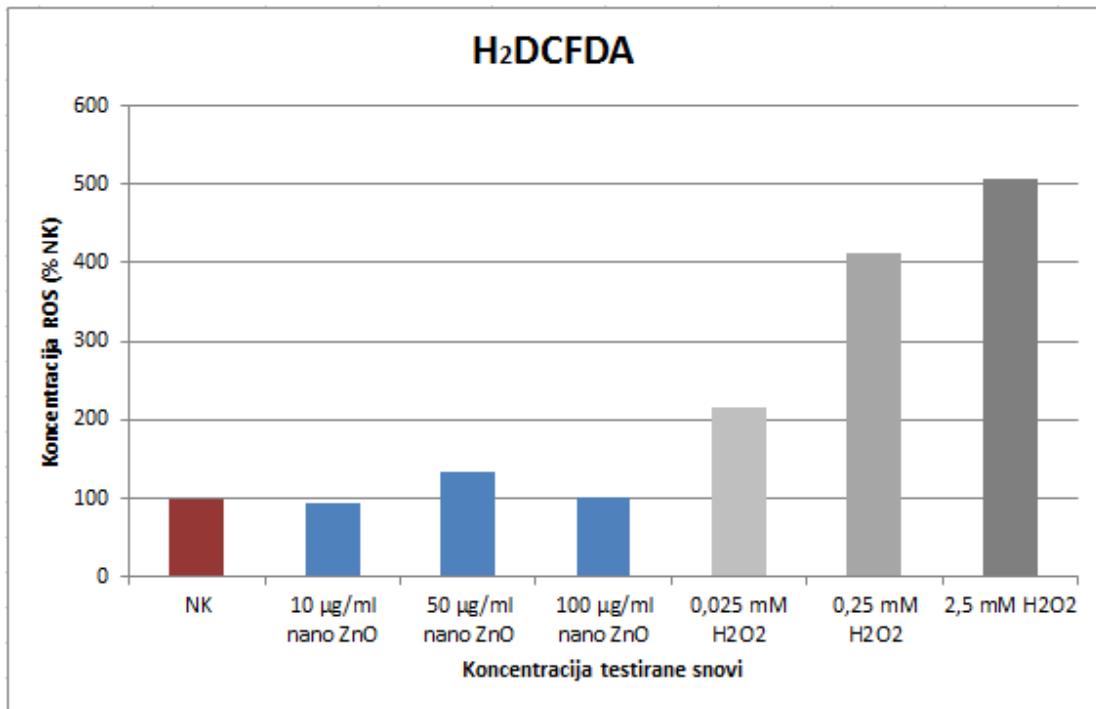


MTT test: slika celic MDCK tretiranih z nanodelci in mikrodelci ZnO po dodatku MTT reagenta pri 400 × povečavi

Pri 1 in 10 µg/mL so vidni kristali formazana, pri 60 µg/mL so vidni nanodelci oz. mikrodelci ZnO.

Priloga F

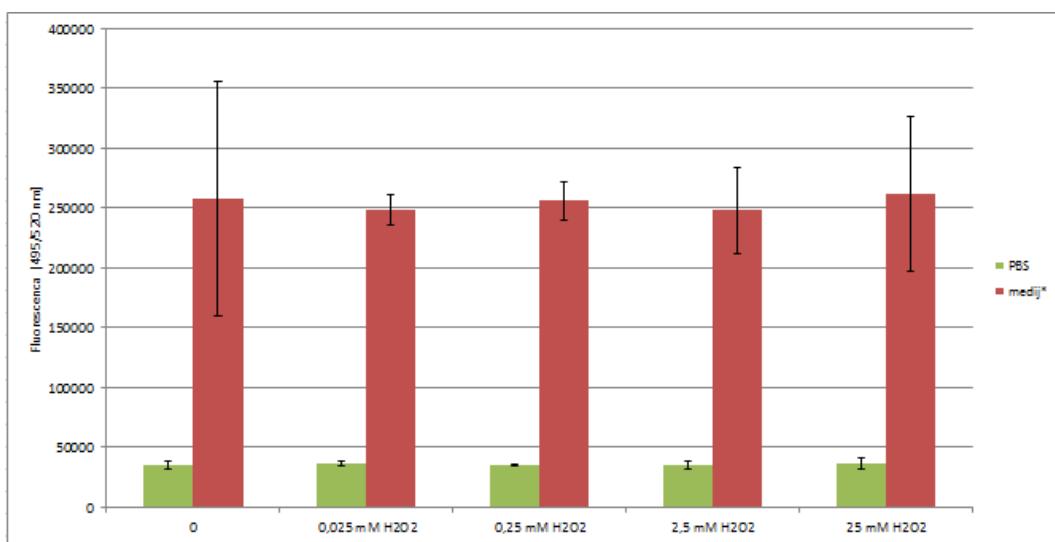
1)



Rezultati testa s H₂DCFDA brez celic

Suspenzijam ND ZnO, koncentracij 10, 50 in 100 µg/mL, ter 0,025, 0,25 in 2,5 mM H₂O₂ smo dodali H₂DCF. Po 24-urni inkubaciji smo izmerili fluorescenco nastalega DCF. Za K' smo imeli medij za celice MDCK brez fenol rdečega, kateremu smo dodali DCF. Fluorescensa se je povečala s koncentracijo H₂O₂.

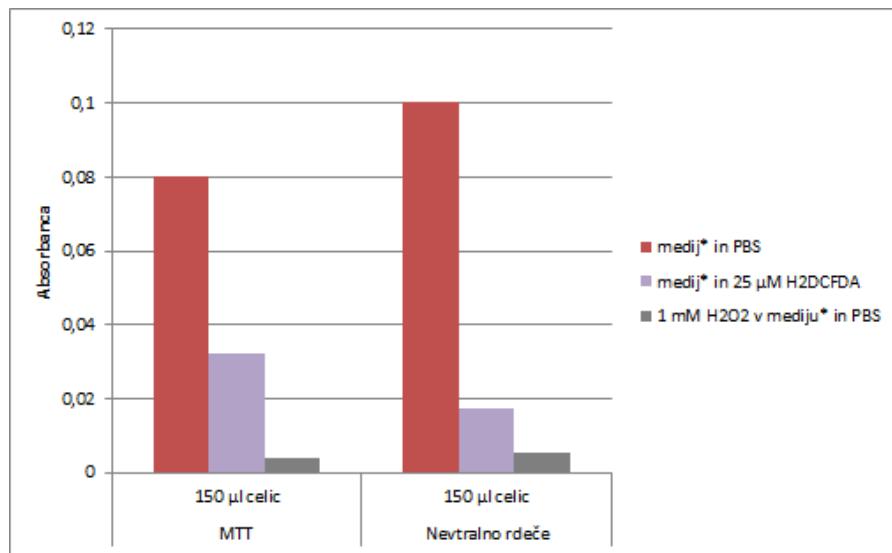
2)



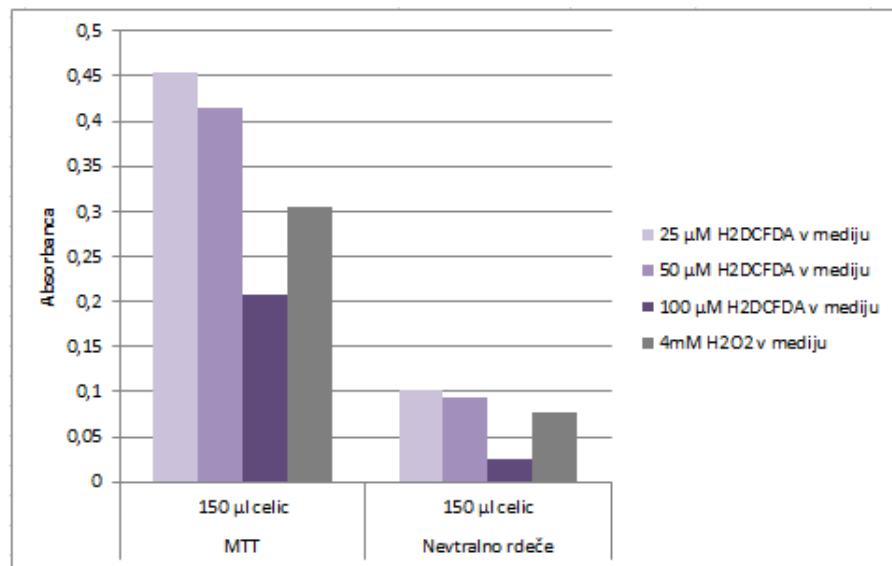
Fluorescensa PBS in medija z H₂O₂

Medij*: medij za celice MDCK brez fenol rdečega. Fluorescensa medija z različnimi koncentracijami H₂O₂ se ni spremnjala.

3)



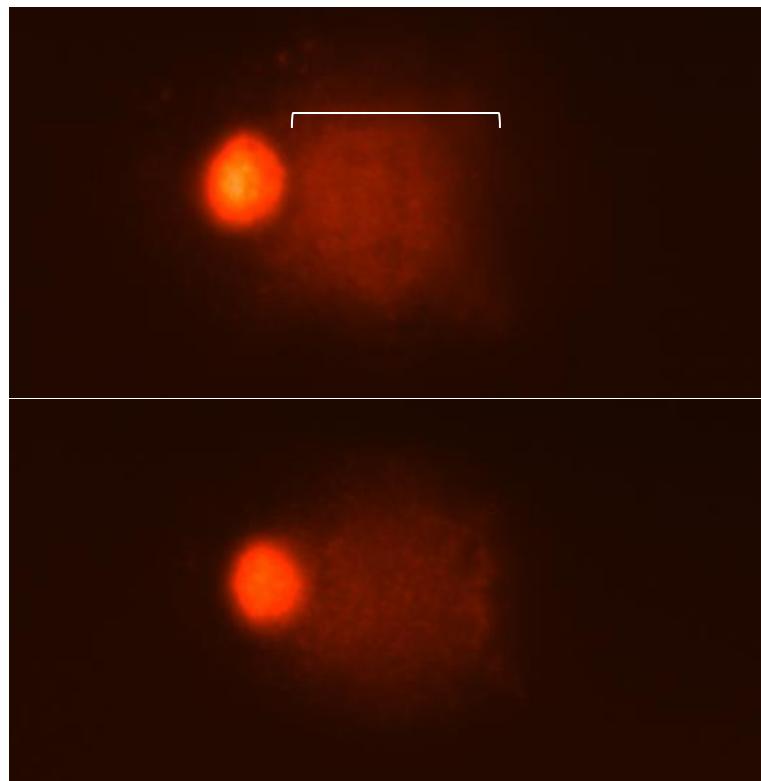
Test MTT in test z nevralno rdečim: PBS, H₂DCFDA in H₂O₂ smo testirali na celicah MDCK
Medij*: medij za celice MDCK brez fenol rdečega. Celice, ki smo jim dodali 1 mM H₂O₂ smo uporabili kot K⁺. Vitalnost celic MDCK se je po dodatku 25 µM barvila H₂DCFDA zmanjšala.



Test MTT in test z nevralno rdečim: Različne koncentracije H₂DCFDA smo testirali na celicah MDCK

Celice, ki smo jim dodali 4 mM H₂O₂ smo uporabili kot K⁺. Vitalnost celic MDCK se je zmanjševala s koncentracijo barvila H₂DCFDA. Po dodatku 50 in 100 µM barvila H₂DCFDA se je vitalnost celic toliko zmanjšala, da bi z uporabo takih koncentracij onemogočili pravilno izvedbo testa s H₂DCFDA.

Priloga G



Kometni test: celice, ki smo jim dodali MMS

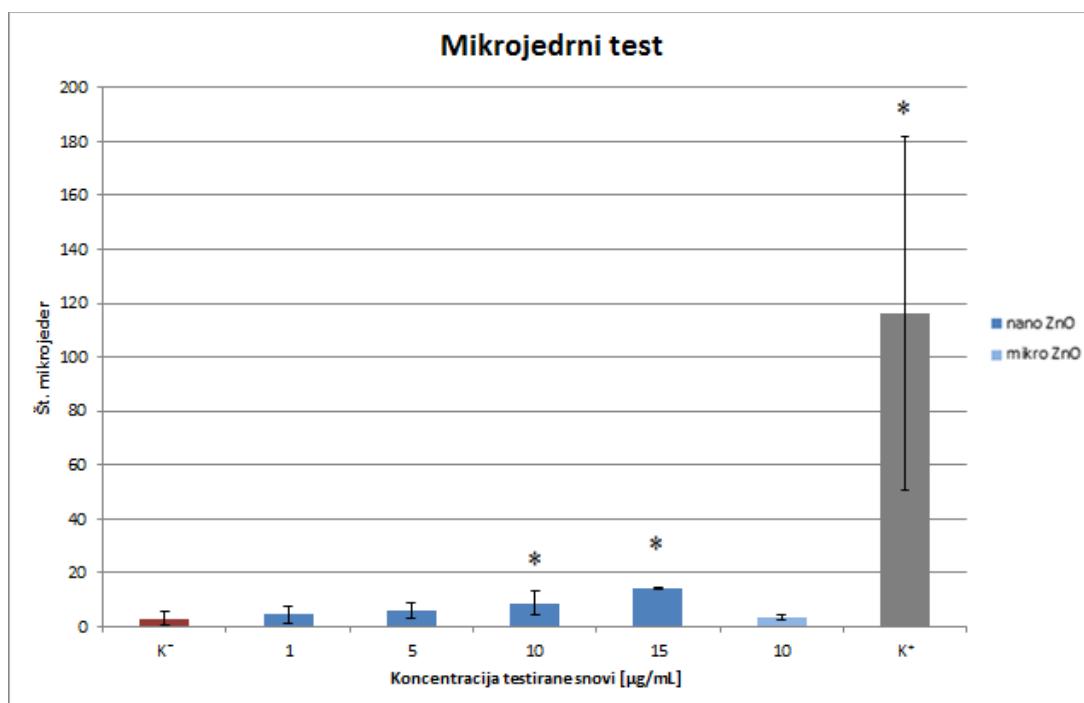
Celice MDCK smo izpostavili MMS (K^+) za 24 ur. Na sliki je viden visok % DNA v repu kometa (označen). Komete smo slikali z epifluorescentnim mikroskopom.



Kometni test: kontrolne celice

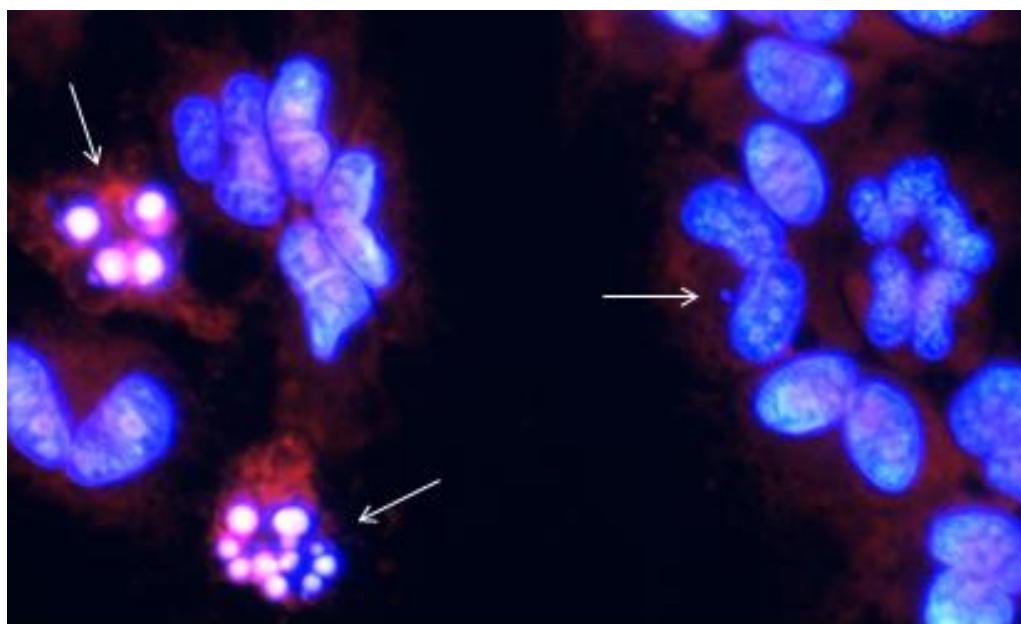
Celice MDCK smo 24 ur inkubirali s samim medijem za celice MDCK (K $^-$). Prišlo je do minimalnih poškodb DNA – zelo nizek % DNA v repu kometa. Komete smo slikali z epifluorescentnim mikroskopom.

Priloga H



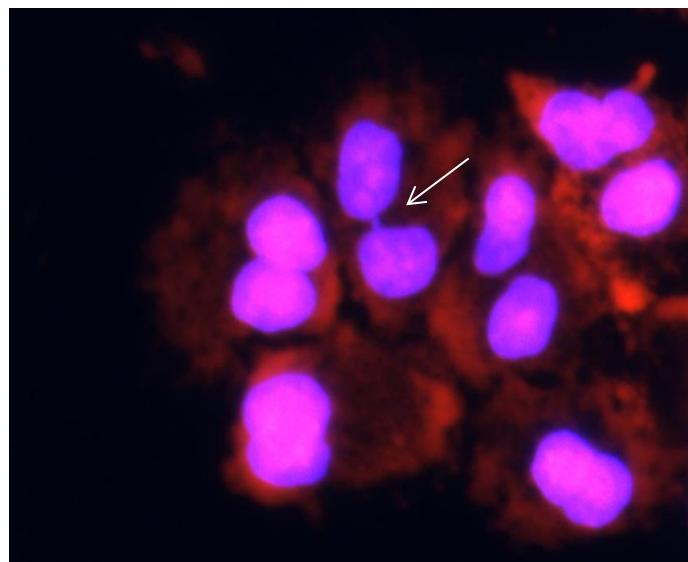
Rezultati mikrojedrnega testa

Izbrane koncentracije ND (nano) in mikrodelcev (mikro) ZnO smo 24 ur testirali na celicah MDCK. K⁺: celice MDCK smo za 24 ur izpostavili 100 µg/mL MMS. Vsak stolpec predstavlja povprečje 6 ponovitev. Mikrojedra so bila vsakič prešteta na 500 dvojedrinih celicah. Prikazana je standardna deviacija. *: statistično značilno odstopanje od K⁻ ($p < 0,05$).



Mikrojedrni test: Slika celic MDCK po barvanju s PI in Hoechst 33258

Celice MDCK smo izpostavili ND ZnO, po 24-urah pa še cytoB za ravno tolikšen čas. Sliko smo naredili z epifluorescentnim mikroskopom. PI je obarval celotno celico – rdeča fluorescensa, Hoechst 33258 pa samo jedro celice – svetlo plava fluorescensa. Na sliki sta vidni apoptotski celici (levo) in mikrojedrne celice (desno).



Mikrojedrni test: Slika celic MDCK po barvanju s PI in Hoechst 33258

Celice MDCK smo izpostavili ND ZnO, po 24-urah pa še cytoB za ravno tolikšen čas. Sliko smo naredili z epifluorescentnim mikroskopom. Na sliki je viden mostiček med dvema jedromma dvojderne celice.