

**UNIVERZA V LJUBLJANI
ZDRAVSTVENA FAKULTETA
SANITARNO INŽENIRSTVO, 2. STOPNJA**

Zala Jan

**VPLIV RAZLIČNIH NANODELCEV TiO₂ NA
AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZE**

magistrsko delo

**THE IMPACT OF DIFFERENT TiO₂
NANOPARTICLES ON THE ACTIVITY OF
ACETYLCHOLINESTERASE**

master thesis

Mentorica: prof. dr. Damjana Drobne

Somentor: viš. pred. dr. Gregor Jereb

Recenzent: izr. prof. dr. Borut Poljšak

Ljubljana, 2019

ZAHVALA

Hvala mentorici prof. dr. Damjani Drobne za človečnost, spodbudne besede in nov začetek.

Hvala somentorju viš. pred. dr. Gregorju Jerebu za kritičen pogled, vztrajnost in podporo.

Hvala dr. Venu Kononenku za uvajanje v laboratorijsko delo, potrpežljivost in vse usmeritve.

Hvala vama, Tatjana in Mitja, da sta v času mojega študija svoj dom naredila moj dom in mi stala ob strani.

IZVLEČEK

Uvod: V zadnjih desetletjih proizvodnja nanomaterialov in nanodelcev globalno močno narašča, prav tako tudi njihova uporaba v številnih izdelkih. Za namene ugotavljanja interakcij med različnimi nanodelci in biološkimi sistemi so na voljo različni testi. V magistrskem delu je uporabljen encimski test, katerega namen je ovrednotiti biološko reaktivnost različnih nanodelcev s testom inhibicije in adsorpcije acetilholinesteraze. Podatek o biološki aktivnosti je ključen pri vrednotenju njihove varne uporabe. **Namen:** Namen magistrskega dela je s spektrofotometrično Ellmanovo metodo oceniti stopnjo adsorpcije suspenzije različnih delcev TiO_2 na encim acetilholinesterazo in inhibicijo encimske aktivnosti. Namen je tudi prikazati, kako koncentracija in lastnosti delcev vplivajo na aktivnost encima in preveriti odvisnost med adsorpcijo in inhibicijo encima. **Metode dela:** Uporabljena je bila modificirana Ellmanova metoda, prilagojena za delo na mikrotitrskih ploščah. Izmerjen je bil vpliv dvanajstih različnih delcev TiO_2 na inhibicijo in adsorpcijo acetilholinesteraze. Nastanek rumenoobarvanega kompleksa, ki se tvori ob reakciji med uporabljenimi nanodelci, Ellmanovim reagentom, encimom ter dodanim substratom acetiltioholinkloridom je bil beležen pri valovni dolžini 405 nm. Eserin je bil uporabljen kot pozitivna kontrola. **Rezultati:** Acetilholinesterazo so najbolj inhibirali in adsorbirali delci TiO_2 velikosti med 5 in 100 nm, manj pa delci z velikostjo med 100 in 500 nm. Različna kristalna struktura delcev v naši študiji ni vplivala na aktivnost encima. Pri višjih koncentracijah delcev je bil vpliv na aktivnost encima večji, predvsem pri delcih, ki so povzročili več kot 10% vpliv na aktivnost encima. Vpliv na inhibicijo je bil pri analiziranih delcih večji od vpliva na adsorpcijo. **Razprava in zaključek:** Metoda, opisana v magistrskem delu, je lahko uporabljena za nadaljnje raziskovanje interakcij med encimi in ND.

Ključne besede: TiO_2 , acetilholinesteraza, inhibicija, adsorpcija, nanodelci

ABSTRACT

Introduction: Over the last decades, the production of nanomaterials and nanoparticles has been rapidly growing on the global scale. Different tests are available for the purposes of determining interactions between different nanoparticles and biological systems. In the master's thesis, the enzyme test is used which aims to evaluate the biological reactivity of various nanoparticles with the test of inhibition and adsorption of acetylcholinesterase test. The data on biological activity is crucial in evaluating their safe use and in the development of new products containing nanomaterials. **Purpose:** The purpose of this master's thesis is to evaluate the rate of adsorption of the TiO_2 particle suspension on the acetylcholinesterase enzyme and the inhibition of enzymatic activity using the spectrophotometric Ellman method. The purpose is also to show how the concentration and properties of the particles affect the enzyme activity and to compare the relation between enzyme adsorption and inhibition. **Methods:** A modified Ellman method, adapted to work with microtiter plates, was used. The effect of twelve different TiO_2 particles on the inhibition and adsorption of acetylcholinesterase was measured. The reaction between the nanoparticles which were used, the Ellman's reagent, the enzyme and the added acetylthiocholine chloride substrate results in the formation of a yellow-colored complex, which was recorded at a wavelength of 405 nm. Eserine was used as a positive control. **Results:** TiO_2 particles with sizes between 5 and 100 nm showed the highest rate of inhibition and adsorption of acetylcholinesterase, whereas the particles with sizes between 100 and 500 nm showed a lower rate. The different crystal structure of the particles in our study did not affect the enzyme activity. At higher particle concentrations, the effect on enzyme activity was greater, especially with particles which had more than 10 % impact on enzyme activity. In the particles used, the effect on inhibition was greater than the effect on adsorption. **Discussion and conclusion:** The method described in the master's thesis can be used to further investigate the interactions between enzymes and nanoparticles.

Keywords: TiO_2 , acetylcholinesterase, inhibition, adsorption, nanoparticles

KAZALO VSEBINE

1	UVOD.....	1
1.1	Nanomateriali in nanodelci.....	2
1.2	Interakcija med nanodelci in biološkimi sistemi	3
1.3	Titanov dioksid	4
1.4	Oplaščenje nanodelcev	5
1.5	Acetilholinesteraza	7
1.6	Inhibicija acetilholinesteraze	7
1.7	Adsorpcija acetilholinesteraze	9
1.8	Interakcija med nanodelci in acetilholinesterazo.....	9
2	NAMEN.....	11
3	METODE DELA	12
3.1	Določanje encimske aktivnosti.....	12
3.2	Seznam uporabljenih kemikalij in drugih snovi	13
3.3	Seznam uporabljenega materiala in opreme	13
3.4	Seznam uporabljenih naprav in pripomočkov	14
3.5	Priprava reagentov	14
3.5.1	Pufri	14
3.5.2	Ellmanov reagent	15
3.5.3	Substrat acetiltioholinklorid	15
3.5.4	Encim acetilholinesteraza	15
3.5.5	Delci TiO ₂	15
3.6	Izvedba poskusa.....	17
3.6.1	Merjenje inhibicije acetilholinesteraze	18
	Merjenje adsorpcije delcev TiO ₂ na acetilholinesterazo	20
3.7	Pridobivanje rezultatov in statistična obdelava podatkov	22
4	REZULTATI	23

4.1	Vpliv delcev TiO ₂ G1–1 na AChE.....	23
4.2	Vpliv delcev TiO ₂ G2–5 na AChE.....	24
4.3	Vpliv delcev TiO ₂ G3–1 na AChE.....	25
4.4	Vpliv delcev TiO ₂ G4–19 na AChE.....	26
4.5	Vpliv delcev TiO ₂ G5–4 na AChE.....	27
4.6	Vpliv delcev TiO ₂ G6–3 na AChE.....	28
4.7	Vpliv delcev TiO ₂ G7–5 na AChE.....	29
4.8	Vpliv delcev TiO ₂ G8–2 na AChE.....	30
4.9	Vpliv delcev TiO ₂ G9–5 na AChE.....	31
4.10	Vpliv delcev TiO ₂ G10–4 na AChE.....	32
4.11	Vpliv delcev TiO ₂ E171–E na AChE.....	33
4.12	Vpliv delcev TiO ₂ 67–CC na AChE.....	34
4.13	Evalvacija povprečne stopnje inhibicije in adsorpcije analiziranih delcev.....	35
5	RAZPRAVA.....	38
6	ZAKLJUČEK.....	42
7	LITERATURA IN DOKUMENTACIJSKI VIRI.....	43

KAZALO SLIK

<i>Slika 1: Shematski prikaz postopka za merjenje inhibicije acetilholinesteraze (slika prilagojena po Jemec et al., 2016)</i>	19
<i>Slika 2: Shematski prikaz postopka za merjenje adsorpcije acetilholinesteraze (slika prilagojena po Jemec et al., 2016)</i>	21
<i>Slika 3: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G1–1).</i>	23
<i>Slika 4: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G2–5)</i>	24
<i>Slika 5: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G3–1).</i>	25
<i>Slika 6: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G4–19).</i>	26
<i>Slika 7: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G5–4)</i>	27
<i>Slika 8: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G6–3)</i>	28
<i>Slika 9: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G7-5)</i>	29
<i>Slika 10: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G8-2).</i>	30
<i>Slika 11: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G9–5)</i>	31
<i>Slika 12: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G10–4)</i>	32
<i>Slika 13: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (E171–E)</i>	33
<i>Slika 14: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (67-CC)</i>	34

KAZALO TABEL

<i>Tabela 1: Karakteristike uporabljenih delcev TiO₂</i>	<i>16</i>
<i>Tabela 2: Evalvacija povprečne stopnje inhibicije (PSI) in povprečne stopnje adsorpcije (PSA) analiziranih delcev</i>	<i>36</i>

SEZNAM UPORABLJENIH KRATIC IN OKRAJŠAV

ACh	Acetilholin
AChCl	Acetiltioholinklorid
AChE	Acetilholinesteraza
Al ₂ O ₃	Aluminijev(III) oksid
AlPO ₄	Aluminijev(III) fosfat
BSA	Goveji serumski albumin (angl. <i>bovine serum albumin</i>)
ISO	Mednarodna organizacija za standardizacijo (angl. <i>International Organisation for Standardisation</i>)
K-P pufer	Kalij-fosfatni pufer
ND	Nanodelci
NIOSH	Ameriški Nacionalni inštitut za varstvo in zdravje pri delu (angl. <i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>)
NM	Nanomaterial
PSA	Povprečna stopnja adsorpcije
PSI	Povprečna stopnja inhibicije
RCF	Relativna centrifugacijska sila
SD	Standardni odklon (angl. <i>standard deviation</i>)
SiO ₂	Silicijev dioksid
TiO ₂	Titanov dioksid
TEM	Transmisijski elektronski mikroskop
UVA	Ultravijolična A-svetloba

UVB

Ultravijolična B-svetloba

ZrO₂

Cirkonijev dioksid

1 UVOD

V magistrskem delu smo preučevali vpliv suspenzij različnih nanodelcev (v nadaljevanju ND) titanovega dioksida (v nadaljevanju TiO_2) na adsorpcijo in inhibicijo aktivnosti encima acetilholinesteraze (v nadaljevanju AChE). AChE je encim v človeškem telesu, ki ima pomembno vlogo v živčnem sistemu, v zadnjem času pa so dokazali tudi vlogo AChE izven živčnega sistema (Glavan, 2018).

Nano TiO_2 je eden najbolj množično uporabljenih ND. Zaradi zmožnosti absorpcije UVB in UVA ter prepustnosti za vidno svetlobo je nano TiO_2 uporabljen v kremah za sončenje (Wang in Tooley, 2011). Uporablja se v barvah, premazih, lepilih, papirju, plastiki in gumi, tiskarskih barvah, premazih za tekstil, katalizatorskih sistemih, keramiki, talnih oblogah, kritinah in farmacevtskih izdelkih, sredstvih za čiščenje vode, barvilih za hrano, v avtomobilski industriji in drugo (Remškar, 2009). Veliko pozornosti se namenja tudi preučevanju vpliva nano TiO_2 na odstranjevanje kovin, arzena, organskih kemikalij (na primer polikloridnih bifenilov) in benzena iz sistemov podzemnih in nekaterih površinskih vod ter zemlje (Elliott in Zhang, 2001). Makro delci TiO_2 so uporabljeni tudi v živilih kot prehransko dopolnilo E 171 (Dorier et al., 2019) in kozmetičnih izdelkih (Weir et al., 2012).

Inhibicija AChE in adsorpcija delcev na AChE sta odvisni od fizikalno-kemičnih lastnosti delcev: od oblike, velikosti, kristalne strukture in lastnosti snovi, ki so dodane delcem in spremenijo njihove kemične lastnosti. Meritve adsorpcije in inhibicije AChE pri izpostavljenosti suspenziji nano TiO_2 smo izvedli s spektrofotometričnim merjenjem absorbance produkta encimske reakcije. Predhodno so vezavo različnih ND na AChE preučili in v svojih delih predstavili že Wang s sodelavci (2009), Wang in Tooley (2011), Jemec s sodelavci (2007) in Mesarič s sodelavci (2013).

1.1 Nanomateriali in nanodelci

Mednarodna organizacija za standardizacijo (angl. *International Organisation for Standardisation*, v nadaljevanju ISO) definira nanomaterial (v nadaljevanju NM) kot material z vsaj eno zunanjo dimenzijo nanovelikosti (1–100 nm) ali z notranjo ali površinsko strukturo nanovelikosti (SIST-TS CEN ISO/TS 80004-1, 2016). ND so delci, ki imajo tri dimenzije nanovelikosti. NM predstavljajo sodobne materiale z znatno izboljšanimi fizikalnimi, kemičnimi in biološkimi karakteristikami, ki so posledica majhnosti delcev, ki NM sestavljajo (Kelsall et al., 2005). Z zmanjševanjem velikosti delcev, razen pri izjemah, naraščajo trdnost, trdota, reaktivnost, termični raztezek, difuzija, specifična površina; padajo pa tališče, termična prevodnost, gostota in sipanje svetlobe (Navodnik in Kopčič, 2007). ND imajo v primerjavi z makro delci večjo relativno površino (razmerje med površino delca in njegovo težo/volumnom) (Fenoglio et al., 2011). Od začetka sinteze ND je nanotehnologija postala več milijard vredna industrija. Izvedene so bile že številne toksikološke študije na nanosrebru, fuluenu, ogljikovih nanocevcicah, kovinskih oksidih in drugih ND (Donaldson et al., 2004).

Proizvedeni ND so različnih oblik, velikosti, kemične sestave ter imajo različne kemične in fizikalne lastnosti (Albanese et al., 2012). Geometrija in dimenzija ND je pomembna za njihov prehod v celico, sistemski prenos in izločanje ND iz telesa (Nel et al., 2009). ND imajo veliko tendenco, da tvorijo aglomerate in posledično tvorijo večje skupke, kar vodi k drugačnemu odzivu organizma pri vstopu aglomeratov v telo (Nel et al., 2009), kot v primeru izpostavljenosti delcem nanovelikosti. ND lahko v celico vstopijo preko neposredne fizične penetracije in aktivnega prenosa preko fagocitoze, odvisno od njihove oblike in aglomeracije (Geiser et al., 2005). Kot v članku navajajo Scown in sodelavci (2010), kemične značilnosti površine ND močno vplivajo na način in vrsto interakcij z biološkim sistemom. Pogosto pride do kemične transformacije ND pri stiku z okoljskimi pogoji ali v biološkem tkivu. Večina ND je sintetiziranih z dodatkom kemične ali termične energije, zato imajo pri prehodu v okolje ali v tkivo težnjo po sprostitvi energije s prehodom v bolj stabilno stanje (Liu et al., 2010). ND lahko na svojo površino vežejo molekule iz okolja, da s tem dosežejo večjo kemično stabilnost (Nel et al., 2009). Do sprememb lastnosti ND lahko pride takoj po sintezi ND ali med njihovim »življenjskim obdobjem«, ko prehajajo v vodo, zrak, zemljo in različna biološka okolja. Pomembna je tudi stabilnost koloida – razporejenosti ND v zraku ali tekočini, od česar je odvisno, kako se različne snovi vežejo na ND (Hristozov et al., 2014).

Za sintezo ND, ki se pravilno razporejajo v tekočem mediju in ne tvorijo aglomeratov, ND obdajo oziroma premažejo z makromolekulami. Na ta način je preprečena interakcija med ND.

1.2 Interakcija med nanodelci in biološkimi sistemi

Pri vstopu ND v telo ali v kompleksni medij (medij, ki vsebuje proteine, aminokisljine, lipide, sladkorje ...), pride do interakcije ND z različnimi biomolekulami (Thode et al., 1997; Park in Hamad-Schifferli, 2010). ND različne velikosti, oblike in kemične sestave imajo različno afiniteto do vezave specifičnih proteinov (Mu et al., 2014). Ko se vežeta ND in protein, lahko pride do spremembe terciarne strukture proteina, kar lahko vpliva na njegovo aktivnost (Zuo et al., 2011). Ko se ND obdajo s proteinskimi molekulami, se tvori t. i. biomolekularna korona (Nel et al., 2006). Do vnosa v telo lahko pride z vdihavanjem, peroralnim zaužitjem (voda in živila) ter s stikom s kožo (kozmetični izdelki in preko obleke) (Skocaj et al., 2011). Pri vdihavanju pride do nazalne, trahiobronhialne in alveolarne izpostavljenosti. Iz telesa se ND izločajo preko potu, urina, materinega mleka in fekalij (Oberdörster et al., 2005). Organi, ki so najbolj prizadeti zaradi vdora ND, so jetra, vranica, ledvice in bezgavke (Remškar, 2009).

Vezava ND z biološkimi molekulami vpliva na razporeditev ND v biološkem sistemu ter na učinkovitost prenašanja zdravil, kadar so ta vezana na ND (Aggarwal et al., 2009). Če se na ND veže albumin, ND dalj časa krožijo po krvnem obtoku (Ogawara et al., 2004). Nasprotno je odstranitev ND iz krvnega obtoka s privzemom v Kupfferjeve celice pospešena, kadar se na ND vežejo imunoglobulin G, komplementarni faktor C3 in fibronektin (Furumoto et al., 2002).

Za preučevanje interakcij med ND in biološkimi sistemi se uporabljajo različni testi. Xia in sodelavci (2011) v svojem delu opisujejo uporabo računalniškega modela, s katerim je mogoče predvidevati stopnjo adsorpcije ND na molekule v vodnem okolju. Reaktivnost površine ND se ugotavlja z merjenjem interakcij med ND in proteini (Monopoli et al., 2012). Spremlja se sposobnost vezave ND na preoteine (Mu et al., 2014), identifikacija aktivnih mest, ki so pomembna za vezavo ND (Calzolari et al., 2010), strukturne spremembe proteinov, ko se nanje vežejo ND (Käkinen et al., 2013), stabilnost proteinov in spremembe njihovih funkcij (Šinko et al., 2013).

1.3 Titanov dioksid

V zadnjih letih je povečana proizvodnja nano TiO₂, kar vodi v večjo izpostavljenost okolja in ljudi tovrstnim ND. Letna proizvodnja nano TiO₂ znaša do 10.000 ton (Szymanska et al., 2016). V naravi se TiO₂ pojavlja v kamninah in mineralnih peskih. Je bela trdna anorganska termalno stabilna snov, ki ni vnetljiva in je slabo topna v vodi (Remškar, 2009). Obstajajo tri kristalne strukture nano TiO₂: anataz, rutil in brookit. Najbolj uporabljeni sta anataz in rutil. Pri visokih temperaturah se anataz pretvori v rutil, katerega termična stabilnost je večja. Kristali anataza so tudi bolj fotokatalitični kot kristali rutila (Linsebigler, 1995).

TiO₂ kot nanomaterial je inženirsko oblikovan tako, da so njegovi primarni delci manjši od 100 nm. Ti se ne uporabljajo kot barvilo, temveč kot UV-absorberji in fotokatalizatorji (Karlsson et al., 2009). Zaradi zmožnosti absorpcije UVB- in UVA-svetlobe ter prepustnosti za vidno svetlobo je nano TiO₂ uporabljen v kremah za sončenje (Wang in Tooley, 2011). Za sončne kreme na osnovi mineralov, ki vsebujejo nano TiO₂, so s študijami dokazali, da povzročajo manj alergij in draženja kože kot sončne kreme na osnovi drugih snovi (Schilling et al., 2010). Nano TiO₂ se uporablja v katalizatorjih, preko katerih so speljani dimni plini grelnih kotlov, elektrarn in dizelskih motorjev, kjer katalizira škodljive emisije dušikovih oksidov v nenevarna produkta – vodo in dušik (Drobne, 2018). V zadnjem času se veliko pozornosti namenja preučevanju vpliva TiO₂ na odstranjevanje kovin, arzena, organskih kemikalij – polikloriranih bifenilov in benzena iz sistemov podzemnih in nekaterih površinskih vod ter zemlje (Elliott in Zhang, 2001).

Ameriški Nacionalni inštitut za varstvo in zdravje pri delu (angl. *National Institute for Occupational Safety and Health*, v nadaljevanju NIOSH) je določil za delovno okolje, v katerem se proizvaja TiO₂, mejno vrednost za TiO₂ v zraku 2,4 mg/m³ za fine delce in 0,3 mg/m³ za ultrafine delce, med katere se štejejo tudi ND TiO₂. V prilogi 1 Pravilnika o varovanju delavcev pred tveganji zaradi izpostavljenosti kemičnim snovem pri delu (Uradni list RS, št. 100/01, 39/05, 53/07, 102/10, 43/11 – ZVZD-1, 38/15 in 78/18) je za alveolarno frakcijo prahu določena mejna vrednost 1,25 mg/m³, za inhalabilno frakcijo pa 10 mg/m³ pri poklicni izpostavljenosti 8 ur dnevno. Posebne norme za ND TiO₂ v Sloveniji ni. Po navedbah NIOSH so ND TiO₂ potencialno rakotvorni pri poklicni izpostavljenosti, vendar zaenkrat še ni zadostnih podatkov, da bi bili ND TiO₂ tudi uradno opredeljeni kot rakotvorni. TiO₂ je opredeljen kot posredno rakotvoren po tem, ko reagira z drugimi onesnažili preko

sekundarnih genotoksičnih mehanizmov, ki so posledica velikosti delcev in njihove površine (Dankovic, Kuempel, 2011). Leta 2006 je Mednarodna agencija za raziskavo raka (angl. *International Agency for Research on Cancer – IARC*) spremljala učinek in informacije o izpostavljenosti nano TiO₂ in zaključila, da glede na zadostne dokaze študij o rakotvornem aktivnosti nano TiO₂ na živali in ljudi, kemikalijo opredeljuje kot potencialno rakotvorno za človeka in jo uvrstila v skupino 2B (IARC, 2010). V okolje lahko ND prehajajo med proizvodnjo, transportom ali z obrabo proizvodov, ki vsebujejo ND (Oberdörster et al., 2005).

Poleg nano TiO₂ je v industriji pogosto uporabljen makro TiO₂. Najpogosteje uporabljeni makro delci TiO₂ so pigmentirani delci, uporabljeni v kozmetični industriji in prehransko dopolnilo E 171 (Weir et al., 2012). Pigmentni TiO₂, s katerim je mogoče doseči razpršitev vidne svetlobe in posledično neprosojnost (opaciteto), ki povzroča belo bravo. Da je to mogoče, mora biti velikost delcev približno za polovico manjša od valovne dolžine svetlobe, ki bo razpršena, pri vidni svetlobi mora biti torej velikost delcev med 200 in 350 nm. Ko se uporablja pri barvanju, pigmentni TiO₂ zagotavlja obstojnost barve in neprestano zaščitno sloja, preprečuje razpad, razpokanje, krhkost in bledenje barve.

1.4 Oplaščenje nanodelcev

Za pridobivanje ND, ki se pravilno razporejajo v tekočem mediju in ne tvorijo aglomeratov, ND obdajo oziroma premažejo z različnimi makromolekulami. Na ta način je preprečena interakcija med posameznimi ND. Z dodajanjem premazov ND se lahko spremeni njihov vpliv na biološki sistem in njihova interakcija z biološkim sistemom (Nel et al., 2009). ND s premazi lahko bolj neugodno vplivajo na biološki sistem kot ND brez premaza. Roberts in sodelavci (2007) so v članku predstavili, da so spojine, uporabljene za premaze, vplivale na testne organizme in njihov habitat, kar se je kazalo kot povečan vpliv ND, ki so bili uporabljeni v raziskavi. Kot sta v članku izpostavila Liu in Hurt (2010), je od lastnosti premazov (funkcionalne skupine, polimerna struktura) odvisen tudi vstop ND v celico.

Silicijev doksid ali silika (v nadaljevanju SiO₂), se uporablja podobno kot TiO₂ kot aditiv v hrani, zdravilih in v kozmetičnih izdelkih. Kot uporaben se je SiO₂ izkazal v biomedicini, kjer se uporablja za dostavljanje zdravil na tarčna mesta v organizmu in zdravljenje raka. Kot navajajo Weisheng in sodelavci (2006), pride zaradi izpostavljenosti SiO₂ v

koncentraciji med 10 in 100 $\mu\text{g/mL}$ do citotoksičnosti in oksidativnega stresa v izpostavljenih celicah. Wang in sodelavci (2009) so v svojem delu predstavili, da SiO_2 sprošča ione, vendar niso opazili vpliva na AChE. Dodatek SiO_2 poveča delcem TiO_2 katalitične sposobnosti in poveča prepuščanje svetlobe. Kombinacija SiO_2 in TiO_2 ima samočistilne sposobnosti (Tang et al., 2013).

Aluminijev(III) oksid (v nadaljevanju Al_2O_3) se TiO_2 dodaja z namenom povečanja mehanske in korozijski odpornosti materialov. Pogosto se tovrstni premazi uporabljajo za ortopedske vsadke. Pri trajnih vsadkih lahko pride do sproščanja vanadija in aluminija, ki sta strupena za organizem (Radi et al., 2018).

Cirkonijev oksid (v nadaljevanju ZrO_2) se TiO_2 dodaja z namenom izboljšanja kemične in termične stabilnosti (Gestel et al., 2008). ZrO_2 je zaradi sposobnosti fotokemične razgradnje uporabljen pri čiščenju odpadnih vod, pri čemer je pogosto uporabljen skupaj s TiO_2 . Kombinacija teh delcev tudi po večkratni uporabi za čiščenje odpadnih vod ohranja stabilnost in sposobnost fotokemične razgradnje (Abdi et al., 2019).

Kot sta v svojem delu predstavila Yang in Mao (2016), dodajanje aluminijevega(III) fosfata (v nadaljevanju AlPO_4) TiO_2 izboljša belilne sposobnosti in dispergiranost anataznega TiO_2 v vodnem mediju.

Stearinska kislina se uporablja za premaze delcev, pri katerih se želi doseči hidrofobno površino (Nakajima et al., 2000). Stearinska kislina se veže na delce TiO_2 na način, da so nepolarni deli kisline obrnjeni stran od delca. Delci se ne mešajo z vodo, lažje pa se oprimejo bioloških molekul, ki imajo lipofilni značaj. Med njimi je tudi AChE (Nam in Boo, 2013).

Volfram se delcem TiO_2 dodaja, da se poveča njihova fotokatalitičnost in reaktivnost, s tem pa njihova sposobnost odstranjevanja onesnaževal iz odpadnih vod (Ding et al., 2019).

Z dodajanjem proteinov ND je mogoče doseči zmanjšanje njihove reaktivnosti. V ta namen je pogosto uporabljen goveji serumski albumin (angl. *bovine serum albumin*, v nadaljevanju BSA), s katerim se obložijo ND (Fu et al., 2104). Na ta način so ND bolj biokompatibilni, poveča se možnost, da se uporabljajo v biomedicinske namene (Ravindran et al., 2010). Ob dodatku BSA se ta adsorbira na ND, na ta način se zmanjša vpliv ND na aktivnost AChE. BSA se pogosto uporablja predvsem zaradi stabilnosti molekule, strukture, ki je podobna strukturi človeškemu serumskemu albuminu, ter cenovne ugodnosti (Afsharan et al., 2016).

1.5 Acetilholinesteraza

AChE se uvršča med holinesteraze, serinske hidrolaze, ki hidrolizirajo acetilholin (v nadaljevanju ACh) v holin in acetat. Največ AChE je v holingeričnih sinapsah v centralnem živčnem sistemu, na stiku živčne in mišične celice, kjer s hidrolizo AChE pomembno prispeva k pravilnemu delovanju centralnega in perifernega živčnega sistema (Pohanka, 2011). AChE se nahaja tudi na membranah rdečih krvničk, kjer pa njegova vloga še ni znana (Daniels, 2007). Hidroliza ACh poteče na katalizno esterskem delu AChE (Sussman et al., 1991). AChE ima tudi sekundarno mesto za vezavo substrata, imenovano anionski del. Ta del je odgovorna za pravilno orientiranje molekule (Grisaru et al., 1999). Ker je lociran na površini AChE, se nanj mnogokrat vežejo inhibitorji, zato se za anionski del predvideva, da ima veliko vlogo pri nastanku Alzheimerjeve bolezni (Pohanka, 2011). AChE je sestavljena iz treh podenot (Silman et al., 2008). Vsaka od podenot ima po eno aktivno mesto (Simon in Massoulié, 1997). Aktivno mesto AChE obsega dve podmesti: anionsko in estersko (Čolović et al., 2013).

1.6 Inhibicija acetilholinesteraze

Poznamo dve vrsti inhibitorjev AChE – reverzibilne in ireverzibilne inhibitorje, ki zvišujejo koncentracijo ACh v sinapsah. Poznani sta dve vrsti reverzibilnih inhibitorjev: kompetitivni in nekompetitivni. Kompetitivni tekmujejo s substratom za vezavo na aktivno mesto encima. Nekompetitivni inhibitorji se vežejo na druga mesta na encimu (Lehninger et al., 1993). Reverzibilni inhibitorji se uporabljajo predvsem za terapevtske namene (na primer za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni, glavkoma ipd.).

Ireverzibilni inhibitorji povzročajo kopičenje ACh v sinaptični špranji in so zato obravnavani kot strupeni za organizem, uporabljajo pa se tudi kot živčni strupi. Ireverzibilna inhibicija poteka v dveh korakih: prvi je hitra, kratek čas trajajoča reverzibilna inaktivacija encima. Drugi korak pa je ireverzibilna inhibicija s tvorbo zelo stabilnega encimsko-inhibitorskega kompleksa, pri katerem je inhibitor na encim vezan s kovalentnimi vezmi (Čolović et al., 2013). Ireverzibilno AChE večinoma inhibirajo organofosfati in karbamati (Lionetto et al., 2013), inhibirajo pa jo tudi druge vrste onesnaževal, na primer toksične kovine (Frasco et al., 2005; Diamantino et al., 2003), pesticidi (organofosfati) (Reddy et al., 1994), policiklični aromatski ogljikovodiki (Guilhermino et al., 2000) in ND (Wang et al., 2009). Strupenost

težkih kovin za encime se kaže z vezavo z močnimi vezmi med različnimi težkimi kovinami in kovinami (na primer živega srebra, svineca, aluminija in železa) na funkcionalna mesta encima. V primeru vezave svineca ta nadomesti kovine, ki so potrebne za pravilno aktivnost AChE. Svinec nadomesti na primer vezavo Ca^{2+} ionov, ki so pomembni za nemoteno delovanje centralnega živčnega sistema (Lieberman, Marks, 2005). Hidroliza ACh poteče na katalitičnem delu encima, ki je v približno 70 % prekrit z aktivno površino (Sussman et al., 1991). Vse poznane oblike AChE imajo poleg primarnega aktivnega mesta tudi sekundarno mesto za vezavo substrata. Sekundarno mesto skrbi za modifikacijo katalitične aktivnosti, posredovanje pri vezavi AChE z inhibitorji in za nekatalitične funkcije encima (Grisaru et al., 1999). Inaktivacija aktivnosti encima AChE zaradi vezave inhibitorjev povzroča kopičenje sinaptičnega ACh, hiperstimulacijo nikotinskih in muskarinskih receptorjev in moti nevrottransmitterski prenos (Čolović et al., 2013).

Fizostigmin oziroma eserin močno inhibira AChE in smo ga zato v naši raziskavi uporabili kot pozitivno kontrolo pri preučevanju inhibicije AChE. Je alkaloid, izoliran iz semen rastline kalabarski bob (*Physostigma venenosum*) (Mach et al., 2004). Eserin se uporablja tudi za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni, kadar se uporabljajo inhibitorji AChE (Zhan et al., 2010).

1.7 Adsorpcija acetilholinesteraze

Adsorpcija ND na AChE in inhibicija encima sta povezani. Kot navajajo Wang in sodelavci (2009), je inhibicija AChE posledica adsorpcije ND na površino encima. Shafferman in sodelavci (1994) izpostavljajo, da je adsorpcija ND na encim odvisna od strukture oziroma oblike, površinskih lastnosti in velikosti ND. Pri adsorpciji ND na AChE lahko pride do sprememb v obliki encima. Večji kot je naboj na površini ND, večja je adsorpcija ND na AChE. Pozitivno nabiti ND se bolje adsorbirajo na AChE, saj je neto naboj AChE negativen (Rahman et al., 2013). Pri hidrofobnih ND je verjetnost za nepovratne poškodbe encima večja (Shaffman et al., 1994).

1.8 Interakcija med nanodelci in acetilholinesterazo

Merjenje vpliva suspenzije ND na AChE omogoča, da se na hiter, cenovno ugoden in preprost način, ovrednoti biološka reaktivnost suspenzij ND. Merjenje inhibicije in adsorpcije AChE služi kot molekularni indikator ND, ki se uporablja kot biološki oziroma molekularni presejalni test za ugotavljanje reaktivnosti suspenzije. Za ND, ki so bolj reaktivni, se predvideva, da imajo večji učinek na *in vitro* ter *in vivo* biološke sisteme kot tisti, ki so manj reaktivni.

Mesarič in sodelavci (2013) so preučevali vpliv treh različnih vrst ogljikovih ND: grafena, fulerena in industrijskega ogljika na inhibicijo in adsorpcijo AChE vinske mušice (*Drosophila melanogaster*). Rezultati raziskave kažejo, da se ogljikovi ND adsorbirajo na AChE, vendar je pri tem encimska katalitična aktivnost različna. Najbolj učinkoviti inhibitorji AChE so delci industrijskega ogljika, medtem ko adsorpcija grafena na AChE ohranja strukturo in aktivnost encima. Avtorji so predpostavili, da so različne površinske lastnosti ogljikovih ND vzrok za različno adsorptivnost in različen vpliv na aktivnost encima. Industrijski ogljik lahko imobilizira oziroma onemogoči aktivnost AChE. Spremljali so tudi odziv aktivnosti encima glede na dodajanje različnih koncentracij ND. Za ND industrijskega ogljika koncentracije med 0,12 in 0,4 $\mu\text{g/mL}$ so rezultati nakazovali na 50% adsorpcijo ND na encim in inhibicijo aktivnosti encima. Pri koncentraciji $>1 \mu\text{g/mL}$ je bila stopnja adsorpcije ND na encim konstantna. Pri spremljanju vpliva grafena so ugotovili, da se ga največ adsorbira pri koncentraciji $\leq 0,3 \mu\text{g/mL}$. Pri ND grafena so potrebne višje koncentracije, da pride do adsorpcije in inhibicije encima, kot pri industrijskem ogljiku.

Rezultati kažejo, da je uporaba AChE dober pristop za rangiranje različnih vrst ND glede na njihovo adsorptivnost in inhibitorne značilnosti (Mesarič et al., 2013).

Wang in sodelavci (2009) so v svoji raziskavi preučevali adsorpcijo ND na AChE in inhibicijo njene aktivnosti na osmih različnih ND: SiO₂, TiO₂, Al₂O₃, Al, Cu, Cu–C (baker, prevlečen z ogljikom), večstenske ogljikove nanoceevke in enostenske ogljikove nanoceevke. Rezultati so pokazali, da imajo ogljikove nanoceevke visoko afiniteto do adsorpcije AChE; najbolje se vežejo večstenske ogljikove nanoceevke (94 %). Adsorpcija AChE na nano SiO₂ in Al₂O₃ je med preiskovanimi ND najnižja. Med preiskovanimi kovinskimi, ogljikovimi in oksidnimi ND, naj bi imeli oksidni ND najmanjši vpliv na inhibicijo in adsorpcijo AChE.

Kot v svojih delih navajajo Gaitonde in sodelavci (2006) Cu²⁺ ioni škodljivo vplivajo na aktivnost AChE tako, da denaturirajo encim. Cu²⁺ ioni se namreč vežejo na katalitična mesta AChE.

2 NAMEN

Namen magistrskega dela je oceniti vpliv dvanajstih različnih delcev TiO_2 na aktivnost AChE. Na ta način bomo ugotovili reaktivnost uporabljenih delcev, ki se kaže kot stopnja adsorpcije delcev na površino AChE in kot stopnja inhibicije AChE. Testirani delci imajo enako kemično sestavo, razlikujejo pa se v kristalni strukturi in velikosti, kar je (razen za delce z oznako 67-CC) razvidno iz Tabele 1, kjer so navedene karakteristike uporabljenih delcev.

Cilj magistrske naloge je razvrstiti suspenzije različnih delcev TiO_2 glede na njihovo reaktivnost. Z rezultati bomo prispevali k poznavanju in razumevanju biološke reaktivnosti različnih vrst delcev TiO_2 v suspenziji. Ti podatki so doprinos k varni uporabi TiO_2 v izdelkih in bodo prispevali k razvoju novih izdelkov. Bolj reaktivni delci niso zaželeni v izdelkih vsakdanje rabe, so pa ključni za biomedicinsko uporabo in pri razgradnji onesnažil.

V okviru izdelave magistrske naloge smo si zastavili dve hipotezi:

H1: Testirani delci TiO_2 bodo inhibirali AChE v odvisnosti od njihovih fizikalno-kemičnih lastnosti. Predvidevamo, da bo ključnega pomena kristalna struktura delcev.

H2: Primerjali bomo vpliv delcev TiO_2 na adsorpcijo in inhibicijo AChE. Pričakujemo, da večja adsorpcija ni nujno povezana z večjo inhibicijo encima.

3 METODE DELA

3.1 Določanje encimske aktivnosti

Metodo, ki je bila uporabljena v magistrskem delu, je v svoji raziskavi opisal Ellman s sodelavci (1961); prilagodili smo jo za delo z mikrotitrskimi ploščami. Metoda omogoča oceno biološke aktivnosti suspenzij nano TiO_2 , ki se izraža kot sposobnost delcev, da adsorbirajo biološke molekule in jih spremenijo oz. inhibirajo njihovo aktivnost. Namen raziskave je bil določiti, kako štiri koncentracije dvanajstih različnih delcev TiO_2 , ki smo jih prejeli od raziskovalnih partnerjev, adsorbirajo in inhibirajo AChE. Na ta način smo vrednotili biološko reaktivnost delcev TiO_2 . AChE, uporabljena v poskusih, je izolirana iz električne jegulje (lat. *Electrophorus electricus*).

AChE razgradi substrat acetiltioholinklorid (v nadaljevanju AChCl), ki je bil uporabljen v raziskavi, v tioholin in acetat. Tioholin z dodatkom na svetlobo občutljivega barvnega indikatorja DTNB, ki je sestavni del Ellmanovega reagenta (5,5'-ditiobis(2-nitrobenzojska kislina)) tvori rumen produkt (5-tio-2-nitrobenzoatni anion). Izmerili smo količino nastalega rumenoobarvanega produkta pri valovni dolžini 405 nm. Večja intenziteta barve nakazuje na večjo aktivnost AChE. Kot pozitivna kontrola vezave in inhibicije aktivnosti AChE je bila uporabljena kemikalija eserin oz. fizostigmin. Kot negativna kontrola je bil uporabljen K-P pufer. Z negativno kontrolo, za katero smo namesto delcev TiO_2 uporabili K-P pufer, smo preverjali, kakšna je prvotna aktivnost AChE. Eserin je bil kot pozitivna kontrola uporabljen zato, ker se močno veže na encim in inhibira njegovo aktivnost. Na ta način smo preverili, ali uporabljena metoda omogoča detekcijo inhibicije in adsorpcije AChE.

Pri vsaki izvedeni meritvi inhibicije oziroma adsorpcije smo za vse merjene koncentracije delcev TiO_2 , pozitivno in negativno kontrolo, pripravili slepe vzorce. Za slepi vzorec smo namesto encima uporabili K-P pufer. Na ta način smo preverili, ali uporabljeni delci motijo meritev absorbance ter ali delci sami reagirajo z Ellmanovim reagentom. Od rezultatov inhibicije AChE smo odšteli rezultate, dobljene za slepi vzorec in tako izračunali stopnjo inhibicije brez napake zaradi reakcije med drugimi komponentami v vzorcu (na primer sprememba barve vzorca zaradi reakcije med delci TiO_2 in Ellmanovim reagentom brez dodatka encima).

Laboratorijsko delo smo izvajali v prostorih Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

3.2 Seznam uporabljenih kemikalij in drugih snovi

Pri izvedbi poskusov smo uporabili naslednje kemikalije in snovi:

- AChCl (Sigma-Aldrich, št: A5626-5G), CAS: 6050-81-3
- AChE (Sigma-Aldrich, št.: C2888 5KU), CAS: 9000-81-1
- DTNB (5,5-ditiobis-2-nitrobenzoat, ki je občutljiv na svetlobo; M=396,35 g/mol) (Sigma-Aldrich, LOT: 200-714-4), CAS: 69-78-3
- Eserin (Sigma-Aldrich, LOT: MFCD00151090), CAS: 57-47-6
- KH_2PO_4 (M = 136,09 g/mol; Sigma-Aldrich, LOT: P5379-500G), CAS: 7778-77-0
- K_2HPO_4 (M = 174,18 g/mol; Merck, LOT: A660799 740)
- MiliQ voda, pripravljena preko ionskega izmenjevalca Advantage A10 TOC Monitor
- NaHCO_3 (Merck, LOT: K39626980 924), CAS: 144-55-8
- NaOH 10 M (Merck, LOT: K91404445 747), CAS: 1310-73-2
- Delci TiO_2 različnih proizvajalcev z oznakami: G1–1, G2–5, G3–1, G4–19, G5–4, G6–3, G7–5, G8–2, G9–5, G10–4, E171–E in 67–CC.

3.3 Seznam uporabljenega materiala in opreme

Pri izvedbi poskusov smo uporabili naslednji laboratorijski material:

- Aluminijasta folija
- Plastična centrifugirka, 15 mL in 50 mL, proizvajalca BrandTech, LOT: 18P1098301
- Merilni valj 1.000 mL ISOLAB Boro 3.3, 1000:10 mL \pm 5,0 mL
- Mikrocentrifugirka – 2 mL, proizvajalca: Golias, LOT: 18006
- Mikrotitrne plošče, prozorne z ravnim dnom Mikrotestplatte 96 Well, F, LOT: 8021211
- Konice pipet:
 - 200 μL , rumeni, tip E, proizvajalec Rotiolab, LOT: 590169
 - 100–1.000 μL , modri, tip E, proizvajalec Rotiolab, LOT: 596995
- Steklenica reagentna, brezbarvno steklo BRAND, 1.000 mL

3.4 Seznam uporabljenih naprav in pripomočkov

- Centrifuga Sigma 3-30 KS, uporabljen rotor št. 12110
- Hladilnik z zamrzovalnikom Gorenje, FrostLess
- Merilnik absorbance Tecan Infinite F Nano+ 200 PR
- Pipete:
 - Avtomatska 20–200 μL Transferpette S, 04L 22771
 - Avtomatska 100–1.000 μL Transferpette S, 18B 76451
 - Multikanalska pipeta Thermo Scientific, Finnpipette F1, 10–100 μL , JH71516
- Stresalnik za epruvete Vibromix 114
- Štoparica
- Analitska Tehnica Kern ABT 100-5NM

3.5 Priprava reagentov

Za potrebe izvedbe eksperimenta smo pripravili raztopino pufrov, Ellmanovega reagenta, substrat acetilholinklorida, encim acetilholinesterazo in suspenzijo različnih testnih delcev TiO_2 , kar je predstavljeno v nadaljevanju poglavja.

3.5.1 Pufri

- 100 mM K-P pufer, pH 8 smo pripravili tako, da smo 1,6 g KH_2PO_4 in 15,4 g K_2HPO_4 dolili miliQ vodo do volumna 1L in premešali. Izmerili smo pH in ga do pH 8 uravnali z dodatkom NaOH. Pufer smo do uporabe hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.
- 250 mM K-P pufer, pH 7,4 smo pripravili tako, da smo pripravili bazo in kislino. Priprava baze: 4,35 g K_2HPO_4 , kateremu smo do volumna 100 mL dodali miliQ vodo. Priprava kisline: 1,70 g KH_2PO_4 , kateremu smo do volumna 50 mL dodali miliQ vodo. V bazo smo počasi dodajali kislino, dokler vrednost pH pufra ni dosegla pH 7,4. Do uporabe smo pufer hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

3.5.2 Ellmanov reagent

Ellmanov reagent smo pripravili tako, da smo zatehtali 91 mg DTNB (5,5-ditiobis-2-nitrobenzoat) in 37,5 mg NaHCO₃, kemikalijama pa dodali 100 mL 250 mM K-P pufra pH 7,4. Dolili smo vodo miliQ do volumna 1L in dobro premešali. Steklenico z reagentom smo prekrili z aluminijasto foljo, da smo preprečili izpostavljenost reagenta svetlobi in jo hranili v hladilniku pri temperaturi 4 °C.

3.5.3 Substrat acetiltioholinklorid

Založno raztopino substrata smo pripravili tako, da je bila koncentracija AChCl 1 M. Do uporabe smo substrat hranili v zamrzovalniku.

3.5.4 Encim acetilholinesteraza

Encim AChE, izoliran iz električne jegulje, smo pripravili tako, da je suspenzija vsebovala 50 encimskih enot/mL 100 mM K-P pufra (pH 8). Do uporabe smo encim hranili v zamrzovalniku.

3.5.5 Delci TiO₂

Delce TiO₂ smo prejeli v praškasti obliki, iz katerih smo pripravili založne vodne suspenzije s koncentracijo 10 mg/mL. Za redčitev smo uporabili vodo miliQ. Pri tehtanju delcev v praškasti obliki smo uporabili zaščitno polmasko. V eksperimentu smo uporabili koncentracije delcev 60 µg/mL, 600 µg/mL, 6.000 µg/mL in 10.000 µg/mL, ki smo jih z dodajanjem reagentov 6-krat razredčili. Na ta način smo dobili končne koncentracije delcev 10 µg/mL, 100 µg/mL, 1.000 µg/mL in 1.666,7 µg/mL.

Delci TiO₂ so poimenovani na enak način, kot jih je poimenoval pogodbeni partner, Titanium Dioxide Manufacturers association: TDMA. V Tabeli 1 so predstavljene karakteristike uporabljenih delcev TiO₂. Za določanje velikosti delcev je bil uporabljen transmisijski elektronski mikroskop (TEM).

Tabela 1: Karakteristike uporabljenih delcev TiO_2

Oznaka delcev	Opis delcev	Anatazna kristalna struktura	Rutilna kristalna struktura	Povprečna velikost delcev (nm)
G1-1	Nepremazani ND z anatazno in rutilno kristalno strukturo	85 %	15 %	<100
G2-5	Nepremazani ND z anatazno kristalno strukturo	Vsebuje	Ne vsebuje	5-7
G3-1	Nepremazani pigmentni delci z rutilno kristalno strukturo	Ne vsebuje	Vsebuje	300
G4-19	Pigmentni delci z rutilno kristalno strukturo, premazani z Al_2O_3	Ne vsebuje	Vsebuje	>100
G5-4	Pigmentni delci z rutilno kristalno strukturo, premazani z Al_2O_3 in ZrO_2	Ne vsebuje	Vsebuje	500
G6-3	ND z rutilno kristalno strukturo, premazani z Al_2O_3 in stearinsko kislino	Ne vsebuje	Vsebuje	10
G7-5	Pigmentni delci z rutilno kristalno strukturo, premazani s SiO_2 in Al_2O_3	Ne vsebuje	Vsebuje	~170
G8-2	ND z rutilno kristalno strukturo, premazani s SiO_2	Ne vsebuje	Vsebuje	20
G9-5	Pigmentirani delci z rutilno kristalno strukturo, premazani z $AlPO_4$	Ne vsebuje	Vsebuje	~170
G10-4	ND z anatazno kristalno strukturo, premazan z volframom	Vsebuje	Ne vsebuje	15
E171-E	Pigmentni nepremazani delci z anatazno kristalno strukturo	Vsebuje	Ne vsebuje	>100
67-CC	Od pogodbenega partnerja nismo prejeli podatkov o karakteristikah teh delcev.			

3.6 Izvedba poskusa

Merjenje absorbance je potekalo na mikrotitrskih ploščah. Vse uporabljene reagente in pufre smo pred uporabo segreli na sobno temperaturo (~20 °C). AChE smo do uporabe hranili v hladilniku. Za vsak vzorec smo izvedli najmanj tri ponovitve. Če je bilo za katero vrsto delcev izvedenih več ponovitev, je to zapisano v nadaljevanju, pri predstavitvi rezultatov za posamezno vrsto TiO₂ delcev.

Pred izvedbo poskusa smo iz založne koncentracije encima in založne raztopine substrata in inhibitorja pripravili delovne koncentracije: 0,06 encimskih enot/mL, 2 mM koncentracijo substrata AChCl, 12 mM koncentracijo eserina, razredčeno v 100 mM koncentraciji K-P pufra (pH 8). Pripravili smo tudi delovne koncentracije delcev TiO₂ v miliQ vodi (pripravljene koncentracije so bile 6-krat višje od končnih koncentracij, ki pridejo v stik z encimom).

Pri meritvi inhibicije se meri celotna aktivnost AChE – AChE, na katero so vezani ND in »prosta« AChE. Reagenti so bili dodani mešanici AChE in ND pred centrifugacijo, torej pred razbitjem AChE-ND kompleksa. Pri meritvah adsorpcije se meri količina »proste« AChE, iz rezultatov pa lahko sklepamo, koliko AChE je bilo adsorbirane.

3.6.1 Merjenje inhibicije acetilholinesteraze

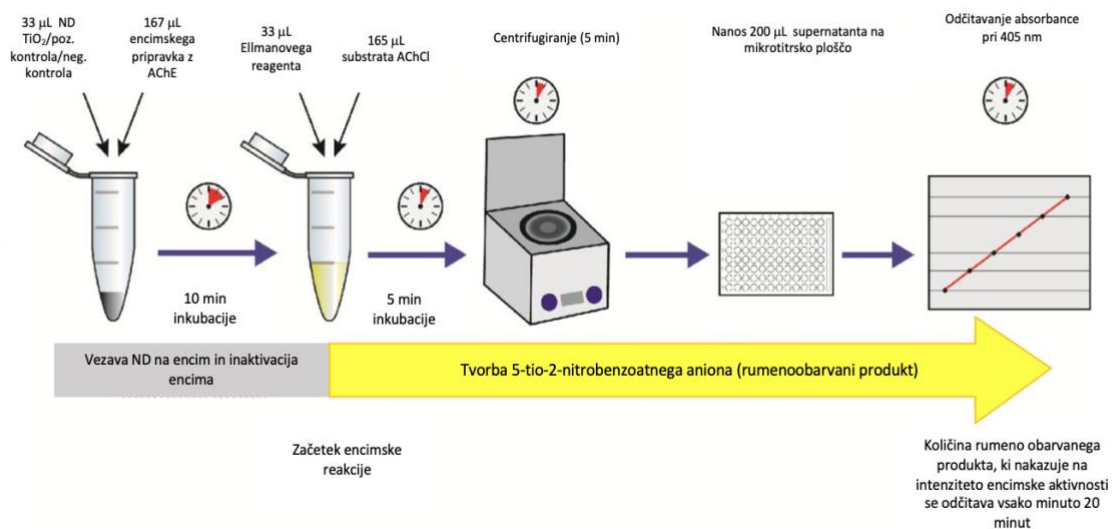
V 1,5 mL mikrocentrifugirke smo poleg 165 μL delovne koncentracije encima AChE (0,06 encimskih enot/mL) za preverjanje učinkovitosti aktivnosti encima odpipetirali:

- 33 μL suspenzije delcev TiO_2 (koncentracije 60 $\mu\text{g/mL}$, 600 $\mu\text{g/mL}$, 6.000 $\mu\text{g/mL}$ in 10.000 $\mu\text{g/mL}$)
ali
- 33 μL eserina (koncentracija 12 μM), ki je služil kot pozitivna kontrola
ali
- 33 μL K-P pufru (pH 8), ki je služil kot negativna kontrola.

Enak postopek smo ponovili še za določevanje slepega vzorca, le da smo namesto encima v 1,5 mL mikrocentrifugirke odpipetirali 165 μL K-P pufru (pH 8) ter dodali delce ali eserin ali K-P pufer.

Vse mikrocentrifugirke smo rahlo premešali in inkubirali na sobni temperaturi 10 minut. Po desetih minutah smo v vse mikrocentrifugirke odpipetirali 330 μL Ellmanovega reagenta, ki smo mu dodali 165 μL substrata AChCl.

Po rahlem mešanju smo vzorce ponovno inkubirali na sobni temperaturi 5 minut. Nato smo izvedli centrifugiranje z RCF $14.500 \times g$ pri 20 °C 5 minut. V tri odprtine mikrotitrne plošče smo za posamezni vzorec odpipetirali 200 μL tekočine, ki je ostala v mikrocentrifugirki nad usedlino po centrifugiranju. Meritve absorcance so potekale 20 minut, vsako minuto je bil pri valovni dolžini 405 nm odčitani rezultat. Postopek merjenja inhibicije prikazuje Slika 1.



Slika 1: Shematski prikaz postopka za merjenje inhibicije acetilholinesteraze (slika prilagojena po Jemec et al., 2016)

Merjenje adsorpcije delcev TiO₂ na acetilholinesterazo

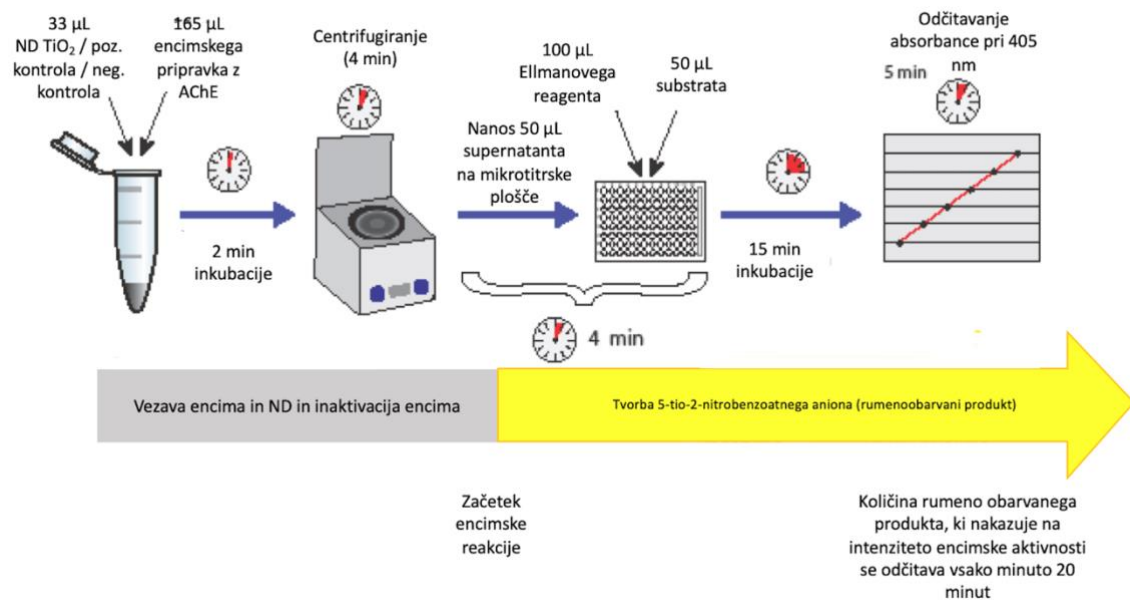
V 1,5 mL mikrocentrifugirke smo poleg 165 μ L delovne koncentracije encima AChE (0,06 encimskih enot/mL) za preverjanje učinkovitosti aktivnosti encima odpipetirali:

- 33 μ L suspenzije delcev TiO₂ (koncentracije 60 μ g/mL, 600 μ g/mL, 6.000 μ g/mL in 10.000 μ g/mL)
ali
- 33 μ L eserina (koncentracija 12 μ M), ki je služil kot pozitivna kontrola
ali
- 33 μ L K-P pufru (pH 8), ki je služil kot negativna kontrola.

Enak postopek smo ponovili še za določevanje slepega vzorca, le da smo namesto encima v 1,5 mL mikrocentrifugirke odpipetirali 165 μ L K-P pufru (pH 8) ter dodali delce ali eserin ali K-P pufer.

Vse mikrocentrifugirke smo rahlo premešali. Čas inkubacije je bil 2 minuti na sobni temperaturi. Nato smo izvedli centrifugiranje z RCF $14.500 \times g$ pri 20 °C 4 minute.

V tri odprtine mikrotitrne plošče smo za posamezni vzorec odpipetirali 50 μ L tekočine, ki je ostala v mikrocentrifugirki nad usedlino po centrifugiranju. Nato smo v odprtine dodali še 100 μ L Ellmanovega reagenta in 50 μ L substrata AChCl. Vse mikrocentrifugirke smo rahlo premešali in jih pustili na sobni temperaturi 15 minut. Meritve smo izvajali 20 minut, vsako minuto je bil pri valovni dolžini 405 nm odčitana rezultat. Postopek merjenja adsorpcije prikazuje Slika 2.



Slika 2: Shematski prikaz postopka za merjenje adsorpcije acetilholinesteraze (slika prilagojena po Jemec et al., 2016)

3.7 Pridobivanje rezultatov in statistična obdelava podatkov

Izvedli smo najmanj tri neodvisne ponovitve za vse štiri koncentracije vsakega od dvanajstih vzorcev TiO₂ za meritve inhibicije in adsorpcije. Več ponovitev smo izvedli v primeru, da je bil standardni odklon (angl. *standard deviation*, v nadaljevanju SD) treh meritev večji od $\pm 10\%$. Znotraj vsake ponovitve smo za vsako koncentracijo delcev TiO₂ izvedli tri paralelke vzorcev. Za vsako ponovitev smo v programu Microsoft Excel 2019 izračunali razliko v absorbanci med časom 0 (ko se je meritev absorbance začela) in po 20 minutah (ko je bila izvedena zadnja meritev absorbance). Od izračunane absorbance realnih vzorcev smo za vsako od treh paralelk odšteli absorbenco slepih vzorcev in iz dobljenih razlik izračunali povprečje.

Predpostavili smo, da je aktivnost encima pri negativni kontroli (kjer je AChE namesto delcev TiO₂ dodan K-P pufer) 100 %. Za pozitivno kontrolo in štiri koncentracije delcev TiO₂ v vzorcu smo aktivnost encima določili tako, da smo izračunano povprečno absorbenco odšteli od 100 % (povprečne absorbance negativne kontrole). Ta rezultat je predstavljal odstotek inhibicije encima. Pri računanju stopnje adsorpcije encima na delce je bil postopek računanja enak. Iz vseh rezultatov smo izračunali povprečno stopnjo inhibicije (PSI) in povprečno stopnjo adsorpcije (PSA) encima v odstotkih ter standardni odklon (v nadaljevanju SD). Za statistično analizo PSI in PSA pri vseh koncentracijah smo uporabili t-test. Predpostavili smo, da vrednosti $p < 0,05$ predstavljajo statistično pomembno razliko glede na kontrolno vrednost, kar smo na grafih označili z * (vrednosti $p < 0,01$ so označene z **, vrednosti $p < 0,001$ pa z ***). Za vrednosti $p > 0,05$ smo predpostavili, da ne predstavljajo statistično pomembne razlike.

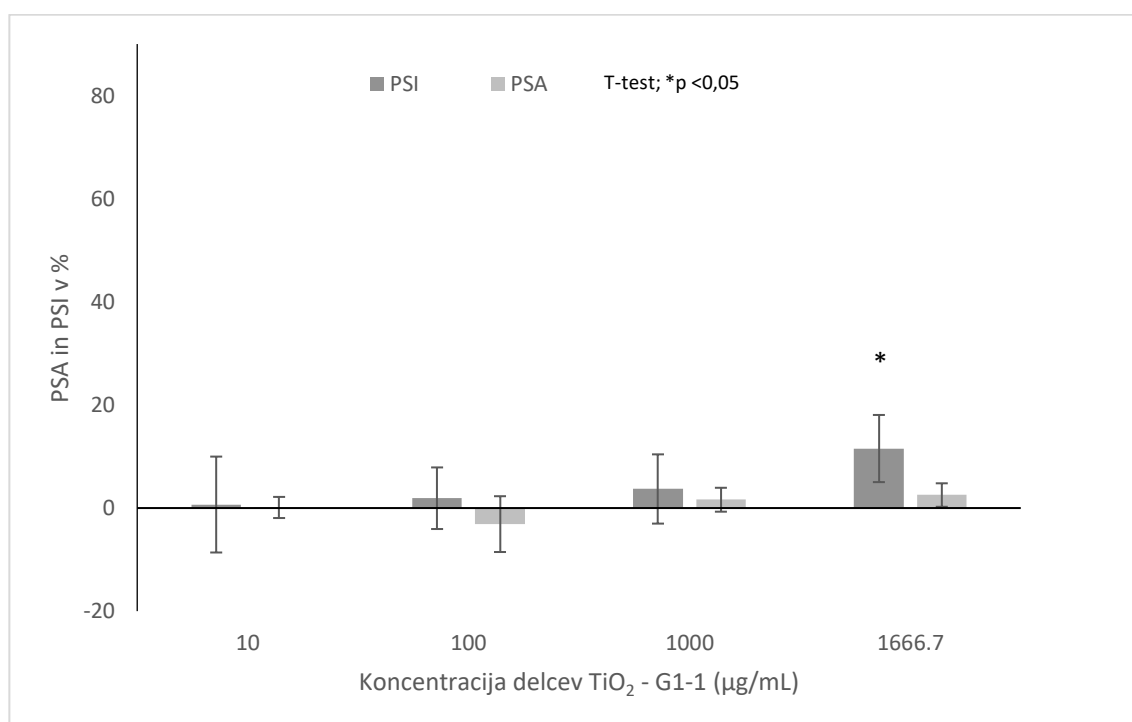
PSI in PSA encima AChE je bila za pozitivno kontrolo med 70 in 90 %. To predstavlja pričakovan odziv AChE na znani inhibitor.

V poglavju rezultati so predstavljeni vplivi štirih koncentracij dvanajstih različnih delcev TiO₂ na aktivnost encima AChE. Za prikazovanje rezultatov je bila uporabljena skala od -20% do 80% , saj so bili rezultati, ki smo jih dobili za večino delcev, zajeti v to območje vrednosti. Izjema so bili delci z oznako E171-E, za katere smo pri meritvah adsorpcije dobili rezultate in vrednosti standardnega odklona do -60% . Temu primerno smo priredili skalo, ki zajema vrednosti med -65% in 35% .

4 REZULTATI

4.1 Vpliv delcev TiO₂ G1-1 na AChE

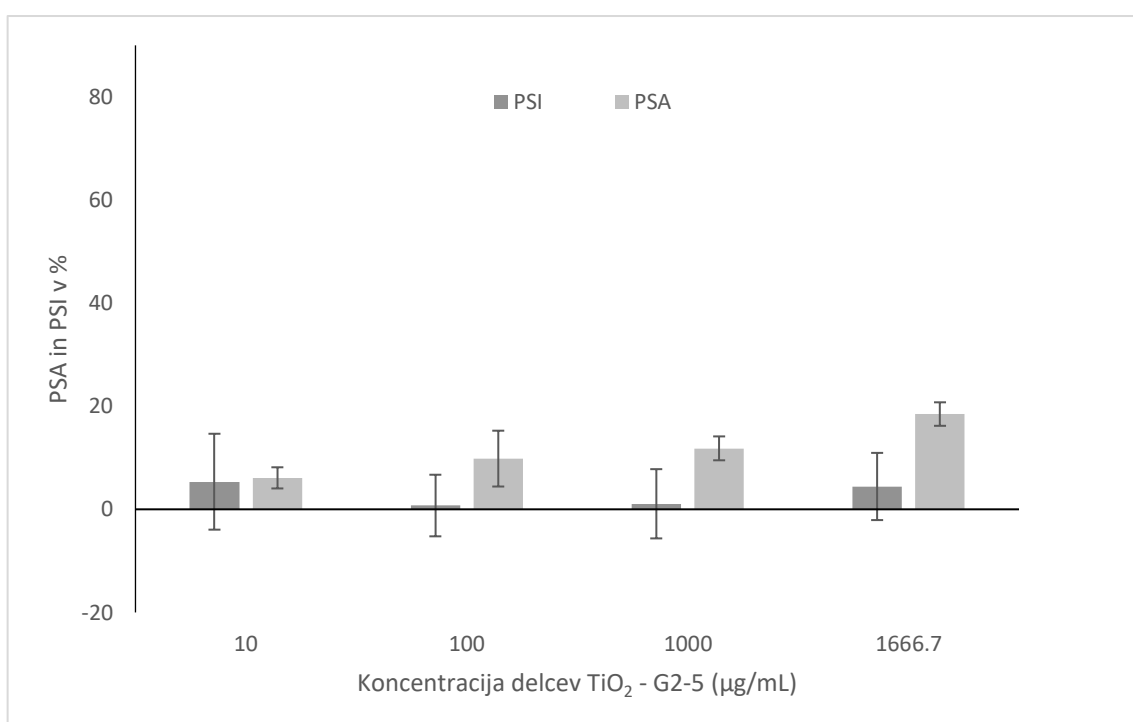
PSI encima AChE zaradi prisotnosti delcev TiO₂ z oznako G1-1 (v kateri prevladuje anatazna struktura kristalov, povprečna velikost delcev pa je <100 nm) narašča z višanjem koncentracije delcev TiO₂ v vzorcu. Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je inhibicija največja in znaša 11,5 % (±6,5). V primeru PSA pa ugotavljamo, da je le-ta v primeru nizkih koncentracij delcev TiO₂ celo negativna in znaša -3,1 % (±6,0) v primeru koncentracije 100 µg/mL. Z višanjem koncentracije se sicer nekoliko poveča, a še vedno v primeru najvišje koncentracije delcev TiO₂ (1.666,7 µg/mL) znaša le 2,5 % (±2,3). PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 3.



Slika 3: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G1-1). Za vsako testno koncentracijo delcev G1-1 smo izvedli 3 neodvisne ponovitve meritev inhibicije in adsorpcije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije, primerjalno na vrednost kontrole v odstotkih (±SD). Zvezdica na grafu prikazuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci TiO₂ (* $p < 0,05$; t -test).

4.2 Vpliv delcev TiO₂ G2–5 na AChE

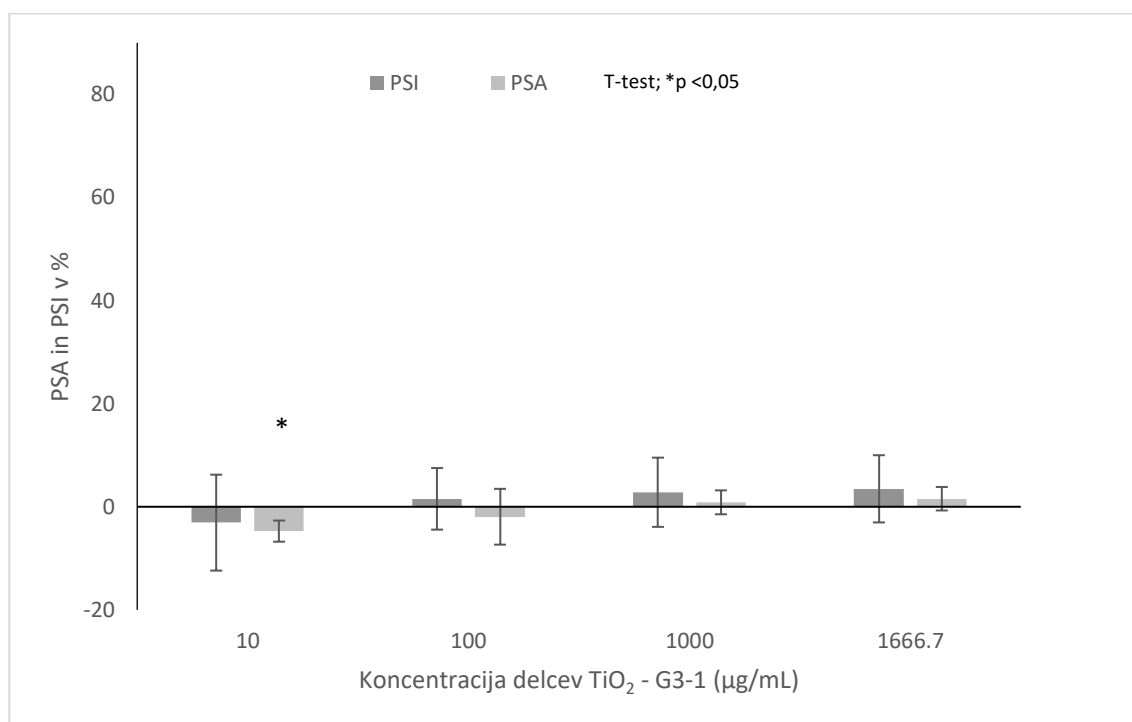
PSI encima AChE je zaradi prisotnosti delcev TiO₂ z oznako G2–5 (anatazna struktura kristalov, povprečna velikost delcev je med 5 in 7 nm) največja pri najnižji koncentraciji delcev (10 µg/mL) in znaša 5,4 % (±4,6). Pri koncentraciji delcev TiO₂ 100 µg/mL je PSI najmanjša in znaša 0,7 % (±3,8). Z višanjem koncentracije delcev TiO₂ v vzorcu PSI narašča. V primeru PSA pa ugotavljamo, da ta narašča z višanjem koncentracije delcev TiO₂ v vzorcu. Največja PSA je v primeru najvišje koncentracije delcev TiO₂ (1.666,7 µg/mL) in znaša 18,5 % (±8,9). PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 4.



Slika 4: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G2–5). Za vsako testno koncentracijo delcev G2–5 smo izvedli 3 neodvisne ponovitve meritev inhibicije in adsorpcije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije v odstotkih (±SD). Rezultati t-testa so pokazali, da se rezultati v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci, pri nobeni od koncentracij statistično ne razlikujejo.

4.3 Vpliv delcev TiO₂ G3–1 na AChE

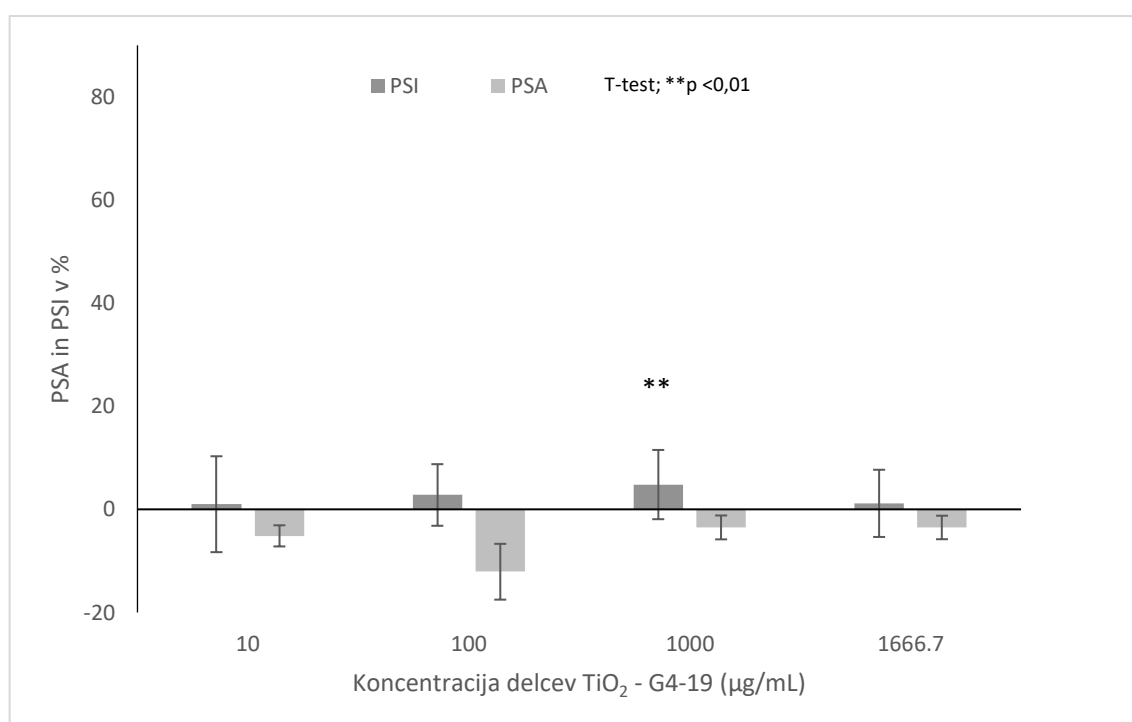
PSI encima AChE zaradi prisotnosti delcev TiO₂ z oznako G3–1 (rutilna struktura kristalov, povprečna velikost delcev pa je 300 nm) narašča z višanjem koncentracije delcev v vzorcu. Pri najnižji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (10 µg/mL) je inhibicija najmanjša in znaša –3,1 (±7,6). Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je inhibicija največja in znaša 3,5 % (±3,0). V primeru PSA prav tako ugotavljamo, da PSA z višanjem koncentracije delcev TiO₂ narašča. Pri najnižji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (10 µg/mL) je adsorpcija najmanjša in znaša –4,7 % (±1,9). Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je adsorpcija največja in znaša 1,6 % (±2,2). PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 5.



Slika 5: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G3–1). Za vsako testno koncentracijo delcev G3–1 smo izvedli 3 neodvisne ponovitve meritev adsorpcije in 4 neodvisne ponovitve meritev inhibicije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije v odstotkih (±SD). Zvezdica na grafu prikazuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci (* p < 0,05; t-test).

4.4 Vpliv delcev TiO₂ G4–19 na AChE

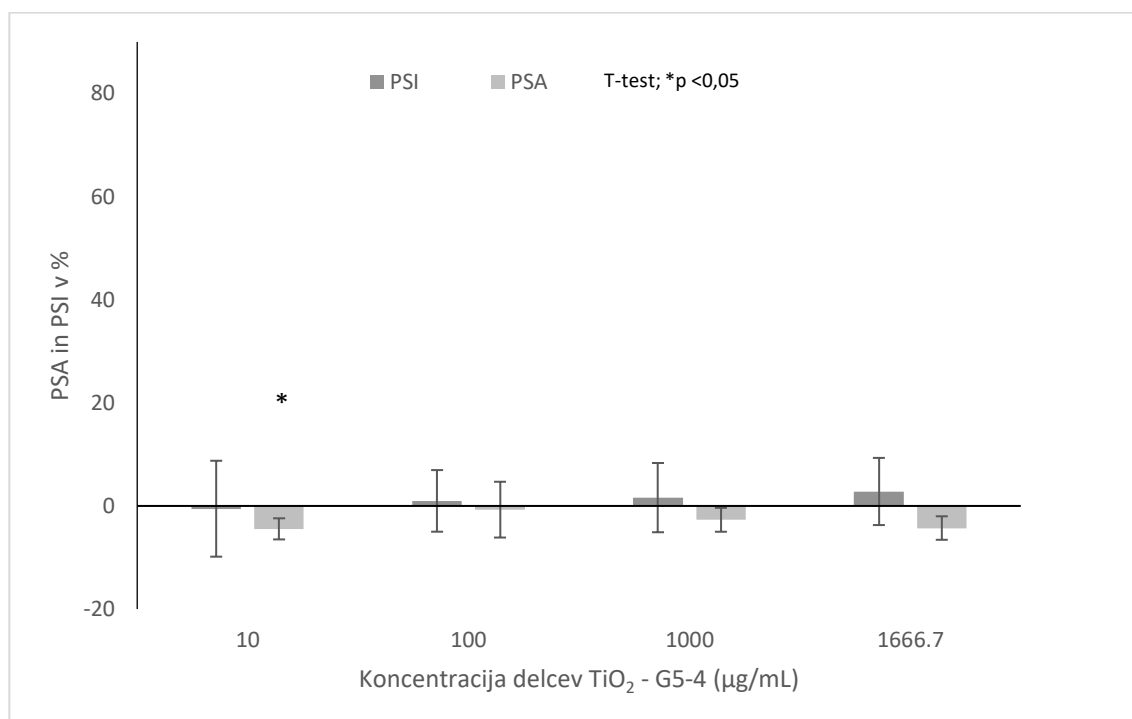
PSI encima AChE zaradi prisotnosti delcev TiO₂ z oznako G4–19 (v kateri prevladuje rutilna struktura kristalov, delci so premazani z Al₂O₃, povprečna velikost delcev pa je >100 nm) pri prvih treh koncentracijah narašča z višanjem koncentracije delcev TiO₂ v vzorcu. Pri koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu 1.000 µg/mL je inhibicija največja in znaša 4,8 % (±1,1). Pri koncentraciji 1.666,7 µg/mL delcev TiO₂ v vzorcu se inhibicija zniža in znaša 1,2 % (±1,6). V primeru PSA pa ugotavljamo, da je ta pri vseh koncentracije negativna. Najmanjša adsorpcija je pri koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu 100 µg/mL in znaša –12,1 % (±8,2). Pri višjih koncentracijah delcev TiO₂ v vzorcu (1.000 in 1.666,7 µg/mL) se adsorpcija nekoliko poveša, vendar še vedno zajema negativne vrednosti. PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 6.



Slika 6: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G4–19). Za vsako testno koncentracijo delcev G4–19 smo izvedli 3 neodvisne ponovitve meritev inhibicije in adsorpcije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije v odstotkih (±SD). Zvezdica na grafu prikazuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci (**p < 0,01; t-test).

4.5 Vpliv delcev TiO₂ G5–4 na AChE

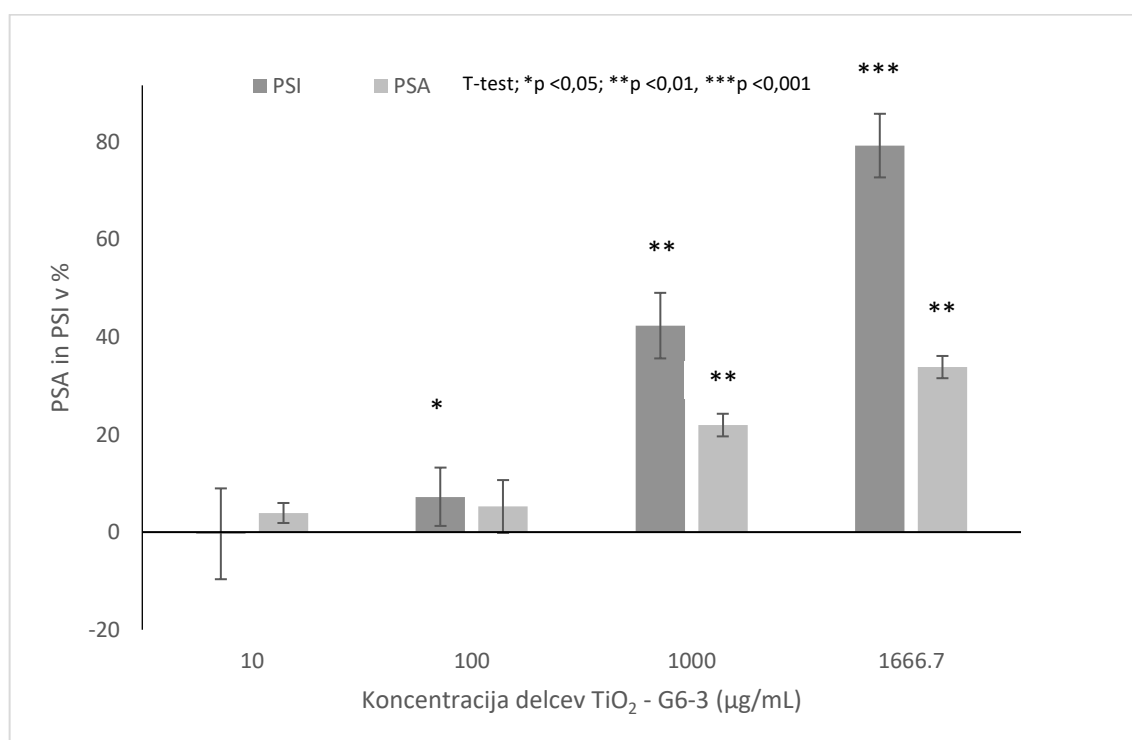
PSI encima AChE zaradi prisotnosti delcev TiO₂ z oznako G5–4 (v kateri prevladuje rutilna struktura kristalov, delci so premazani z Al₂O₃ in ZrO₃, povprečna velikost delcev pa je 500 nm) narašča z višanjem koncentracije delcev v vzorcu. Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je inhibicija največja in znaša 2,8 % (±4,8). V primeru PSA pa ugotavljamo, da je ta pri vseh koncentracijah negativna. Pri najnižji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (10 µg/mL) znaša adsorpcija –4,5 % (±3,4). Največja adsorpcija je pri koncentraciji delcev TiO₂ 100 µg/mL in znaša –0,7 % (±6,8). PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 7.



Slika 7: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G5–4). Za vsako testno koncentracijo delcev G5–4 smo izvedli 3 neodvisne ponovitve meritev inhibicije in 4 neodvisne meritve adsorpcije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije v odstotkih (±SD). Zvezdica na grafu prikazuje statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci (**p* < 0,05; *t*-test).

4.6 Vpliv delcev TiO₂ G6–3 na AChE

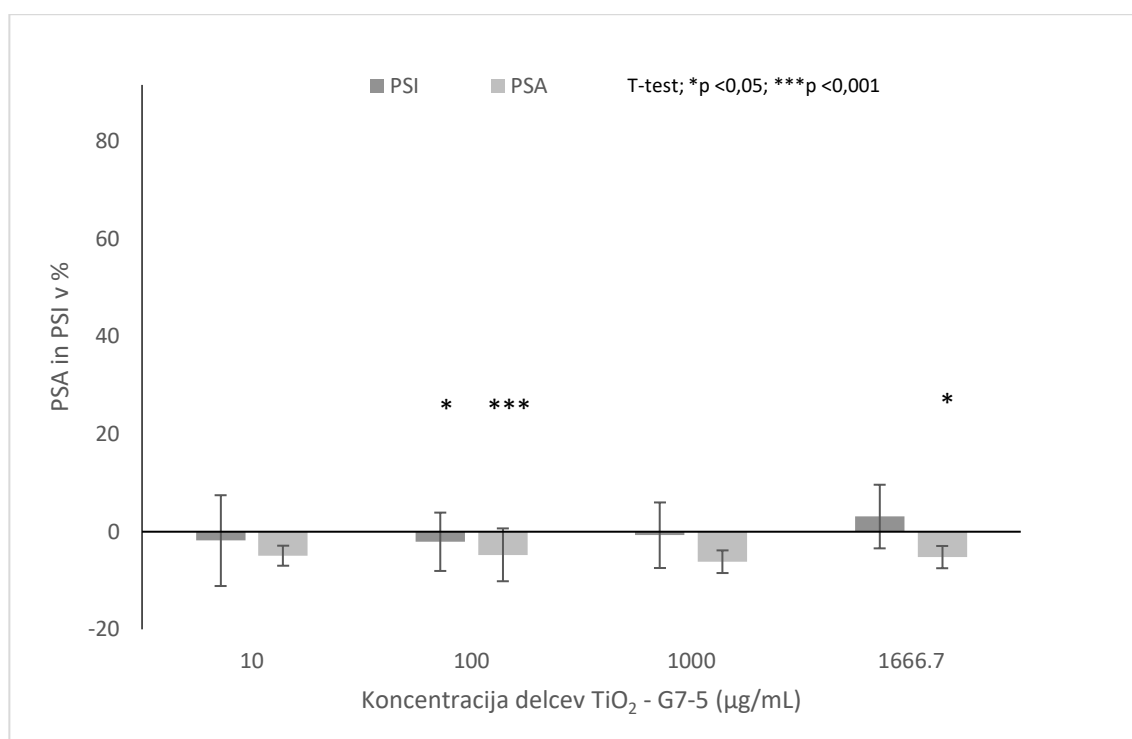
PSI encima AChE zaradi prisotnosti delcev TiO₂ z oznako G6–3 (v kateri prevladuje rutilna struktura kristalov, delci so premazani z Al₂O₃ in stearinsko kislino, povprečna velikost delcev pa je 10 nm) narašča z višanjem koncentracije delcev v vzorcu. Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je inhibicija največja in znaša 79,2 % (±1,6), pri najnižji koncentraciji (10 µg/mL) pa je inhibicija celo negativna in znaša –0,4 % (±2,4). Tudi v primeru PSA ugotavljamo, da se ta veča z višanjem koncentracije delcev TiO₂ v vzorcu. Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je adsorpcija največja in znaša 33,8 % (±11,7), najmanjša adsorpcija je pri najnižji koncentraciji (10 µg/mL) in znaša 3,9 % (±7,2). PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 8.



Slika 8: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G6–3). Za vsako testno koncentracijo delcev G6–3 smo izvedli 4 neodvisne ponovitve meritev inhibicije in 3 neodvisne meritve adsorpcije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije v odstotkih (±SD). Zvezdice na grafu prikazujejo statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; t-test).

4.7 Vpliv delcev TiO₂ G7-5 na AChE

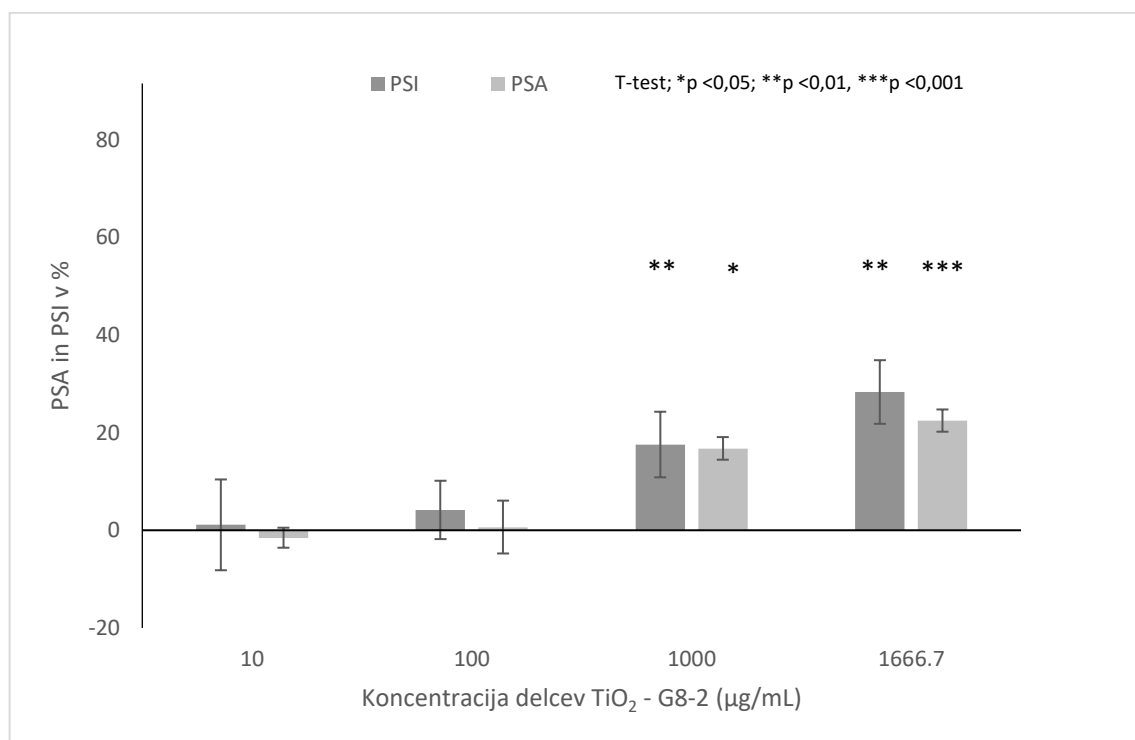
PSI encima AChE zaradi prisotnosti delcev TiO₂ z oznako G7-5 (v kateri prevladuje rutilna struktura kristalov, delci so premazani z Al₂O₃ in SiO₂, povprečna velikost delcev pa je 170 nm) je pri najvišji koncentraciji delcev (1.666,7 µg/mL) največja in znaša 3,1 % (±5,2). Najmanjša inhibicija je pri koncentraciji delcev 100 µg/mL in znaša -2,1 (±0,4). V primeru PSA ugotavljamo, da adsorpcija pri vseh koncentracijah delcev zavzema negativne vrednosti. Največja adsorpcija je pri koncentraciji delcev 100 µg/mL in znaša -4,7 % (±0,9), najmanjša pa pri koncentraciji delcev 1.000 µg/mL in znaša -6,2 % (±6,1). PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 9.



Slika 9: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G7-5). Za vsako testno koncentracijo delcev G7-5 smo izvedli 3 neodvisne ponovitve meritev adsorpcije in inhibicije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije v odstotkih (±SD). Zvezdice na grafu prikazujejo statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci (*p < 0,05; ***p < 0,001; t-test).

4.8 Vpliv delcev TiO₂ G8-2 na AChE

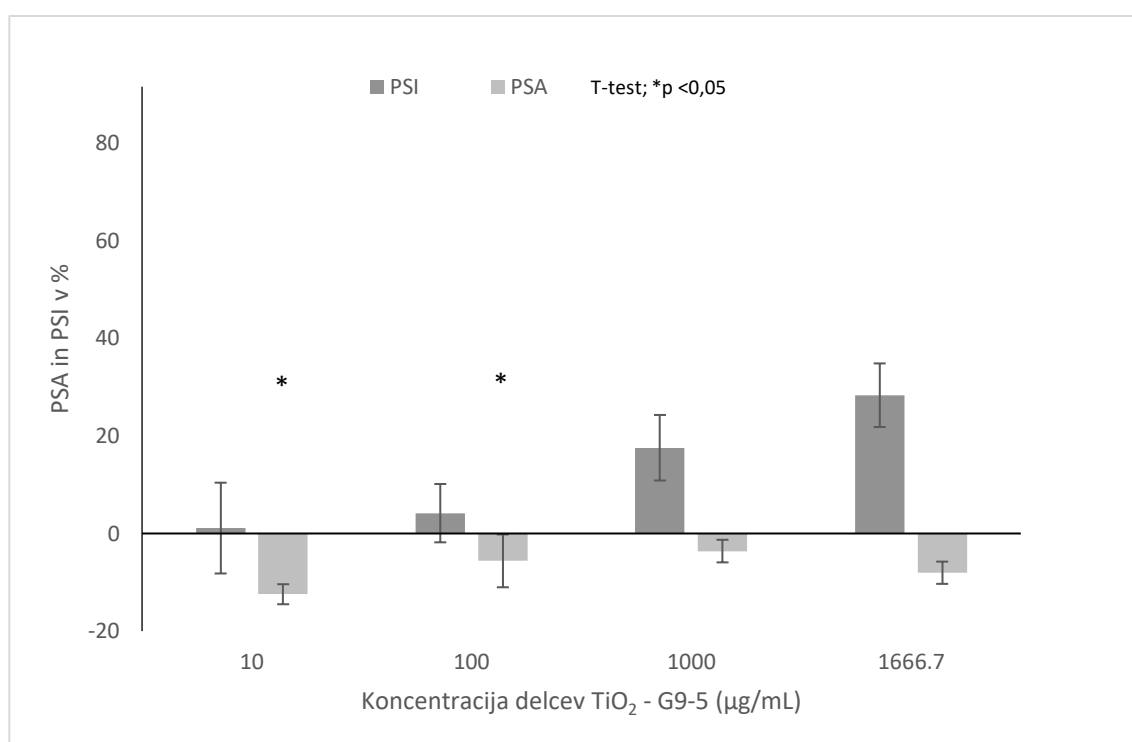
PSI encima AChE zaradi prisotnosti delcev TiO₂ z oznako G8-2 (v kateri prevladuje rutilna struktura kristalov, delci so premazani s SiO₂, povprečna velikost delcev pa je 20 nm) narašča z višanjem koncentracije delcev v vzorcu. Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je inhibicija največja in znaša 28,3 % (±10,6). Tudi v primeru PSA ugotavljamo, da se adsorpcija povečuje z višanjem koncentracijah delcev TiO₂. Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je adsorpcija največja in znaša 22,5 % (±4,2). PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 10.



Slika 10: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G8-2). Za vsako testno koncentracijo delcev G8-2 smo izvedli 3 neodvisne ponovitve meritev inhibicije in adsorpcije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije v odstotkih (±SD). Zvezdice na grafu prikazujejo statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci (*p < 0,05; **p < 0,01; *** p < 0,001; t-test).

4.9 Vpliv delcev TiO₂ G9–5 na AChE

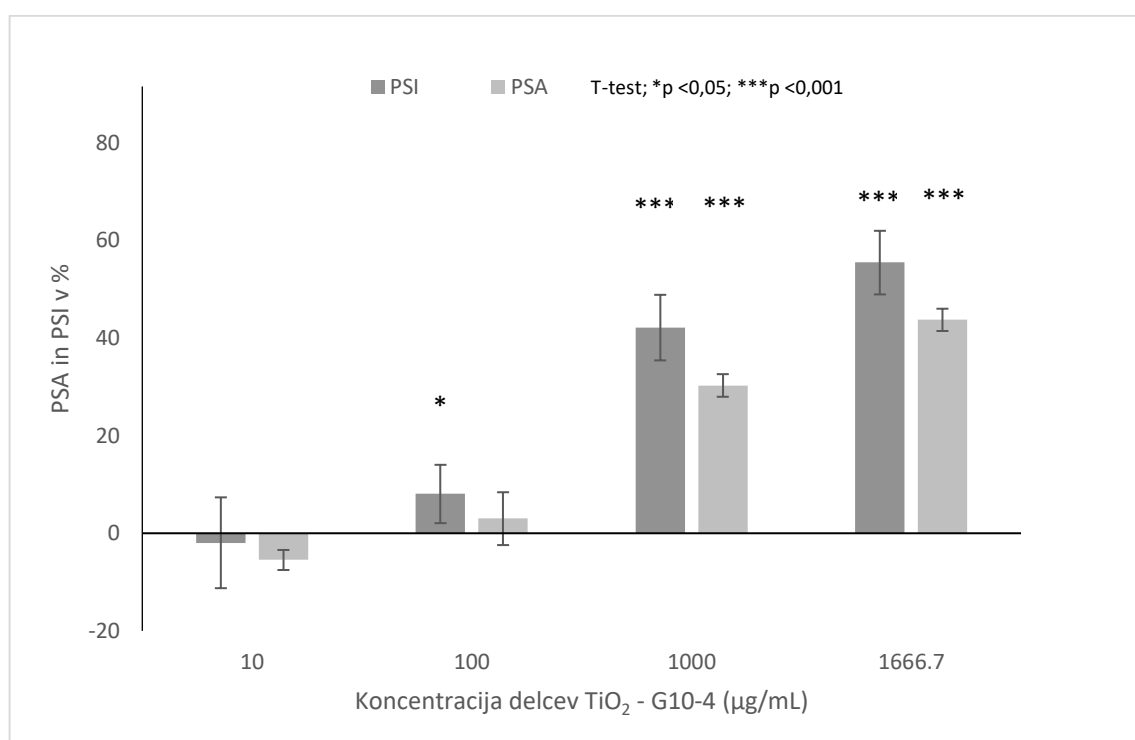
PSI encima AChE zaradi prisotnosti delcev TiO₂ z oznako G9–5 (v kateri prevladuje rutilna struktura kristalov, delci so premazani z AlPO₄, povprečna velikost delcev pa je 170 nm) je največja pri najnižji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (10 µg/mL) in znaša 0,7 % (±3,1). Najmanjša inhibicija je pri koncentraciji delcev TiO₂ 100 µg/mL in znaša –2,1 % (±4,7). V primeru PSA ugotovljamo, da je najmanjša adsorpcija pri koncentraciji delcev TiO₂ 10 µg/mL in znaša –12,4 % (±7,2), največja adsorpcija pa je pri koncentraciji 1.000 µg/mL in je znašala –3,6 % (±2,7). PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 11.



Slika 11: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G9–5). Za vsako testno koncentracijo delcev G9–5 smo izvedli 3 neodvisne ponovitve meritev inhibicije in adsorpcije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije v odstotkih (±SD). Zvezdice na grafu prikazujejo statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci (**p* < 0,05; *t*-test).

4.10 Vpliv delcev TiO₂ G10–4 na AChE

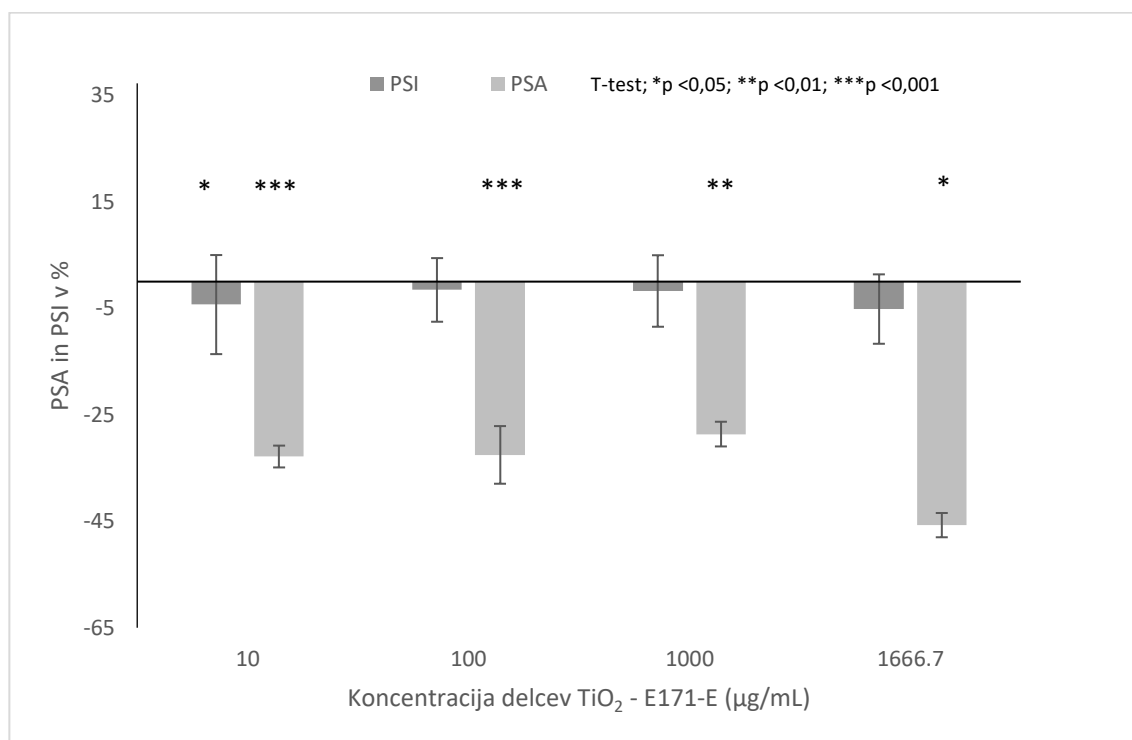
PSI encima AChE zaradi prisotnosti delcev TiO₂ z oznako G10–4 (v kateri prevladuje anatazna struktura kristalov, delci so premazani z volframom, povprečna velikost delcev pa je 15 nm) narašča z višanjem koncentracije delcev TiO₂ v vzorcu. Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je inhibicija največja in znaša 55,5 % (±5,5). Prav tako v primeru PSA ugotavljamo, da se povečuje z višanjem koncentracij delcev TiO₂. Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je adsorpcija največja in znaša 43,7 % (±1,0). PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 12.



Slika 12: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (G10–4). Za vsako testno koncentracijo delcev G10–4 smo izvedli 3 neodvisne ponovitve meritev inhibicije in adsorpcije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije v odstotkih (±SD). Zvezdice na grafu prikazujejo statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci (*p < 0,05; ***p < 0,001; t-test).

4.11 Vpliv delcev TiO₂ E171-E na AChE

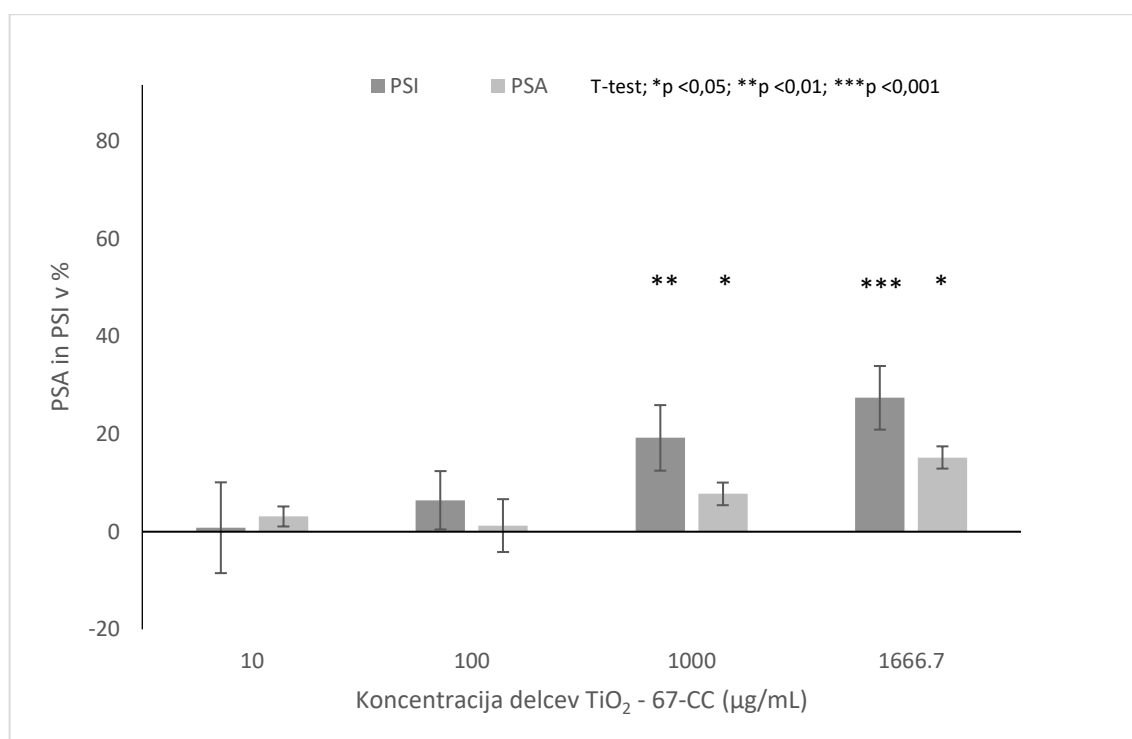
PSI in PSA pri vseh koncentracijah delcev TiO₂ z oznako E171-E (v kateri prevladuje anatazna struktura kristalov, povprečna velikost delcev pa je >100 nm) zavzemajo negativne vrednosti. Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je inhibicija najmanjša in znaša -5,2 % (±7,2), največja inhibicija je pri koncentraciji delcev TiO₂ 100 µg/mL in znaša -1,6 % (±4,8). Adsorpcija je največja pri koncentraciji delcev TiO₂ 1.666,7 µg/mL in znaša -45,7 % (±12,0), najmanjša pa pri koncentraciji delcev TiO₂ 1.000 µg/mL, pri kateri znaša -28,6 % (±3,4). Negativne vrednosti PSA in PSI so verjetno posledica pojava artefakta pri meritvi (neraztopljeni delci so motili prehod žarka skozi vzorec na spektrofotometru). Podatki niso relevantni. PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 13.



Slika 13: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (E171-E). Za vsako testno koncentracijo delcev E171-E smo izvedli 3 neodvisne ponovitve meritev inhibicije in 4 neodvisne meritve adsorpcije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije v odstotkih (±SD). Zvezdice na grafu prikazujejo statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; t-test).

4.12 Vpliv delcev TiO₂ 67-CC na AChE

PSI encima AChE zaradi prisotnosti delcev TiO₂ z oznako 67-CC (za katere nimamo podatka o karakteristikah) narašča z višanjem koncentracije delcev v vzorcu. Pri najnižji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (10 µg/mL) je inhibicija najmanjša in znaša 0,8 % (±4,2). Pri najvišji koncentraciji delcev TiO₂ v vzorcu (1.666,7 µg/mL) je inhibicija največja in znaša 27,4 % (±1,5). V primeru PSA ugotavljamo, da je adsorpcija pri koncentraciji delcev TiO₂ 100 µg/mL najmanjša in znaša 1,3 % (±4,9). Največja adsorpcija je pri najvišji koncentraciji delcev (1.666,7 µg/mL) in znaša 15,2 % (±4,9). PSA in PSI za omenjene delce TiO₂ je prikazana na Sliki 14.



Slika 14: Povprečna stopnja inhibicije (PSI) in povprečna stopnja adsorpcije (PSA) AChE v primeru izpostavljenosti delcem TiO₂ (67-CC). Za vsako testno koncentracijo delcev 67-CC smo izvedli 3 neodvisne ponovitve meritev inhibicije in adsorpcije, pri katerih so bili izmerjeni trije paralelni vzorci. Rezultati so prikazani kot povprečna vrednost adsorpcije in inhibicije v odstotkih (±SD). Zvezdice na grafu prikazujejo statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolnim poskusom, pri katerem AChE niso bili dodani delci (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; t-test).

4.13 Evalvacija povprečne stopnje inhibicije in adsorpcije analiziranih delcev

V Tabeli 2 je z različnimi barvami ter različnim številom + prikazana PSI in PSA za analizirane delce pri različnih koncentracijah. Večje število plusov nakazuje višjo PSI in PSA posamezne vrste delcev pri določeni koncentraciji.

Za delce, katerih vpliv na inhibicijo oziroma adsorpcijo AChE je nižji od 5 %, se predvideva, da nimajo inhibitornega vpliva na aktivnost AChE ter da se ne adsorbirajo na AChE. Posledično zanje ne pričakujemo, da bodo reagirali z biološkimi molekulami. Delci, označeni s +, ++, +++ in ++++ imajo potencial za reakcije z biološkimi sistemi. Večje število + predstavlja večji biološki potencial.

Tabela 2: Evalvacija povprečne stopnje inhibicije (PSI) in povprečne stopnje adsorpcije (PSA) analiziranih delcev

Oznaka delcev	Velikost delcev (nm)	Kristalna struktura		Stopnja inhibicije AChE pri različnih koncentracijah delcev				Stopnja adsorpcije AChE pri različnih koncentracijah delcev			
		Anatazna	Rutilna	10	100	1.000	1.666,7	10	100	1.000	1.666,7
				µg/mL							
G1-1	<100	85 %	15 %				+				
G2-5	5-7	Vsebuje	Ne vsebuje	+				+	+	+	+
G3-1	300	Ne vsebuje	Vsebuje								
G4-19	>100	Ne vsebuje	Vsebuje								
G5-4	500	Ne vsebuje	Vsebuje								
G6-3	10	Ne vsebuje	Vsebuje		+	+++	++++		+	++	++
G7-5	~170	Ne vsebuje	Vsebuje								
G8-2	20	Ne vsebuje	Vsebuje			+	++			+	++
G9-5	~170	Ne vsebuje	Vsebuje								
G10-4	15	Vsebuje	Ne vsebuje		+	+++	++++			++	+++
E171-E	>100	Vsebuje	Ne vsebuje								
67-CC	Ni podatka	Ni podatka			+	+	++			+	+

: Stopnja inhibicije/adsorpcije <5 %.

+: Stopnja inhibicije/adsorpcije med 5 in 20 %.

++: Stopnja inhibicije/adsorpcije med 20,1 in 35 %.

+++ : Stopnja inhibicije/adsorpcije med 35,1 in 50 %.

++++ : Stopnja inhibicije/adsorpcije >50 %.

Iz tabele je razvidno, da je stopnja inhibicije in adsorpcije AChE različna za različne delce. AChE so močnejše inhibirali in adsorbirali delci TiO₂ velikosti med 5 in 100 nm, delci velikosti med 100 in 500 nm pa so imeli znatno manjši vpliv na inhibicijo in adsorpcijo AChE. Različna kristalna struktura delcev v naši študiji ni vplivala na aktivnost AChE. Pri

višjih koncentracijah delcev je bil vpliv na aktivnost AChE večji, predvsem pri delcih, ki so povzročili več kot 10 % vpliv na aktivnost AChE. Vpliv na inhibicijo je bil pri uporabljenih delcih večji od vpliva na adsorpcijo.

5 RAZPRAVA

Z raziskavo smo želeli preveriti vpliv različnih delcev TiO_2 na aktivnost AChE. Bolj kot so delci reaktivni, večja je adsorpcija delcev TiO_2 na površino AChE in bolj delci inhibirajo aktivnost encima.

Pri večini delcev se odziv aktivnosti encima z višanjem koncentracije delcev povečuje. To je opazno predvsem pri delcih, pri katerih je inhibicija in adsorpcija AChE večja od 10 %. Kot v svojem delu navajajo Nel in sodelavci (2009) je za ND značilno, da pri višjih koncentracijah tvorijo aglomerate in posledično večje delce, ki težje reagirajo z encimom. Za ND TiO_2 je tvorba aglomeratov značilna predvsem, kadar imajo rutilno kristalno strukturo (Godnjavec et al., 2010). Pri najvišji koncentraciji, ki je bila uporabljena v naši raziskavi, to je 1.666,7 $\mu\text{g/mL}$, ni bilo opaziti tvorbe aglomeratov, ki bi zmanjšali vpliv ND na aktivnost AChE.

Iz rezultatov je razvidno, da na aktivnost AChE vpliva velikost delcev TiO_2 . Večji vpliv imajo delci TiO_2 velikosti med 5 in 100 nm, ki se uvrščajo med ND. Delci velikosti med 100 in 500 nm so imeli manjši vpliv na aktivnost AChE. Manjši delci imajo večjo specifično površino, kar se odraža v večji kemično-biološki aktivnosti (Navodnik in Kopčič, 2007). Glede na rezultate bi lahko sklepali, da je velikost delcev z oznako 67-CC, za katere nimamo podatkov, manjša od 100 nm. Rezultati za te delce so namreč primerljivi z rezultati ostalih ND.

Kot so v svojem delu zapisali Nel in sodelavci (2009), se s premazi ND lahko spremeni vpliv ND na biološki sistem in njihova interakcija z biološkim sistemom, kar se kaže tudi z različnimi vplivi na aktivnost AChE. Rezultati nakazujejo na to, da so nekateri premazani delci močno vplivali na aktivnost AChE, drugi pa so imeli vpliv manjši od 4 %. Iz tega lahko sklepamo, da na reaktivnost premazanih delcev vplivajo predvsem značilnosti premazov, ki so uporabljeni. Štiri različne vrste delcev, uporabljenih v naši raziskavi, so bile premazane z Al_2O_3 . Delcem TiO_2 dodajajo Al_2O_3 predvsem zato, da so kot premazi bolj odporni na mehanske poškodbe (Radi et al., 2018). Največji vpliv na inhibicijo AChE so imeli delci z oznako G6-3, ki so bili premazani z Al_2O_3 in stearinsko kislino. Stearinska kislina se uporablja za premaze delcev, pri katerih se želi doseči hidrofobno površino (Nakajima et al., 2000). Delci so bili zelo hidrofobni in so plavali na površini. Inhibicija aktivnosti AChE s temi delci je bila večja kot pri eserinu, ki je bil uporabljen kot pozitivna kontrola. Vpliv na

inhibicijo aktivnosti je bil za delce z oznako G10–4 med analiziranimi delci drugi največji, takoj za delci z oznako G6–3. Delci G10–4 so bili tretirani z volframom, ki TiO₂ poveča fotokatalitičnost in s tem reaktivnost (Ding et al., 2019). Povečana reaktivnost delcev, ki je uporabna za učinkovito vezavo onesnažil, se lahko kaže tudi v večji reaktivnosti pri stiku z biološkimi molekulami, tudi AChE. Med prvimi tremi delci z največjim vplivom na zmanjšano aktivnost na AChE so bili tudi delci G8–2, katerim je bil dodan SiO₂, ki delcem TiO₂ poveča katalitične sposobnosti (Tang et al., 2013). Delci z oznako G7–5 z dodatkom Al₂O₃ in SiO₂ so zmanjšali inhibicijo encima za 3,1 %. Iz tega lahko sklepamo, da pri tej vrsti delcev dodane snovi niso imele opaznega vpliva na aktivnost encima. Vpliv dodanih snovi na aktivnost encima ni opazen tudi pri delcih z oznako G4–19 z dodanim Al₂O₃ in G9–5 z dodanim AlPO₄. Delci, ki so se najbolj adsorbirali na AChE, so delci z oznako G10–4. Poleg delcev z oznako G10–4 so se močno adsorbirali na AChE tudi delci z oznako G6–3.

Za kristalno strukturo delcev iz dobljenih rezultatov ne moremo sklepati, da ima vpliv na aktivnost AChE. Za delce z oznako G10–4 je bila pri najvišji koncentraciji PSI 55,5 %, PSA pa 43,7 %, medtem ko je bila za delce z oznako G1–1 pri najvišji koncentraciji PSI 11,5 %, PSA pa le 2,5 %. Obe vrsti delcev imata anatazno kristalno strukturo. Prav tako so različno močno vplivali na aktivnost AChE tudi delci z rutilno kristalno strukturo.

Kot so izpostavili Mesarič in sodelavci (2013), je do interakcije med ogljikovimi ND in encimom prišlo na mestih, ki so oddaljeni od aktivnih mest encima. Zaradi tega je bila v njihovi raziskavi stopnja adsorpcije večja od stopnje inhibicije. Rezultati naše raziskave so pokazali, da se delci TiO₂ adsorbirajo na AChE v manjši meri, kot inhibirajo aktivnost encima. Glede na te podatke lahko predvidevamo, da se delci TiO₂ vežejo na aktivna mesta encima in na ta način močneje inhibirajo njegovo aktivnost.

Prva zastavljena hipoteza je bila, da bodo testirani delci TiO₂ inhibirali AChE v odvisnosti od njihovih fizikalno-kemičnih lastnosti. Predvidevali smo, da bo ključnega pomena kristalna struktura delcev. Prvi del hipoteze lahko potrdimo, drugi del pa ovržemo. Iz rezultatov je razvidno, da ima vpliv na inhibicijo AChE predvsem velikost delcev, za kristalno strukturo vpliv ni opazen.

Drugo hipotezo, ki pravi, da večja adsorpcija ni nujno povezana z večjo inhibicijo encima, smo z raziskavo potrdili. Iz rezultatov sicer lahko razberemo, da delci, ki se bolj

adsorbirajo na AChE, tudi bolj inhibirajo aktivnost AChE, vendar rezultati za posamezno vrsto delcev nakazujejo, da so vrednosti PSI višje od vrednosti PSA. Inhibicija AChE torej samo delno izhaja iz adsorpcije delcev na AChE, zato ne moremo predpostavljati, da je inhibicija aktivnosti encima izključno posledica adsorpcije delcev TiO₂ na AChE.

Ker je v zadnjih desetletjih vsakodnevna uporaba in proizvodnja ND v porastu, je pomembno, da se izvajajo raziskave, s katerimi preverjamo interakcijo ND z biološkim sistemom. Rezultati inhibicije in adsorpcije AChE zajemajo kompleksne lastnosti ND in njihove interakcije z encimom. S pomočjo uporabljenega testa z biološko molekulo – encimom, ki je dovolj občutljiv, da zazna razlike v celokupni lastnosti suspenzije različnih delcev TiO₂, smo ovrednotili biološko reaktivnost delcev TiO₂.

Pri delu z ND in pri delu z biološkimi molekulami, med katere sodi tudi AChE, je pričakovan nekoliko večji standardni odklon, ki smo ga izračunali tudi pri naših rezultatih. Napako oziroma lažno povečan vpliv na aktivnost AChE bi lahko dobili pri delcih, ki se slabo mešajo v mediju in so zato neenakomerno razporejeni. Pri tovrstnih delcih lahko odpipetiramo previsoko ali prenizko koncentracijo delcev. To bi se lahko zgodilo pri delcih z oznako G6–3, ki so bili zelo hidrofobni. Tveganje za napačno koncentracijo delcev smo odpravili tako, da smo delce takoj po mešanju na mešalu in mešanju s pomočjo pipete, odpipetirali pod gladino medija, na kateri so se pred mešanjem zaradi hidrofobnosti nabirali. Tudi ostale uporabljene delce TiO₂ smo pred uporabo premešali.

Razporejanje delcev v mediju lahko izboljšamo z uporabo sonikatorja, ki ga v naši raziskavi nismo uporabili zaradi potencialnega povečanja reaktivnosti delcev. Sonikator tudi razbije aglomerate, ki jih delci lahko tvorijo še pred izvedbo poskusa. V nadaljnjih raziskavah bi bilo priporočljivo uporabiti sonikator ter narediti primerjavo med vplivom soniciranih in nesoniciranih delcev na AChE. Za dodatno poznavanje vpliva ND na biološke sisteme bi lahko Ellmanovo metodo uporabili za enake vrste ND, ki bi jih obsevali z UV-svetlobo, s čimer bi jim povečali reaktivnost (Xiong in Hu, 2013). Lahko bi naredili primerjavo med obsevanimi in neobsevanimi delci iste vrste. Delce, ki smo jih uporabili v raziskavi, bi lahko oplastili s proteini, na primer z BSA. Oplastranje s proteini naj bi zmanjšalo reaktivnost delcev, kar so v svojem delu predstavili Sopotnik in sodelavci (2015). Za delce, kateri so povečali aktivnost AChE, bi bilo potrebno narediti nadaljnje raziskave, s katerimi bi se podrobneje preveril tovrsten vpliv delcev ter kakšen je njihov potencialni vpliv na biološki sistem. Namesto encima AChE bi lahko uporabili encim butirilholinesterazo. Po strukturi je

podobna AChE, vendar se njuna funkcija in lokacija v človeškem telesu razlikujeta. Pomembna razlika je tudi, da za AChE obstaja naraven substrat – ACh, butirilholinesteraza pa ga nima (Darvesh et al., 2003). S preverjanjem vpliva na več bioloških molekul lahko razširimo poznavanje vpliva delcev TiO₂ na biološki sistem.

6 ZAKLJUČEK

Z uporabo Ellmanovega testa, prilagojenega za delo z mikrotitrskimi ploščami, smo preverili vpliv različnih vrst delcev TiO_2 na aktivnost encima AChE. Z uporabljenimi metodami smo na relativno hiter in cenovno ugoden način dobili podatke o reaktivnosti uporabljenih delcev TiO_2 , iz česar smo lahko sklepali na njihovo kompatibilnost oziroma nekompatibilnost z biološkimi sistemi. Ugotovili smo, da delci, manjši od 100 nm, intenzivneje vplivajo na aktivnost AChE kot večji delci. Za kristalno strukturo delcev se v raziskavi ni izkazalo, da ima vpliv na aktivnost AChE. V večini primerov je vpliv na AChE pri nižjih koncentracijah delcev manjši, z višanjem koncentracije delcev se je večal tudi vpliv. Na zmanjšano aktivnost AChE je vplivalo tudi oplasčenje delcev z različnimi snovmi.

Metoda, opisana v magistrskem delu, je uporabna za raziskovanje interakcij med encimi in ND. Dvanajst različnih delcev TiO_2 v suspenziji smo razvrstili glede na reaktivnost, s tem so bili cilji, ki smo si jih v magistrski nalogi zastavili, doseženi. S poznavanjem reaktivnosti delcev se lažje določi primerna uporaba delcev. Podatki pa prispevajo tudi k razvoju novih produktov, ki vsebujejo delce TiO_2 . Pomen rezultatov, ki so bili pridobljeni z našo raziskavo, je mogoče razširiti in poglobiti z nadaljnjim raziskovalnim delom.

7 LITERATURA IN DOKUMENTACIJSKI VIRI

Abdi J, Yahyanezhad M, Sakhaie S, Vossoughi M, Alemzadeh I (2019). Synthesis of porous TiO₂/ZrO₂ photocatalyst derived from zirconium metal organic framework for degradation of organic pollutants under visible light irradiation. *J Environ Chem Eng* 7(3). doi: [10.1016/j.jece.2019.103096](https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103096).

Afsharan H, Hasanzadeh M, Shadjou N et al. (2016). Interaction of some cardiovascular drugs with bovine serum albumin at physiological conditions using glassy carbon electrode. A new approach. *Mater Sci Eng* 65: 97-108. doi: [10.1016/j.msec.2016.03.112](https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.112).

Aggarwal P, Hall J B, McLeland C B, Dobrovolskaia M A, McNeil S E (2009). Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev* 61(6): 428-37. doi: [10.1016/j.addr.2009.03.009](https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.009).

Albanese A, Tang P S Chan W C W (2012). The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering* 14: 1-16. doi: [10.1146/annurev-bioeng-071811-150124](https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071811-150124).

Calzolari L, Franchini F, Gilliland D, Rossi F (2010). Protein–Nanoparticle Interaction: Identification of the Ubiquitin–Gold Nanoparticle Interaction Site. *Nano Lett*, 10(8): 3101-5. Doi: [10.1021/nl101746v](https://doi.org/10.1021/nl101746v).

Čolović M B, Krstić D Z, Lazarević-Pašti T D, Bondžić A M, Vasić V M (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol* 11(3): 315-35. doi: [10.2174/1570159X11311030006](https://doi.org/10.2174/1570159X11311030006).

Dankovic D A, Kuempel E D (2011). Occupational exposure to titanium dioxide. *Curr Intell Bull* 63: 1–107.

Daniels G (2007). Functions of red cell surface proteins. *Vox Sang* 93(4): 331–40. doi: [10.1111/j.1423-0410.2007.00970.x](https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.00970.x).

Darvesh S, Hopkins D A, Geula C (2003). Neurobiology of butyrylcholinesterase. *Nat Rev Neurosci* 4(2): 131-8. doi: [10.1038/nrn1035](https://doi.org/10.1038/nrn1035).

Diamantino T C, Almeida E, Soares A M V M Guilhermino L (2003). Characterization of Cholinesterases from *Daphnia magna* Straus and Their Inhibition by Zinc. *Bull Environ Contam Toxicol* 71(2): 219-25. doi: [10.1016/j.chemosphere.2014.07.087](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.087).

Ding R, Wang K, Hong K, Zhang Y, Cui Y (2019). Hierarchical core-shell tungsten oxide/TiO₂ nanowires as an effective photocatalysts. *Chem Phys Lett* 714: 156-9. doi: [10.1016/j.cplett.2018.11.005](https://doi.org/10.1016/j.cplett.2018.11.005).

Donaldson K, Stone V, Tran C L, Kreyling W, Borm P J (2004). Nanotoxicology. *Occup Environ Med* 61(9): 727-8. doi: [10.1136/oem.2004.013243](https://doi.org/10.1136/oem.2004.013243).

Dorier M, Beal D, Tisseyre C et al. (2019). The food additive E171 and titanium dioxide nanoparticles indirectly alter the homeostasis of human intestinal epithelial cells: In vitro. *Environ Sci Nano*. 6(5). Doi: [10.1039/C8EN01188E](https://doi.org/10.1039/C8EN01188E).

Drobne D (2018). Spotlighting CLH report for TiO₂: Nano-safety perspective. *Chem Eng J* 340: 192-5. doi: [10.1016/j.cej.2018.01.007](https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.01.007)

Elliott D W, Zhang W (2001). Field assessment of nanoparticles for groundwater treatment. *Environ Sci Technol* 35(24):4922–6. doi: [10.1021/es0108584](https://doi.org/10.1021/es0108584).

Ellman G L, Courtney K D, Andres V jr, Featherstone R M (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7(2): 88–95. doi: [10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

Fenoglio I, Fubini B, Ghibaudi E M, Turci F (2011). Multiple aspects of the interaction of biomacromolecules with inorganic surfaces. *Adv Drug Deliv Rev* 63: 1186-209. doi: [10.1016/j.addr.2011.08.001](https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.08.001).

Frasco M F, Fournier D, Carvalho F, Guilhermino L (2005). Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers* 10(5): 360–75. doi: [10.1080/13547500500264660](https://doi.org/10.1080/13547500500264660).

Fu R, Wang C, Zhuang J, Yang W (2014). Adsorption and desorption of DNA on bovine serum albumin modified gold nanoparticles. *Colloidd Surf A Physiochem Eng Asp* 444: 326-9. doi: [10.1016/j.colsurfa.2013.12.081](https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.081).

Furumoto K, Ogawara K, Nagayama S, Takakura et al. (2002). Important role of serum proteins associated on the surface of particles in their hepatic disposition. *J Controlled Release* 83(1): 89–96. doi: [10.1016/S0168-3659\(02\)00196-7](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00196-7).

Gaitonde, D, Sarkar A, Kaisary S et al. (2006). Acetylcholinesterase activities in marine snail (*Cronia contracta*) as a biomarker of neurotoxic contaminants along the Goa coast, west coast of India. *Ecotoxicology* 15(4): 353–8. doi: [10.1007/s10646-006-0075-3](https://doi.org/10.1007/s10646-006-0075-3).

Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N et al. (2005). Ultrafine particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in lungs and in Cultured Cells. *Environ Health Perspect* 113(11): 1555-60. doi: [10.1289/ehp.8006](https://doi.org/10.1289/ehp.8006).

Gestel V T, Sebold D, Kruidhof H, Bauwmeester H J M (2008). ZrO₂ and TiO₂ membranes for nanofiltration and pervaporation: Part 2. Development of ZrO₂ and TiO₂ topayers for pervaporation. *Journal of Membrane science* 318(1-2): 413-21. doi: [10.1016/j.memsci.2006.07.020](https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.07.020).

Glavan G, Kos M, Božič J, Drobne D, Sabotič J, Jemec Kokalj A (2018). Different response of acetylcholinesterases in salt- and detergent-soluble fractions of honey bee hemolymph, head and thorax after exposure to diazinon. *Comp biochem physiol, Part C* 205(2018): 8-14. doi: [10.1016/j.cbpc.2017.12.004](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.12.004).

Godnjavec J, Znoj B, Venturini P, Žnidaršič A (2010). The Application of Rutile Nanocrystalline Titanium Dioxide as UV Absorber. *Informacije Midem* 40(1): 6-9.

Grisaru D, Sternfeld M, Eldor A, Glick D, Soreq H (1999). Structural roles of acetylcholinesterase variants in biology and pathology. *Eur J Biochem* 264(3): 672–686. doi: [10.1046/j.1432-1327.1999.00693.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00693.x).

Guilhermino L, Lacerda M N, Nogueira A J A, Soares A M V M (2000). In vitro and in vivo inhibition of *Daphnia magna* acetylcholinesterase by surfactant agents: possible implications for contamination biomonitoring. *Sci Total Environ* 247(2–3): 137–41. doi: [10.1016/S0048-9697\(99\)00485-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00485-4).

Hristozov D R, Zabeo A, Foran C et al. (2014). A weight of evidence approach for hazard screening of engineered nanomaterials. *Nanotoxicology* 8(1): 72–87. doi: [10.3109/17435390.2012.750695](https://doi.org/10.3109/17435390.2012.750695).

IARC (2010). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc. Lyon, France.

Jemec A, Drobne D, Tišler T, Trebše P, Roš M, Sepčič K (2007). The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. *Comp biochem physiol, Part C* 144(2007): 303-9. doi: [10.1016/j.cbpc.2006.10.002](https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.10.002).

Jemec A, Mesarič T, Sopotnik M, Sepčič K, Drobne D (2016). *Nanomaterial Characterization: An Introduction*. 1. izdaja. Wiley, 253-68.

Käkinen A, Ding F, Chen P, Mortimer M, Kahru A, Ke P C (2013). Interaction of firefly luciferase and silver nanoparticles and its impact on enzyme activity. *Nanotechnology* 24(34): 345101. doi: [10.1088/0957-4484/24/34/345101](https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/34/345101).

Karlsson H L, Gustafsson L, Cronholm J, Moller L (2009). Size-dependent toxicity of metal oxide particles - A comparison between nano- and micrometer size. *Toxicology letters*, 188(2): 112-8. doi: [10.1016/j.toxlet.2009.03.014](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.03.014).

Kelsall R, Hamley I, Geoghegan M (2005). *Nanoscale Science and Technology. Principles of Biochemistry*. Chichester: John Wiley & Sons 1-5.

Lehninger A L, Nelson D L, Cox M M (1993). *Principles of Biochemistry*. 2. izdaja. New York: Worth Publishers, Inc. 198-225. doi: [10.1016/0307-4412\(93\)90079-F](https://doi.org/10.1016/0307-4412(93)90079-F).

Lieberman M, Marks A D (2005). *Basic Medical Biochemistry: A clinical approach*. 2. izdaja. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 117-21. doi: [10.1002/bmb.2006.494034052660](https://doi.org/10.1002/bmb.2006.494034052660).

Lionetto M G, Caricato R, Calisi A, Giordano M E, Schettino T (2013). Acetylcholinesterase as a Biomarker in Environmental and Occupational Medicine: New Insights and Future Perspectives. *Biomed Res* 2013. doi: [10.1155/2013/321213](https://doi.org/10.1155/2013/321213).

Linsebigler A L, Lu G, Yates J T (1995). Photocatalysis on TiO₂ Surfaces: Principles, Mechanisms, and Selected Results. *Chemical Reviews* 95 (3): 735-78. doi: [10.1021/cr00035a013](https://doi.org/10.1021/cr00035a013).

Liu J, Hurt R H (2010). Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nanosilver colloids. *Environ Sci Technol* 44(6): 2169-75. doi: [10.1021/es9035557](https://doi.org/10.1021/es9035557).

- Liu Z, Sun X, Nakayama-Ratchford N, Dai H (2010). Supermolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery. *ACS Nano* 1(1): 50-6. doi: [10.1021/nn700040t](https://doi.org/10.1021/nn700040t).
- Mach M, Grubbs R D, Price W. A, Paton S J, Lucot J B (2004). Behavioral changes after acetylcholinesterase inhibitor with physostigmine in mice. *Pharmac Biochem Be* 79(3): 533-40. doi: [10.1016/j.pbb.2004.09.009](https://doi.org/10.1016/j.pbb.2004.09.009).
- Mesarič T, Baweja L, Drašler B et al. (2013). Effects of surface curvature and surface characteristics of carbon-based nanomaterials on the adsorption and activity of acetylcholinesterase. *Carbon* 62: 222-32. doi: [10.1038/srep10886](https://doi.org/10.1038/srep10886).
- Monopoli M P, Åberg C, Salvati A, Dawson K A (2011). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol* 7(12): 779–86. doi: [10.1038/nnano.2012.207](https://doi.org/10.1038/nnano.2012.207).
- Mu Q, Liu W, Xing Y et al. (2008). Protein Binding by Functionalized Multiwalled Carbon Nanotubes Is Governed by the Surface Chemistry of Both Parties and the Nanotube Diameter. *J Phys Chem* 112(9): 3300-7. doi: [10.1021/jp710541j](https://doi.org/10.1021/jp710541j).
- Nakajima A, Hashimoto K, Watanabe T (2000). Transparent Superhydrophobic Thin Films with Self Cleaning Properties. *Langmuir* 16(17): 1044-7. doi: [10.1021/la404005b](https://doi.org/10.1021/la404005b).
- Nam S H, Boo J H (2013). Growth and surface treatment of TiO₂ nanorods using stearic acid solution. *Thin Solid Films* 546:35-7. doi: [10.1016/j.tsf.2013.05.124](https://doi.org/10.1016/j.tsf.2013.05.124).
- Navodnik J, Kopčič M (2007). Slovenija je ustvarjena za nanotehnologije. 1. izdaja. Celje: Navodnik d.o.o. 22-3.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N (2006). Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science* 311(5761): 622–7. doi: [10.1126/science.1114397](https://doi.org/10.1126/science.1114397).
- Nel A E, Madler L, Velegol D et al. (2009). Understanding biophysiochemical interactions at the nano-bio interface. *Nat Mater* 8: 543-57. doi: [10.1038/nmat2442](https://doi.org/10.1038/nmat2442).
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005). Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ Health Perspect* 113(7): 823-39. doi: [10.1289/ehp.7339](https://doi.org/10.1289/ehp.7339).

Ogawara K, Furumoto K, Nagayama S et al. (2004). Pre-coating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: implications for rational design of nanoparticles. *J Controlled Release* 100(3): 451–5. doi: [10.1016/j.jconrel.2004.07.028](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.028).

Park S, Hamad-Schifferli K (2010). Nanoscale interfaces to biology. *Curr Opin Chem Biol* 14(5): 616–22. doi: [10.1016/j.cbpa.2010.06.186](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.06.186).

Pohanka M (2011). Cholinesterases, a target of pharmacology and toxicology. *Biomedical Papers* 155(3): 219-23. doi: [10.5507/bp.2011.036](https://doi.org/10.5507/bp.2011.036).

Radi P A, Testoni G E, Pessoa R S, Maciel H S, Rocha L A, Vieira L (2018). Tribocorrosion behavior of TiO₂/Al₂O₃ nanolaminate, Al₂O₃, and TiO₂ thin films produced by atomic layer deposition. *Surf coat technol* 349: 1077-82. doi: [10.1016/j.surfcoat.2018.06.036](https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2018.06.036).

Rahman M, Laurent S, Tawil N, Yahia L, Mahmoudi M (2013). *The Bio-Nano Interface. Protein-Nanoparticle Interactions*. Springer Berlin Heidelberg: 29-33.

Remškar M (2009). *Nanodelci in nevarnost*. Ljubljana: Ministrstvo za zdravje.

Ravindran A, Singh A, Raichur A M, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2010). Studies on interaction of colloidal Ag nanoparticles with Bovine Serum Albumin (BSA). *Colloids Surf B Biointerfaces* 76(1): 33-7. doi: [10.1016/j.colsurfb.2009.10.005](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.10.005).

Reddy P M, Philip G H (1994). In vivo inhibition of AChE and ATPase activities in the tissues of freshwater fish, *Cyprinus carpio* exposed to technical grade cypermethrin. *Bull Environ Contam Toxicol* 52(4): 619–26. doi: [10.1007/BF00194152](https://doi.org/10.1007/BF00194152).

Roberts A P, Mount A S, Seda B et al (2007). In vivo biomodification of lipid-coated carbon nanotubes by *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 41(8): 3025–9. doi: [10.1021/es062572a](https://doi.org/10.1021/es062572a).

Romani R, Antognelli C, Baldracchini F et al. (2003). Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chem Biol Interact* 145(3): 321–9. doi: [10.1016/S0009-2797\(03\)00058-9](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(03)00058-9).

Schilling K, Bradford B, Castelli D et al. (2010). Human safety review of “nano” titanium dioxide and zinc oxide. *Photochem Photobiol Sci* 9(4): 495-509. doi: [10.1039/b9pp00180h](https://doi.org/10.1039/b9pp00180h).

Scown T M, van Aerle R, Tyler C R (2010). Review: Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? *Crit Rev Toxicol* 40(7): 653-70. doi: [10.3109/10408444.2010.494174](https://doi.org/10.3109/10408444.2010.494174).

Shafferman A, Ordentlich A, Barak D et al. (1994). Electrostatic attraction by surface charge does not contribute to the catalytic efficiency of acetylcholinesterase. *EMBO Journal* 13(15): 3448-9.

Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S (2011). Titanium dioxide in everyday life; is it safe? *Radiology And Oncology* 45(4): 227-47. doi: [10.2478/v10019-011-0037-0](https://doi.org/10.2478/v10019-011-0037-0).

Silman I, Sussman J L (2008). Acetylcholinesterase: How is structure related to function?," *Chem Biol Interact* 175(1-3): 3-10. doi: [10.1016/j.cbi.2008.05.035](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.05.035).

Simon S, Massoulie J (1997). Cloning and Expression of Acetylcholinesterase from Electrophorus. *J Biol Chem* 272: 33045-55. doi: [10.1074/jbc.272.52.33045](https://doi.org/10.1074/jbc.272.52.33045).

SIST-TS CEN ISO/TS 80004-1 (2016). Nanotehnologije -Slovar – 1. del: Temeljnj izrazi.

Sopotnik M, Leonardi A, Križaj I et al. (2015). Comparative study of serum protein binding to three different carbon-based nanomaterials. *Carbon* 95: 560-72. doi: [10.1016/j.carbon.2015.08.018](https://doi.org/10.1016/j.carbon.2015.08.018).

Sussman J L, Harel M, Frolow F et al. (1991). Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253(5022): 872-9. doi: [10.1126/science.1678899](https://doi.org/10.1126/science.1678899).

Szymanska R, Kołodziej K, Ślasek I et al. (2016). Titanium dioxide nanoparticles (100 - 1000 mg/l) can affect vitamin E response in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Pollut* 213: 957-65. doi: [10.1016/j.envpol.2016.03.026](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.026).

Šinko G, Vrčec I V, Goessler W, Leitinger G, Dijanošić A, Miljanić S (2013). Alteration of cholinesterase activity as possible mechanism of silver nanoparticle toxicity. *Environ Sci Pollut Res* 21(2): 1391-400. doi: [10.1007/s11356-013-2016-z](https://doi.org/10.1007/s11356-013-2016-z).

Tang X, Wu Y, Yao Y, Zhang Z (2013). Preparation and Characterization of Innate Super-Hydrophilic TiO₂/SiO₂ Thin Films. *Mater Sci Forum* 743-744: 372-6. doi: [10.4028/www.scientific.net/MSF.743-744.372](https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.743-744.372).

- Thode K, Luck M, Semmler W, Muller R H, Kresse M (1997). Determination of Plasma Protein Adsorption on Magnetic Iron Oxides: Sample Preparation. *Pharm Res* 14(7): 905-10. doi: [10.1023/A:1012104017761](https://doi.org/10.1023/A:1012104017761).
- Wang Z, Zhao J, Li F, Gao D, Xing B (2009). Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. *Chemosphere* 77(1): 67–73. doi: [10.1016/j.chemosphere.2009.05.015](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.015).
- Wang S Q, Tooley I R (2011). Photoprotection in the era of nanotechnology. *Semin Cutan Med Surg* 30(4): 210–3. doi: [10.1016/j.sder.2011.07.006](https://doi.org/10.1016/j.sder.2011.07.006).
- Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N (2012). Titanium dioxide nanoparticles in food and personal care products. *Environ Sci Technol* 46(4):2242–50. doi: [10.1021/es204168d](https://doi.org/10.1021/es204168d).
- Weisenberg L, Huang Y W, Zhou X D, Ma Y (2006). In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 217: 252-9. doi: [10.1016/j.taap.2006.10.004](https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.10.004).
- Westerhoff P, Song G, Hristovski K, Kiser M A (2011). Occurrence and removal of titanium at full scale wastewater treatment plants: implications for TiO₂ nanomaterials. *J Environ Monit* 13: 1195–203. doi: [10.1039/c1em10017c](https://doi.org/10.1039/c1em10017c).
- Xia X R, Monteiro-Riviere N A, Mathur S et al. (2011). Mapping the Surface Adsorption Forces of Nanomaterials in Biological Systems. *ACS Nano* 5(11): 9074–81. doi: [10.1021/nn203303c](https://doi.org/10.1021/nn203303c).
- Xiong P, Hu J (2013). Inactivation/reactivation of antibiotic-resistant bacteria by a novel UVA/LED/TiO₂ system. *Water res* 47(2013): 4547-55. doi: [10.1016/j.watres.2013.04.056](https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.04.056).
- Yang H, Mao J (2017). Properties of AlPO₄/CePO₄ hybrid coating on rutile TiO₂. *Surf Eng* 33(3): 226-30. doi: [10.1080/02670844.2016.1215841](https://doi.org/10.1080/02670844.2016.1215841).
- Zhan Z-J, Bian H-L, Wang J-W, Shan W-G (2010). Synthesis of physostigmine analogues and evaluation of their anticholinesterase activities. *Bioorganic Med Chem Lett* 20(5):1532-4. doi: [10.1016/j.bmcl.2010.01.097](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.01.097).

Zuo G, Zhou X, Huang Q, Fang H, Zhou R (2011). Adsorption of Villin Headpiece onto Graphene, Carbon Nanotube, and C60: Effect of Contacting Surface Curvatures on Binding Affinity. *J Phys Chem* 115(47): 23323-8. doi: [10.1021/jp208967t](https://doi.org/10.1021/jp208967t).