

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Kaja TOMINC

**VPLIV MOLEKULSKE KORONE
NANOMATERIALOV NA VIABILNOST IN
PROLIFERACIJO CELIC *IN VITRO***

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Kaja TOMINC

**VPLIV MOLEKULSKE KORONE NANOMATERIALOV NA
VIABILNOST IN PROLIFERACIJO CELIC *IN VITRO***

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**THE ROLE OF THE MOLECULAR CORONA ON
NANOMATERIALS IN VIABILITY AND PROLIFERATION OF
CELLS *IN VITRO***

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2020

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje Molekulska in funkcionalna biologija. Delo je bilo opravljeno na Katedri za Zoologijo.

Študijska komisija je za mentorja magistrskega dela imenovala prof. dr. Damjano Drobne in za recenzentko doc. dr. Anita Jemec Kokalj.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Nada ŽNIDARŠIČ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Mentorica: prof. dr. Damjana DROBNE

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Recenzentka: doc. dr. Anita JEMEC KOKALJ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 24. 6. 2020

Kaja Tominc

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du2
DK	UDK 620.3:576(043.2)
KG	nanodelci, biomolekularna korona, proteinska korona, citotoksičnost, SH-SY5Y, TiO ₂ , CuO, ZnO, Ag, SiO ₂ , resazurin, nevtralnno rdeče, coomassie brilliant blue
AV	TOMINC, Kaja, dipl. biol. (UN)
SA	DROBNE, Damjana (mentor), JEMEC KOKALJ, Anita (recenzent)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Magistrski študijski program 2. stopnje Molekulska in funkcionalna biologija
LI	2020
IN	VPLIV MOLEKULSKE KORONE NANOMATERIALOV NA VIABILNOST IN PROLIFERACIJO CELIC <i>IN VITRO</i>
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	IX, 47 str., 3 pregl., 9 sl., 56 vir.
IJ	sl
Jl	sl/en
AI	Namen magistrske naloge je preveriti, kakšen vpliv ima biomolekularna korona izbranih nanomaterialov na vzajemno delovanje med nanomateriali in celicami. Testirali smo vpliv nanodelcev (ND) s predhodno ustvarjeno korono iz govejega serumskega albumina - BSA (predhodno oblečeni ND) ter tistih brez predhodno ustvarjene korone (predhodno neoblečeni ND) na človeških nevroblastomskih celicah SH-SY5Y. Testiranje smo izvajali s sedmimi različnimi nanodelci – tremi nanodelci TiO ₂ z različnimi lastnostmi ter nanodelci SiO ₂ , Ag, CuO in ZnO. Za preverjanje vpliva korone smo opravili tri teste citotoksičnosti – test z barvilom resazurin, test privzema barvila nevtralnno rdeče in test z barvilom Coomassie Brilliant Blue. Preverili smo tudi, koliko proteinov se je vezalo v korono posameznih delcev s testom BCA za določanje količine prisotnih proteinov. Predhodno oblečeni ZnO in CuO nanodelci so bili bolj citotoksični, kot tisti brez predhodno ustvarjene korone, ali pa je bila citotoksičnost obeh tretmajev podobna – pri nanodelcih Ag, ali pa citotoksičnega učinka nismo opazili - TiO ₂ ter SiO ₂ . Vpliv prehodno ustvarjene korone na nanodelcih je bil bolj izrazit pri nanodelcih CuO in ZnO, od katerih se odtapljajo ioni. Predvidevamo, da so razlike v učinku predhodno oblečenih in neoblečenih ND ZnO in CuO, posledica olajšane endocitoze predhodno oblečenih ND, vendar tega nismo preverjali.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du2
- DC UDC 620.3:576(043.2)
- CX nanoparticles, biomolecular corona, protein corona, cytotoxicity, SH-SY5Y, TiO₂, CuO, ZnO, Ag, SiO₂, resazurin, neutral red, coomassie brilliant blue
- AU TOMINC, Kaja, dipl. biol. (UN)
- AA DROBNE, Damjana (supervisor), JEMEC KOKALJ, Anita (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Molecular and Functional Biology
- PY 2020
- TI THE EFFECT OF THE MOLECULAR CORONA IN VIABILITY AND PROLIFERATION OF CELLS IN VITRO
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
- NO IX, 47 p., 3 tab., 9 fig., 56 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB The purpose of this master's thesis was to test the effect that the biomolecular corona of chosen nanomaterials has on the interaction between them and the cells. We tested two groups of nanoparticles. For the first group, we incubated pristine nanoparticles in bovine serum albumin - BSA before testing, so a corona formed. For the second group we used nanoparticles of the same material without a preformed corona. We tested the effect of each group of nanoparticles on human neuroblastoma cells SH-SY5Y and tested seven different types of nanoparticles – SiO₂, Ag, CuO, ZnO, and three different TiO₂ nanoparticle samples. To assess the effect of the preformed protein corona versus no preformed corona on SH-SY5Y cells we used several cytotoxicity tests – resazurin test, neutral red uptake test (NR) and coomassie brilliant blue test (CBB). We also evaluated the amount of proteins bound to nanoparticles with a preformed corona using a BCA Protein Assay Test. We found that the ZnO and CuO nanoparticles with a preformed corona had a greater cytotoxic effect on cells, than those without a preformed corona. The cytotoxic effect of nanoparticles with and without the corona was similar in the case of Ag nanoparticles, and for the TiO₂ and SiO₂ we did not notice significant cytotoxic effects. The effect of a preformed corona was more noticeable in CuO and ZnO nanoparticles, which dissolve into ions. We presume that the differences in the effect of nanoparticles with and without a preformed corona are due to increased endocytosis of nanoparticles with a preformed corona, but this was not tested.

KAZALO VSEBINE

	KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
	KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
	KAZALO VSEBINE	V
	KAZALO PREGLEDNIC	VII
	KAZALO SLIK	VIII
	OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1	UVOD	1
1.1	HIPOTEZE	1
1.2	NAMEN	1
2	PREGLED OBJAV	2
2.1	BIOMOLEKULARNA KORONA NA NANODELCIH	2
2.1.1	Nastanek in zgradba biomolekularne korone	2
2.1.2	Sestava biomolekularne korone	3
2.1.3	Dejavniki, ki vplivajo na nastanek biomolekularne korone	3
2.1.4	Vpliv biomolekularne korone na lastnosti nanodelcev	4
2.1.5	Biomolekularna korona in privzem nanodelcev v celice	5
2.1.6	Biomolekularna korona in citotoksičnost	6
2.2	CELIČNA LINIJA SH-SH5Y	8
2.3	TESTIRANI NANODELCI IN NJIHOVE LASTNOSTI	9
2.3.1	Nano-titanov dioksid	9
2.3.2	Nano-silicijev dioksid	9
2.3.3	Nano-srebro	9
2.3.4	Nano-bakrov oksid	10
2.3.5	Nano-cinkov oksid	10
2.4	METODE ZA TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI	10
2.4.1	Test z barvilom resazurin	11
2.4.2	Test privzema barvila nevtralnno rdeče	12
2.4.3	Test z barvilom Coomassie Brilliant Blue	12
2.5	METODE ZA TESTIRANJE KOLIČINE PROTEINOV V VZORCU	12
2.5.1	Test BCA Protein Assay	12
3	MATERIAL IN METODE	13
3.1	SEZNAM KEMIKALIJ TER OSTALIH SNOVI	13
3.2	SEZNAM MATERIALA TER LABORATORIJSKE OPREME	13
3.9	LASTNOSTI UPORABLJENIH NANODELCEV	14
3.3	GOJENJE IN PRESAJANJE CELIČNE KULTURE SH-SY5Y IN VITRO	15
3.4	NASAJANJE CELIC NA MIKROTITRSKE PLOŠČE	15
3.5	PRIPRAVA SUSPENZIJ NANODELCEV	15

3.5.1	Priprava nanodelcev brez biomolekularne korone, t.i. neoblečeni ND	16
3.5.2	Priprava nanodelcev z biomolekularno korono, t.i. oblečeni ND	16
3.5.3	Merjenje vsebnosti proteinov BSA v supernatantu s testom BCA Protein Assay	16
3.6	DODAJANJE PRIPRAVLJENIH NANODELCEV NA 96-KANALNO MIKROTITRSKO PLOŠČO S CELICAMI SH-SY5Y	17
3.7	TESTI VIABILNOSTI, STABILNOSTI LIZOSOMOV TER METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC	18
3.7.1	Priprava barvil resaurin in nevtralnno rdeče ter testiranje - resaurin, NR in CBB	18
3.8	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV	19
3.8.1	BCA Assay	19
3.8.2	Test z barvili resaurin, nevtralnno rdeče in Coomassie Brilliant Blue	19
4	REZULTATI	21
4.1	REZULTATI TESTA BCA ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI PROTEINOV	21
4.2	NANODELCI TITANOVEGA DIOKSIDA TiO ₂ _A	22
4.3	NANODELCI TITANOVEGA DIOKSIDA TiO ₂ _B	23
4.4	NANODELCI TITANOVEGA DIOKSIDA TiO ₂ _C	24
4.5	NANODELCI SILICIJEVEGA DIOKSIDA SiO ₂	25
4.6	SREBROVI NANODELCI Ag	26
4.7	NANODELCI BAKROVEGA OKSIDA CuO	28
4.8	NANODELCI CINKOVEGA OKSIDA ZnO	30
5	RAZPRAVA	32
5.1	VPLIV NANODELCEV TITANOVEGA DIOKSIDA - TiO ₂ _A, B NA CELICE SH-SY5Y	32
5.2	VPLIV NANODELCEV SILICIJEVEGA DIOKSIDA - SiO ₂ NA CELICE SH-SY5Y	33
5.3	VPLIV SREBROVIH NANODELCEV – Ag NA CELICE SH-SY5Y	34
5.4	VPLIV NANODELCEV BAKROVEGA OKSIDA – CuO NA CELICE SH-SY5Y	35
5.5	VPLIV NANODELCEV CINKOVEGA OKSIDA – ZnO NA CELICE SH-SY5Y	36
6	SKLEPI	39
7	POVZETEK	40
8	VIRI	42

KAZALO SLIK

Slika 1: Celice SH-SY5Y v celični kulturi.....	8
Slika 2: Prikaz tipične postavitve na mikrotitrski plošči	17
Slika 3: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND TiO ₂ _A.....	22
Slika 4: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND TiO ₂ _B.....	23
Slika 5: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi TiO ₂ _C.....	24
Slika 6: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND SiO ₂	25
Slika 7: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND Ag	27
Slika 8: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND CuO.....	29
Slika 9: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND ZnO	31

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Povzetek vpliva biomolekularne korone na citotoksičnost	8
Preglednica 2: Karakteristike uporabljenih nanodelcev	14
Preglednica 3: Koncentracija vezanih proteinov na nanodelcih.....	21

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DMEM *Dulbecco's modified Eagle's medium*; Eaglovo gojišče po Dulbeccu

FBS *fetal bovine serum*; serum govejega zarodka

PBS *Dulbecco's phosphate-buffered saline*; fosfatni pufer

BSA *Bovine serum albumine*; goveji serumski albumin

CBB *Coomassie Brilliant Blue*;

ND nanodelci

ROS *reactive oxygen species*; reaktivne kisikove spojine

NR *neutral red*; barvilo nevtralnno rdeče

TiO₂ nanodelci titanovega dioksida

SiO₂ nanodelci silicijevega dioksida

CuO nanodelci bakrovega oksida

ZnO nanodelci cinkovega oksida

Ag srebrovi nanodelci

1 UVOD

Nanodelci imajo edinstvene lastnosti, ki se razlikujejo od lastnosti večjih delcev iz enakih kemijskih sestav. Ena od pomembnih lastnosti nanodelcev je visoko razmerje površine v primerjavi z volumnom, kar nanodelce naredi bolj reaktivne (Forest, 2019). Ob vstopu nanodelcev v biološko okolje se na površino nanodelcev adsorbirajo biomolekule, ki tvorijo tako imenovano proteinsko korono, kasneje pa se je uveljavil izraz biomolekularna korona (Nienhaus in Nienhaus, 2019). Biomolekularna korona zakrije osnovno fizikalno-kemijsko identiteto nanodelcev ter jim poda biološko identiteto (Forest, 2019). Vzajemno delovanje med nanomateriali in celicami tako ne poteka preko gole površine nanodelcev, pač pa preko omenjene biomolekularne korone. Večinoma to vzajemno delovanje poteka preko receptorskih proteinov prisotnih v plazmalem celic ter proteini, prisotnimi v biomolekularni koroni (Nienhaus in sod., 2020). Biomolekularna korona igra tudi pomembno vlogo pri privzemu nanodelcev v celice ter vpliva na citotoksičnost nanodelcev (Corbo in sod., 2016; Zeng in sod., 2019). Vezava biomolekul na nanodelce vpliva tudi na vezane molekule – vezava lahko spremeni konformacijo proteinov ter vpliva na njihovo biološko aktivnost (Zeng in sod., 2019).

Nanodelce s točno določenimi lastnostmi se med drugimi uporabljajo tudi v medicini, tako v diagnostiki, kot tudi pri terapiji na primer pri tarčni dostavi zdravilnih učinkovin (Nienhaus in Nienhaus, 2019). Vsak poskus priprave nanodelcev za biomedicinsko uporabo pa mora upoštevati, da bodo nanodelci obdani z biomolekularno korono, ki vpliva na lastnosti uporabljenih nanodelcev. Proces, povezani z nastankom biomolekularne korone pa so zapleteni ter še vedno niso dobro poznani (Nienhaus in sod., 2020). Predvsem ni poznano, kako točno ustvarjena biomolekularna korona na nanodelcih vpliva na njihovo citotoksičnost.

1.1 HIPOTEZE

- Ker je vpliv delcev na celice odvisen od molekulske korone, predpostavljamo, da bodo predhodno oblečeni delci s proteini in tisti, ki niso bili predhodno oblečeni, drugače vplivali na celice.
- Razlike v učinku med predhodno oblečenimi in neoblečenimi nanodelci bodo manj izrazite v primeru, ko se iz delcev ne odtapljajo ioni, v primerjavi z delci od katerih se ioni odtapljajo.

1.2 NAMEN

Namen magistrske naloge je preveriti, ali se vpliv nanodelcev na celico razlikuje, če so ti predhodno oblečeni s proteini ali pa so v gojišče dodani neoblečeni nanodelci. V okviru magistrskega dela bomo preverili vpliv predhodno oblečenih in neoblečenih nanodelcev na metabolno aktivnost in proliferacijo človeških nevroblastičnih celic SH-SY5Y. Preverili bomo tudi vpliv izbranih predhodno oblečenih in neoblečenih nanomaterialov na stabilnost lizosomov v izpostavljenih celicah.

2 PREGLED OBJAV

2.1 BIOMOLEKULARNA KORONA NA NANODELCIH

Nanodelci imajo veliko površino v primerjavi z volumnom, kar poveča možnosti vzajemnega delovanja nanodelcev in biomolekul v njihovi okolici (Forest, 2019). Ob vnosu nanodelcev v biološki medij se na gole površine delcev vežejo biološke molekule. Na nanodelcih se tako tvori biomolekularni sloj, ki so ga Cedervall in sodelavci leta 2007 poimenovali proteinska korona. Zraven proteinov se na površino nanodelcev adsorbirajo tudi nukleinske kisline, lipidi, sladkorji in majhne molekule, zato se je kasneje pričel uporabljati izraz biomolekularna korona (Nienhaus in Nienhaus, 2019).

2.1.1 Nastanek in zgradba biomolekularne korone

Korona prične nastajati takoj po vstopu nanodelcev v medij. Tenzer in sodelavci (2013) so v svoji raziskavi navedli, da se kompleksna korona tvori že po 30 sekundah inkubacije. Biomolekule, ki tvorijo korono, se na površino nanodelcev vežejo z različno jakostjo oziroma imajo različno afiniteto za vezavo. Biomolekularno korono lahko zaradi tega ločimo na dva dela - trdo in mehko korono. Pri tipični biomolekularni koroni trdo korono sestavljajo molekule na notranji plasti korone, medtem ko molekule mehke korone sestavljajo zunanjo plast (Nienhaus in Nienhaus, 2019). Trda korona se ustvari po nekaj sekundah po vstopu nanodelcev v medij, v katerem so prisotne biomolekule. Biomolekule trde korone so manj pogosto zamenjane z drugimi biomolekulami iz okolja, medtem ko je pri molekulah vezanih v mehko korono izmenjava pogostejša. Trda plast korone je zaradi tega po sestavi bolj stabilna kot mehka korona (Liu in sod., 2020). Zaradi večje moči vezave se trda korona ohrani, tudi če nanodelec ločimo od medija, v katerem je ta nastala (Nienhaus in Nienhaus, 2019).

Mehka korona se lahko tvori neposredno na površini nanodelcev ali pa se tvori tako, da se biomolekule vežejo na molekule trde korone. Mehko korono sestavljajo šibkeje vezane biomolekule, ki imajo hkrati tudi večji stik z okolico (Nienhaus in Nienhaus, 2019). Sestava mehke korone ravnovesje doseže med nekaj minutami in nekaj urami po vstopu nanodelcev v medij (Liu in sod., 2020). Čas izmenjave teh biomolekul je krajši, mehka korona pa se popolnoma odluči v primeru, da delec ločimo od medija. Mehka korona velja za manj stabilno v primerjavi s trdo, zaradi česar je korone te vrste težje karakterizirati in proučevati (Forest, 2019; Nienhaus in Nienhaus, 2019).

Adsorpcija in desorpcija biomolekul na površino nanodelca je dinamični proces, proteini pa medsebojno tekmujejo za vezavna mesta. Starejši modeli kažejo na to, da se sestava proteinske korone s časom spreminja. V prvih fazah po vstopu v medij naj bi se korona tvorila iz biomolekul, ki so v tem mediju pogostejše, čez čas pa jih izpodrinejo druge, ki imajo večjo jakost vezave na ta nanodelec (Shah in Singh, 2019). Ta model vezave sta v 60 letih prejšnjega stoletja opisala Vroman in Adams, ki sta karakterizirala vzajemno delovanje proteinov v krvi s trdimi površinami (Forest, 2019). Tenzer in sodelavci (2013)

pa so v svoji raziskavi navedli, da se po vzpostavitvi korone spreminja število vezanih proteinov, ne pa tudi sestava korone.

Biomolekularna korona pa je dinamična tudi, ker se spreminja tudi glede na to, kje se nanodelec trenutno nahaja ter kam potuje. Fiziološka okolja imajo edinstveno proteinsko ter biomolekularno sestavo, s katero se srečajo nanodelci, ta okolja pa vplivajo na sestavo korone nanodelcev. Prav tako se ob privzemu nanodelcev v celice biomolekularna korona ne odstrani, pač pa se vsaj delno ohrani. Zaradi tega je bilo predlagano, da nanodelci s seboj nosijo neke vrste »spomin« na okolja, s katerimi so se srečali. Ta pojav so poimenovali z izrazom prstni odtis korone. Ta prstni odtis predstavlja vzorce pogostosti določenih proteinov v koroni glede na to, s katerimi okolji so se nanodelci srečali. Glede na te vzorce pa je lažje okarakterizirati korone posameznih nanodelcev (Forest, 2019).

2.1.2 Sestava biomolekularne korone

Korona, ki se ustvari na nanodelcih, je v veliki meri odvisna od vrste delcev (Rahman in sod., 2013). Biomolekularne korono na nanodelcih v krvni plazmi sestavljajo različni plazemski proteini, ki jih uvrščamo v skupine alipoproteinov, imunoglobulinov, koplementarnih faktorjev, koagulacijskih faktorjev in ostalih proteinov (Ahsan in sod., 2018). Rahman in sodelavci (2013), so ugotovili, da so bili pri inkubaciji nanodelcev različnih kemijskih sestav v krvni plazmi, v koroni vseh testiranih nanodelcev prisotni albumin, imunoglobulin G (Ig G), fibrinogen in alipoproteini. Prav tako relativna koncentracija proteinov, vezanih v korono, ni enaka njihovi koncentraciji v plazmi, kar nakazuje na to, da se določeni proteini v korono vežejo pogosteje kot drugi (Ahsan in sod., 2018).

2.1.3 Dejavniki, ki vplivajo na nastanek biomolekularne korone

Sestava biomolekularne korone je odvisna od številnih parametrov, kot so lastnosti nanomateriala, na primer velikost in oblika, vlogo pa igrajo tudi funkcijske skupine prisotne na površini nanomaterialov ter naboj na površini nanodelcev. Zraven tega je korona odvisna od sestave medija (Pozzi in sod., 2015), novejša raziskava pa opažajo še vpliv temperature okolja pri izpostavitvi, ter čas izpostavitve nanodelcev mediju (Liu in sod., 2020). Vsi ti dejavniki vplivajo na to, katere biomolekule se bodo vezale na nanodelec, pomembne pa so tudi interakcije med temi biomolekulami. Univerzalna biomolekularna korona zaradi vseh teh dejavnikov ne obstaja, pač pa je vsaka korona edinstvena (Nienhaus in Nienhaus, 2019).

Našteti dejavniki na sestavo proteinske korone vplivajo na različne načine. Oblika in velikost nanodelcev vplivata na število proteinov, ki se vežejo na nanodelce ter na sestavo biomolekularne korone (Zhdanov, 2019). Površinski naboj nanodelcev vpliva na število vezanih proteinov, saj proteini z nabojem načeloma vežejo več proteinov kot tisti z nevtralnim nabojem oziroma brez naboja (Forest, 2019). Nanodelci s pozitivnim nabojem adsorbirajo proteine z višjo izoelektrično točko, kot je albumin, medtem ko delci z negativnim nabojem adsorbirajo več proteinov z nižjo izoelektrično točko, kot je Ig G.

Velikost delcev vpliva na njihovo razmerje med površino in volumnom. Manjši kot so delci, večjo površino imajo v primerjavi z njihovo maso. Večja površina pomeni več mest, na katera se lahko vežejo proteini (Rahman in sod., 2013). Krivina površine nanodelcev prav tako vpliva na število adsorbiranih proteinov, pri čemer večja krivina površine nanodelcev pomeni manj vezanih proteinov oziroma biomolekul (Forest, 2019).

Kemijska sestava nanodelcev vpliva na vrsto proteinov, ki se bodo vezali hkrati pa tudi na moč vezave teh proteinov. Delci iz kovinskih oksidov, silicija ali polistirena so zelo reaktivni in proteine na svojo površino vežejo nepovratno. Nanodelci, ki imajo na svoji površini prisotne amine, hidroksilne in karboksilne funkcionalne skupine, pa proteine vežejo šibko in reverzibilno, torej tvorijo mehko korono (Nienhaus in Nienhaus, 2019). Funkcionalne skupine na površini nanodelcev spremenijo farmakokinetiko, razporeditev, akumulacijo in citotoksičnost nanodelcev (De Matteis in Rinaldi, 2018), vplivajo pa tudi na to, kakšna korona se tvori na površini nanodelcev (Forest, 2019).

Pomemben dejavnik je tudi tip medija in koncentracija proteinov v mediju. Pri inkubaciji nanodelcev v različnih medijih, na primer v krvnem serumu človeškega izvora ali pa v človeški krvni plazmi, se je tvorila korona različne sestave, ki je vodila v različne odzive celic na te nanodelce s koronami različni sestav (Forest, 2019). Koncentracija proteinov v mediju med drugimi vpliva na debelino plasti korone. Pri nizkih koncentracijah proteinov se teh na delec veže le nekaj, kar pomeni, da imajo njihove polipeptidne verige dovolj prostora, da se prosto razširijo po večji površini, kot jo zahteva njihova nativna struktura. Tvorijo pa tudi številne povezave, ki stabilizirajo interakcije med proteinom in nanodelcem. Pri visokih koncentracijah proteinov v mediju se tvori gosta plast proteinov na površini nanodelcev, ki ovira razvijanje sosednjih proteinov (Nienhaus in Nienhaus, 2019).

2.1.4 Vpliv biomolekularne korone na lastnosti nanodelcev

Biomolekularna korona nanodelcem določi novo biološko identiteto, ta pa se lahko močno razlikuje od fizikalno-kemijske identitete nanodelcev (Nienhaus in Nienhaus, 2019; Zeng in sod., 2019). Interakcije delca z biološkim okoljem po tvorbi korone ne potekajo več z izvorno površino nanodelca, pač pa preko nastale biomolekularne korone (Forest, 2019; Nienhaus in Nienhaus, 2019). Tvorba biomolekularne korone spremeni tudi fizikalno-kemijske lastnosti nanodelcev, kot so velikost, oblika in naboj (Zeng in sod., 2019). Naboj nanodelcev vpliva tudi na njihov privzem v celice, pri čemer je privzem pozitivno nabitih nanodelcev v celice večji, v primerjavi z negativno nabitimi in nevtralnimi nanodelci (De Matteis in Rinaldi, 2018).

Prisotnost biomolekularne korone v večini primerov prepreči aglomeracijo nanodelcev, saj prisotnost biomolekul v okolju zmanjša možnost stika med nanodelci samimi ali pa zaradi spremembe v naboju po tvorbi korone (Forest, 2019; Liu in sod., 2020). Nekatere študije poročajo tudi o povečani stopnji aglomeracije ob tvorbi korone, kar nakazuje na to, da na aglomeracijo vplivajo drugi pogoji kot so koncentracija proteinov v serumu, ter tip medija (Forest, 2019).

Vezava proteinov na nanodelce med procesom ustvarjanja korone lahko povzroči spremembo konformacije vezanih proteinov ali njihovo denaturacijo, (Liu in sod., 2020). Obseg konformacijskih sprememb je odvisen vzajemnega delovanja med nanodelci in proteini ter reaktivnost površine nanodelcev. Nanodelci z manj reaktivno površino imajo med vzajemnim delovanjem s proteini manjši vpliv na konformacijo teh proteinov, lahko pa pride do lokalnih sprememb v konformaciji, medtem ko lahko nanodelci z bolj reaktivno površino sprožijo obsežne spremembe v konformaciji ali denaturacijo proteinov (Nienhaus in Nienhaus, 2019). Konformacijske spremembe v vezanih proteinih lahko povzročijo spremembe v vezavnih domenah, epitomih in spremembe v funkciji proteina ali pa izgubo funkcije (Liu in sod., 2020; Zeng in sod., 2019). Konformacijske spremembe pa imajo lahko tudi posledice za privzem nanodelcev v celice (Liu in sod., 2020).

Pridobljena biološka identiteta nanomaterialov določa, kako celice »vidijo« nanodelce, kako se nanje odzovejo ter vpliva na vzajemno delovanje med nanomateriali in celicami (Monopoli in sod., 2011; Nienhaus in Nienhaus, 2019). Biološka identiteta nanodelcev vpliva na fiziološki odziv na nanodelce v bioloških sistemih. Pri interakciji nanodelcev s celicami biomolekularna korona med drugimi vpliva na transport nanodelcev, privzem nanodelcev v celice ter njihovo strupenost ter citotoksičnost. Biomolekularna korona na nanodelcih lahko v primeru organizmov vpliva tudi na kroženje nanodelcev po biološkem sistemu (Forest, 2019; Rahman in sod., 2013). V primeru citotoksičnosti lahko tvorba biomolekularne korone zmanjša ali pa okrepi citotoksične učinke nanodelcev (Corbo in sod., 2016; Liu in sod., 2020).

2.1.5 Biomolekularna korona in privzem nanodelcev v celice

Privzem nanodelcev v celice je v veliki meri odvisen od biološke identitete nanodelcev, torej ustvarjene biomolekularne korone (Nienhaus in Niehaus, 2019). V večini primerov tvorba biomolekularne korone zmanjša privzem nanodelcev v celice. Privzem nanodelcev v celice v gojišču brez seruma, je v večini primerov višji, kot privzem nanodelcev enake kemijske sestave v celice, kadar je v okolju prisoten serum (Forest, 2019; Lesniak in sod., 2013). Francia in sodelavci (2019) so opazili tudi povečan privzem nanodelcev SiO₂ v celice HeLa v pogojih z nižjo koncentracijo seruma, v primerjavi s pogoji z višjo koncentracijo seruma. Privzem v celice je lahko po tvorbi korone zmanjšan tudi, ker vezava biomolekul na nanodelce zmanjša količino proste energije na površini nanodelcev, kar pa zmanjša možnost vzajemnega delovanja med nanodelci s korono ter celicami (Forest, 2019).

V nekaterih študijah pa navajajo povišan privzem nanodelcev s korono v celice. To nasprotje v rezultatih lahko pojasnijo različni načini oziroma mehanizmi privzema nanodelcev v celice (Forest, 2019). Biomolekularna korona in njena sestava vplivata na mehanizem privzema nanodelcev v celice (Francia in sod., 2019). V okolju brez seruma prihaja do večje mere vzajemnega delovanja nanodelcev s celično membrano, saj imajo nanodelci v pogojih brez seruma več proste energije na površini. To vzajemno delovanje nanodelcev in celične membrane pa lahko vodi v privzem nanodelcev v celice. Proteini biomolekularne korone pa

lahko aktivirajo receptorje v membrani celic, ter s tem sprožijo specifični privzem nanodelcev v celice ali pa aktivacijo drugih signalnih poti – privzem nanodelcev v celice je lahko pri nanodelcih s korono iz biomolekul medija zato višji na ta račun (Forest, 2019; Lesniak in sod., 2013).

Nanodelci v celice vstopajo z endocitozo preko več različnih poti: s klaritinsko posredovano endocitozo oz. receptorsko endocitozo, kaveolarno endocitozo, klaritinsko in kalveolarno neodvisno endocitozo, fagocitozo in makropinocitozo. Način vnosa nanodelcev v celice je odvisna od lastnosti nanodelcev in celic (Adjei in sod., 2014). Po privzemu nanodelcev v celice se nanodelci nahajajo v intracelularnih veziklih kot so endosomi, fagosomi ali makropinosomi in nimajo direktnega stika s citoplazmo ali celičnimi organeli (Donahue in sod., 2019). Nanodelci, ki jih celica privzame, se nato prenesejo v razne celične komponente, največkrat pa se ti delci na koncu akumulirajo v lizosomih (Lesniak in sod., 2013). Med privzemom nanodelcev v celice se prej ustvarjena korona na nanodelcih ohrani, ob akumulaciji nanodelcev v lizosomih pa se biomolekularna korona razgradi (Zhdanov, 2019).

Celice lahko nanodelce izločijo v procesu eksocitoze. Eksocitirajo se lahko endosomalni vezikli, lahko pa poteče tudi lizosomalno posredovana eksocitoza, ki je hkrati tudi najpogostejši mehanizem za eksocitozo nanodelcev (Donahue in sod., 2019).

2.1.6 Biomolekularna korona in citotoksičnost

Fizikalno-kemijske lastnosti nanodelcev vplivajo na citotoksičen učinek, ki ga imajo nanodelci, ker pa biomolekularna korona lastnosti nanodelcev spremeni pa vpliva tudi na njihov citotoksični učinek (Falahati in sod., 2019; Corbo in sod., 2016). Vezava pogostih proteinov na nanodelce različnih kemijskih sestav ne izzove enakih bioloških odzivov, zato je treba pri predvidevanju teh bioloških odzivov upoštevati veliko dejavnikov (Liu in sod., 2020).

Citotoksičnost je strupenost neke snovi za celice. Snovi lahko citotoksično delujejo na različne načine - lahko zavirajo sintezo snovi, kot so nukleinske kisline in proteini v celicah, delujejo lahko na celične poti za proizvodnjo energije, na primer tako, da vplivajo na aktivnost mitohondrijev, ali pa delujejo tako, da spremenijo integriteto celične membrane ali membrane organelov znotraj celic. Ti mehanizmi lahko sprožijo apoptozo ali nekrozo celic. Citotoksični učinki snovi se tekom *in vitro* testiranja preverjajo s pomočjo merjenja proliferacije celic, delitev celic, delovanja celičnega metabolizma ali pa testiranja integritate celične membrane ali membrane organelov (Istifli in sod., 2019).

Biomolekularna korona lahko zmanjša citotoksičnost nanodelcev – na primer z zmanjšanjem možnosti, da nanodelci poškodujejo celično membrano ter z na primer zvišanjem biokompatibilnosti nanodelcev v organizmu - *in vivo* pogoji. Citotoksičnost nanodelcev pa se ob tvorbi korone lahko tudi zviša – na primer, ko vezava proteinov na nanodelce v njih

izzove konformacijske spremembe, saj lahko v teh primerih pride do močnejšega imunskega odziva na nanodelce (Liu in sod., 2020; Corbo in sod., 2016).

Biomolekularna korona lahko spremeni učinek nanodelcev preko korone, ki na različne načine pride v stik s celično membrano (Liu in sod., 2020). Zmanjšano število stikov nanodelcev z membrano celic pa lahko vodi do manjšega privzema nanodelcev v celice (Francia in sod., 2019; Lesniak in sod., 2013; Liu in sod., 2020). Tudi privzem nanodelcev v celice ima vpliv na citotoksičnost, biomolekularna korona pa lahko privzem nanodelcev zniža ali pa poveča (Forest, 2019; Liu in sod., 2020). Do povečanega privzema nanodelcev v celice po tvorbi korone lahko pride v primeru da proteini biomolekularne korone aktivirajo receptorje v membrani celic (Forest, 2019; Francia in sod., 2019), ter s tem sprožijo specifični privzem nanodelcev v celice ali pa aktivacijo drugih signalnih pot (Forest, 2019).

Ob vstopu v celice ostane biomolekularna korona vezana na nanodelce, ohrani pa se tudi med transportom po celici, v lizosomih pa pride do razgradnje korone (Liu in sod., 2020). Hidroliza biomolekularne korone pa poteka različno hitro glede na sestavo korone. Pri primerjavi biomolekularnih koron iz humanega serumskega albumina (HSA), γ -globulina in fibrinogena na nanodelcih zlata, je po endocitozi delcev v HeLa celice je hitreje prišlo do razgradnje korone iz HSA primerjavi s koronami sestavljenimi iz drugih dveh proteinov. To je vplivalo na nižjo viabilnost celic, ko so bili nanodelci obdani z HSA. Hitrejša razgradnje korone naj bi torej lahko pospešila porabo znotrajceličnih antioksidantov, kar vodi v višje koncentracije ROS, ampak to je le ena izmed možnih razlag (Liu in sod., 2020).

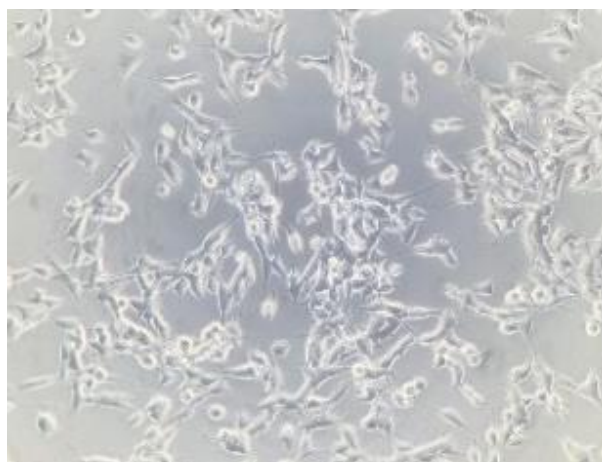
Biomolekularna korona na nanodelcih od katerih se odtaplajo ioni – npr. nanodelci Zn, Cu, Ag, lahko spremeni hitrost odtapljanja ionov iz nanodelcev (Riediker in sod., 2019; Shannahan, 2017). V določenih primerih lahko korona upočasni odtapljanje z blokado oksidativnih procesov, spet v drugih pogojih pa pospeši odtapljanje ionov, Riediker in sodelavci (2019) so navedli primer, ko so v okolju prisotni prosti proteini, ter imajo kovinski ioni nanodelcev visoko afiniteto za vezavo na te proteine. Tvorba biomolekularne korone lahko dodatno stabilizira ali pa destabilizira strukturo nanodelcev. Biomolekule, ki se na nanodelce vežejo z visoko jakostjo, lahko zmanjšajo odtapljanje ionov iz površine nanodelcev, šibka jakost vezave biomolekul na nanodelce pa lahko poveča stopnjo odtapljanja ionov, zaradi večje mere vzajemnega delovanja, do katerega prihaja na teh mestih. V primeru endocitoze nanodelcev in transporta v lizosome, lahko zaradi razgradnje biomolekularne korone nanodelcev, ki se odtapljajo, pride do povečanega sproščanja ionov iz nanodelcev – o tem v primeru delcev ZnO poročata Vandebriel in De Jong (2012), v primeru delcev CuO pa Zhang in sodelavci (2017).

Preglednica 1: Povzetek vpliva biomolekularne korone na citotoksičnost

Nanodelci v mediju s serumom – korona se ustvari iz serumskih proteinov	
<i>Zmanjšanje citotoksičnosti</i>	<i>Povečanje citotoksičnosti</i>
+ zmanjšana reaktivnost zaradi korone → zmanjšana adhezija na celično membrano → zmanjšan privzem v celice zaradi zmanjšane števila nespecifičnih interakcij s celično membrano	- proteini v biomolekularni koroni aktivirajo receptorje v celični membrani → aktivacija receptorjev sproži endocitozo ali druge signalne poti → poveča se receptorska endocitoza
+/- endocitirani nanodelci, ki se transportirajo v lizosome - v lizosomih se korona razgradi → goli delci so bolj reaktivni in poškodujejo lizosome; v primeru delcev, ki se odtapljajo, lahko kislo okolje povzroči povečano odtapljanje ionov – višja citotoksičnost	+/- endocitirani nanodelci, ki se transportirajo v lizosome - v lizosomih se korona razgradi → goli delci so bolj reaktivni in poškodujejo lizosome; v primeru delcev, ki se odtapljajo, lahko kislo okolje povzroči povečano odtapljanje ionov – višja citotoksičnost
+ zmanjša odtapljanje ionov	- poviša odtapljanje ionov

2.2 CELIČNA LINIJA SH-SH5Y

Celična linija SH-SY5Y je hčerinska linija celic SK-N-SH. Slednja linija je bila pridobljena leta 1970 z biopsijo kostnega mozga pacientke obolele za nevroblastomom, nato pa je bila trikrat modificirana, da so pridobili celice SH-SY5Y. Medtem ko originalna celična linija SK-N-SH vsebuje več vrst nevronov, je SH-SY5Y pretežno homogena, njene celice pa imajo številne kemijske in funkcionalne lastnosti nevronov. Celična linija se zaradi tega že od 80 let prejšnjega stoletja uporablja kot model za proučevanje nevronov pri študijah diferenciacije nevronov, njihovega metabolizma in funkcij, povezanih z nevrodegenerativnimi boleznimi, ter za testiranje nevrotoksičnosti snovi (Xie in sod., 2010).



Celice SH-SY5Y rastejo pritrjene na površino, drug del celic pa raste suspendiranih v gojišču, njihova oblika pa je bolj okrogla. Obe vrsti celic sta živi.

Slika 1: Celice SH-SY5Y v celični kulturi.

2.3 TESTIRANI NANODELCI IN NJIHOVE LASTNOSTI

2.3.1 Nano-titanov dioksid

Nanodelci TiO_2 so eni najpogosteje proizvedenih nanomaterialov. Večje delce TiO_2 dodajajo v prehranske izdelke kot barvila in prehranski dodatek, nanodelci pa so zanimivi za biomedicinske namene. Nanodelci TiO_2 se pogosto uporabljajo v kozmetičnih izdelkih in sončnih kremah, veljajo pa za varen material. Številne študije strupenosti so ugotovile, da pri nepoškodovani koži, delci TiO_2 ne morejo preiti poroženele plasti povrhnjice (Shakeel, 2016). Nanodelci TiO_2 se pojavljajo v več kristalnih oblikah, dve izmed teh sta anatazna in rutilna kristalna struktura. Bolj pogosta kristalna oblika je anatazna, večina vzorcev TiO_2 pa vsebuje obe kristalni strukturi. Delci z anatazno kristalno obliko so bolj reaktivni od rutilnih (Shi in sod., 2013).

2.3.2 Nano-silicijev dioksid

Kristalna oblika silicijevega dioksida je povezana s kroničnimi boleznimi pljuč in rakom na pljučih, medtem ko amorfna oblika velja za relativno varno. Nanodelci SiO_2 se masovno proizvajajo, uporabljajo pa se v kmetijstvu, hrani ter kozmetiki. Zaradi biokompatibilnosti in stabilnosti amorfnih SiO_2 nanodelcev pa so tudi potencialni kandidat za uporabo v biomedicinske namene, npr. za dostavo zdravil. Vplivi nanodelcev SiO_2 na zdravje ljudi so manj raziskani, iz študij na miših in podganah pa vemo, da lahko imajo kvarne učinke pri, vendar so pri teh študijah odmerki previsoki in nerealistični glede na dejansko izpostavljenost ljudi. Nanodelci SiO_2 pri visokih koncentracijah povzročajo citotoksične učinke, saj povečajo tvorbo ROS in lahko sprožajo vnetne odzive (Kim in sod., 2015; Murugadoss in sod., 2017).

2.3.3 Nano-srebro

Srebrovi nanodelci se zaradi edinstvenih lastnosti uporabljajo v medicini, pri proizvodnji hrane ter v industrijske namene. Uporabljajo se kot antibakterijska sredstva, kot premazi za medicinske pripomočke, v optičnih senzorjih, v kozmetičnih in farmacevtskih izdelkih ter kot protirakave učinkovine, saj izboljšajo delovanje protitumorskih sredstev (Zhang in sod., 2016).

Srebrovi nanodelci se odtapljajo, torej v okolje sproščajo srebrove ione, ki oksidirajo snovi v okolici. V bioloških sistemih srebrovi nanodelci delujejo cito- in genotoksično, sprožijo imunske odzive, povzročijo pa lahko tudi celično smrt. Kvarni učinek nanodelcev je odvisen od njihove koncentracije ter tudi od velikosti in oblike nanodelcev, tipa medija, temperature in funkcijskih skupin na površini delcev. Ker lahko srebrovi nanodelci prečkajo krvno-možgansko bariero, veljajo za potencialni nevrotoksin. Povečajo lahko prepustnost krvno-možganske bariere in sprožijo vnetja, prav tako pa pri izpostavljenosti pride do nabrekanja astrocitov, kar lahko povzroči propadanje nevronske celice (Akter in sod., 2018).

2.3.4 Nano-bakrov oksid

Nanodelci CuO se uporabljajo v baterijah visokotemperaturnih superprevodnikih, sončnih celicah ter katalizatorjih. Nanodelci CuO izboljšajo tudi viskoznost tekočin in zmanjša trenje, zato se uporabljajo tudi kot dodatek k plastiki in kovinskim premazom. Nanodelci CuO pa imajo zaradi svoje velike površine in morfologije kristalov tudi antibakterijske učinke (Chang in sod., 2012).

Rezultati študij *in vitro* nakazujejo na to, da so delci bakrovega oksida eni najbolj citotoksičnih kovinskih nanodelcev. Nanodelci bakrovega oksida imajo citotoksične učinke in v celicah povzročajo oksidativni stres s tem, da povečajo število ROS, kar pa privede do poškodb DNK. Delci bakrovega oksida se v raztopinah tudi odtapljajo, kar doda k toksičnemu učinku teh delcev. Odtapljanje je večje pri manjših delcih, zato je citotoksičnost CuO večja, ko so ti delci v nano obliki. Odtapljanje ionov je odvisno od temperature in pH vrednosti tekočine, pri CuO je toksičnost najnižja pri pH vrednosti od 9 do 11, že odmik za vrednost 1 od tega razpona pa povzroči povečanje citotoksičnega učinka (Chang in sod., 2012).

2.3.5 Nano-cinkov oksid

Nanodelci cinkovega oksida se uporabljajo v biomedicini, kot dostavni sistemi za zdravila ter kot antibakterijsko sredstvo. Cinkov oksid je polprevoden material, zato se ti nanodelci uporabljajo v nanosenzorjih in katalizatorjih, prav tako pa nanodelci ZnO dobro absorbirajo UV sevanje, zaradi česar se uporabljajo v kremah za zaščito pred soncem (Król., 2017).

ZnO nanodelci se odtapljajo, pri tem pa se tvorijo prosti Zn^{2+} ioni, ki lahko povzroči motnje v ravnovesju cinkovih ionov znotraj celic. Cink je pomembna komponenta mnogih encimov ter transkripcijskih faktorjev, zaradi česar lahko motnja v ravnovesju cinka znotraj celic povzroči izgubo viabilnosti celic, oksidativen stres (tvorbo ROS) in napake v delovanju mitohondrijev. V celičnih kulturah nevronov naj bi se citotoksični učinki pojavili ob tvorbi ionov ZnO^{2+} znotraj celic, prav tako pa tudi ob njihovem nastanku v mediju, ki celice obkroža (Vandebriel in De Jong, 2012).

2.4 METODE ZA TESTIRANJE CITOTOKSIČNOSTI

Preverjanje citotoksičnosti je pri bioloških študijah *in vitro* ključnega pomena. Število viabilnih celic v vzorcu ter stopnja njihove proliferacije sta dobera indikatorja zdravja celic, določeni agensi pa lahko na ta pokazatelja vplivajo. Snovi lahko povzročajo kvarne učinke na celicah preko raznih poti, s poškodbami celične membrane, preprečevanja izgradnje novih proteinov ter z ireverzibilno vezavo na receptorje in podobnimi učinki. Za testiranje kvarnih učinkov na celice obstaja več skupin metod, ki jih lahko razdelimo na kolorimetrične, flourimetrične, luminometrične teste ter diferencialne teste, pri katerih se z barvili obarvajo samo mrtve celice (Aslantürk, 2017).

Najpogosteje uporabljeni kolometrični testi so MTT test, test sproščanja laktat dehidrogenaze ter test privzema barvila nevtralnno rdeče. Fluorometrični testi so v primerjavi s kolorimetričnimi bolj občutljivi, mi pa smo uporabili test z barvilom resazurin znan tudi pod imenom alamarBlue test (Aslantürk, 2017). Za določanje števila proteinov v vzorcu smo uporabili test z barvilom Coomassie Brilliant Blue, na podlagi podatkov o količini proteinov je mogoče določiti število celic v vzorcu (Kononenko in Drobne, 2019).

Večina protokolov, ki se dandanes uporabljajo za testiranje nanodelcev, je bilo razvitih desetletja pred prvimi raziskavami nanomaterialov. To pomeni, da ti pristopi niso bili razviti posebej za testiranje citotoksičnosti nanodelcev (Zanganeh in sod., 2016). Pri testiranju ob prisotnosti nanodelcev moramo zato biti pozorni na možnosti interference. Zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti nanodelcev ter njihove reaktivnosti obstaja visoka možnost interference s pogosto uporabljenimi spektrofotometričnimi in spektrofluometričnimi testi. Nanodelci se lahko vežejo na prisotne proteine in barvila ter tako spremenijo njihovo strukturo in/ali funkcijo (Ong in sod., 2014). Ong in sodelavci (2014) so pri spektrofotometričnih in spektrofluometričnih testih ob prisotnosti nanodelcev opazili povišano absorbanco in/ali flouescenco. Ogljikove nanocevke na primer interferirajo z barvili resazurin, coomassie brilliant blue, nevtralnno rdeče in MTT (Casey in sod., 2007).

2.4.1 Test z barvilom resazurin

Resazurin je barvilo, ki se uporablja za določanje števila viabilnih, metabolno aktivnih celic v vzorcu. Resazurin lahko dodamo direktno v celično kulturo, kjer preide celično membrano ter vstopi v celice. V viabilnih celicah z aktivnim metabolizmom se moder neflourescenten resazurin reducira v živo roza obarvan resorufin, ki flouescira (Aslantürk, 2017). Količino proizvedenega resorufina ovrednotimo z merjenjem flouescence, eksitacija poteka pri 560 nm, emisijo pa merimo pri 590 nm. Namesto flouescence lahko merimo tudi absorbanco, ampak je ta način merjenja manj občutljiv, zato se ne uporablja pogosto (Aslantürk, 2017).

Zaradi tega, ker se resazurin reducira v prisotnosti metabolno aktivnih celic, lahko podatke o pretvorbi neposredno koreliramo s številom zdravih celic, ki so prisotne v vzorcu (Neufeld in sod., 2018). Inkubacijska doba, ki je potrebna da dobimo dovolj flouescentnega signala je po navadi med 1 in 4 ure. Čas inkubacije je odvisen od vrste celic in njihove metabolne aktivnosti, gostote celic ter vrste gojišča. Metoda z resazurinom se lahko uporablja skupaj z nekaterimi drugimi metodami, kar omogoča, da dobimo natančnejše podatke o citotoksičnosti. Težavo pri merjenju lahko predstavljajo morebitne testne snovi v kulturi, ki lahko motijo flouescentni signal, kar pomeni, da ne dobimo natančnih podatkov (Aslantürk, 2017).

2.4.2 Test privzema barvila nevtralnno rdeče

Test privzema barvila nevtralnno rdeče je eden najpogosteje uporabljenih testov za merjenje citotoksičnosti oziroma viabilnosti celic. S testom preverjamo zmožnost viabilnih celic, da barvilo privzamejo in je dober indikator poškodb na lizosomih. Nevtralnno rdeče je barvilo s šibkim kationskim nabojem, s pasivno difuzijo pa lahko prehaja skozi celično membrano. Privzem barvila v celico je odvisen od sposobnosti celic, da v lizosomih ohranja kisel pH, kar je od ATP odvisen proces. V celicah se barvilo nabira v lizosomih, kjer je pH nizek, tam pa barvilo privzame naboj, zaradi česar se ujame. Pri viabilnih celicah barvilo ne more zapustiti lizosomov, v primeru, da je celica poškodovana ali pa začne odmirati in ne more več vzdrževati nizkega pH lizosomov, pa se barvilo sprosti v okolico. Količina privzetega barvila je proporcionalna številu viabilnih celic v vzorcu (Aslantürk, 2017; Repetto in sod., 2018).

2.4.3 Test z barvilom Coomassie Brilliant Blue

Test z barvilom Coomassie Brilliant Blue se uporablja za določanje celotne količine proteinov v celicah, prisotnih v vzorcu, s tem pa se določi tudi proliferacija celic (Chew in Maibach, 2000). Barvilo se pri nizkem pH veže na argininske, histidinske, fenilalaninske, triptofanske in tirozinske ostanke, mehanizem delovanja pa ni znan v celoti. Po vezavi barvila na protein, pride do metakromatskega premika barvila (spremembe barve) iz 465 nm na 595 nm. Premik se zgodi zaradi stabilizacije anionske oblike barvila. Razlika je najbolj drastična pri merjenju proteinov z nizko molekulsko maso. Takšni proteini namreč nimajo dovolj proteinskih ostankov, da bi presegli prag, nad katerim se signal pravilno razvije (Noble in Bailey, 2009). Barvilo CBB veže se na celične proteine, katerih število je proporcionalno številu celic v vzorcu (Kononenko in Drobne, 2019).

2.5 METODE ZA TESTIRANJE KOLIČINE PROTEINOV V VZORCU

2.5.1 Test BCA Protein Assay

S pomočjo BCA proteinskega testa lahko preverimo koncentracijo proteinov v vzorcu. Testiranje poteka s pomočjo redukcije Cu^{2+} v Cu^{1+} v alkalni raztopini. Najprej se bakrov ion veže s proteini, tako nastane kompleks svetle modre barve, bakrov ion pa se reducira. Na reducirano obliko Cu^{1+} se nato veže bikinhonska kislina (BCA), pri vezavi dveh molekul BCA na molekulo bakrovega iona se tvori vijolično obarvan produkt. Količino tega produkta zaznamo z spektrofotometričnim merjenjem absorbance pri 562 nm. Da se barva razvije, je potrebno vzorec inkubirati 30 minut na 37 °C (Thermo Scientific).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 SEZNAM KEMIKALIJ TER OSTALIH SNOVI

- DMEM *Dulbecco's modified Eagle's medium* (Sigma-Aldrich, ZDA)
- FBS *fetal bovine serum* (Sigma-Aldrich, ZDA)
- PBS *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Tripsin-EDTA (Sigma-Aldrich, ZDA)
- MiliQ voda - pripravljena s ionskim izmenjevalcem Advantage A10 TOC Monitor
- H₂O₂ (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- BSA *Bovine serum albumine* (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Reagentna mešanica Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)
- Titanovi nanodelci z oznakami – TiO₂_A, TiO₂_B in TiO₂_C
- Nanodelci bakrovega oksida CuO (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Nanodelci srebra Ag (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Nanodelci cinkovega oksida ZnO (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Barvilo resazurin (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Barvilo neutral red (Sigma-Aldrich, ZDA)
- Barvilo Coomassie Brilliant Blue G 250 (Merck, Darmstadt, Nemčija)
- Topilo za nevtralnno rdeče (50 % EtOH, 49 % miliQ; 1 % očetna kislina; vse komponente so od proizvajalca Merck, Darmstadt, Nemčija)
- NaOH Topilo (0,1M; Sigma-Aldrich, ZDA)

3.2 SEZNAM MATERIALA TER LABORATORIJSKE OPREME

Material:

- Plastična centrifugirka, volumnov 15 in 50 mL
- Mikrocentrifugirka, volumnov 1,5 in 2 mL
- Pipetni nastavki: 1-10, 10-200, 100–1000 µL
- Steklene pipete, volumnov 10, 15 in 25 mL
- Mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami, prozorne
- Brizga 15 ml
- Filtri Chromafil Xtra, PVDF 0,20 µm

Oprema:

- Centrifuga 3-30 KS (Sigma, Nemčija)
- Pipete (Eppendorf, Nemčija in Vitlab, Nemčija)
- Rotor (Agar Scientific, Združeno Kraljestvo)
- Inkubator (Mettler, Nemčija)
- Laminarij (Iskra PIO, Slovenija)
- Centrifuga Centric 322B (Domel, Slovenija)

3.3 LASTNOSTI UPORABLJENIH NANODELCEV

Nanodelci uporabljeni v eksperimentalnem delu in njihove lastnosti so navedene v Preglednici 2. Meritve povprečne velikosti delcev v vozni suspenziji, gojišču ter meritev povprečne primarne velikosti delcev nismo izvajali v sklopu magistrskega dela, temveč so te meritve izvajali drugi. Nanodelci TiO₂_A imajo mešano kristalno strukturo – 85 % anatazne in 15 % rutilne kristalne strukture. ND TiO₂_B imajo rutilno kristalno strukturo. ND TiO₂_C imajo rutilno kristalno strukturo in imajo na površini dodan premaz iz SiO₂.

Preglednica 2: Karakteristike uporabljenih nanodelcev. *Pred meritvijo smo opazili intenzivno posedanje ND. Meritev je bila izvedena brez posedenih ND. NA – zaradi nestabilnosti suspenzije meritev ni bila mogoča. TEM – presečna elektronska mikroskopija. DLS – dinamično sipanje svetlobe. / – meritev ni bila izvedena.

Nanomaterial	Povprečna primarna velikost delcev določena s TEM (nm)	Povprečna velikost v vodni suspenziji določena z DLS (nm)	Povprečna velikost v gojišču za celice določena z DLS (nm)	Zeta potencial v vodi (mV)	Vir nanomateriala ter interna oznaka nanomateriala
TiO ₂ _A	< 100	/	/	/	TDMA; G1-1
TiO ₂ _B	300	/	/	/	TDMA ; G3-1
TiO ₂ _C	20	/	/	/	TDMA; G8-2
SiO ₂	100-250	300-600	/	-27	Sigma-Aldrich; SiO ₂ _28
Ag	50-100	/	/	/	Sigma-Aldrich; Ag_7
CuO	130	750	/	-24	Sigma-Aldrich; CuO_68
ZnO	237	113	456	-17	Sigma-Aldrich; ZnO_6

3.4 GOJENJE IN PRESAJANJE CELIČNE KULTURE SH-SY5Y IN VITRO

Celično linijo človeškega nevroblastoma SH-SY5Y smo gojili v gojišču DMEM, ki smo mu predhodno dodali 10 % fetalnega govejega seruma (ang. *fetal bovine serum*; FBS). Gojišče smo pred dodatkom k celicam segreli do približno 37 °C. Celice smo gojili pod nadzorovanimi pogoji v inkubatorju (37 °C, atmosfera s 5 % CO₂, visoka zračna vlažnost). Delo s celicami je potekalo v laminariju pod aseptičnimi pogoji. Celice smo gojili v posodah T25 in T75, presadili pa smo jih dvakrat tedensko, s 3 do 4 dnevnim razmikom.

V nadaljevanju so napisane količine dodanih kemikalij, primernih za manjšo T25 posodo, pri uporabi pa T75 smo količine potrojili. V procesu presajanja smo iz posode najprej odsesali gojišče, ter površino sprali s 5 mL fosfatnega pufra PBS. Po spiranju smo dodali 0,5 mL tripsin-EDTA, kar je zadostovalo, da je bila z raztopino pokrita celotna površina posode, ki so jo poraščale celice. Celice smo tripsinizirali približno 3 minute, da so se te vidno odlepili od podlage. V posodo smo nato dodali 5 mL gojišča ter jih 5 minut centrifugirali pri 1100 obratih/min, na koncu pa smo odstranili supernatant. Pelet, v katerem so bile posedene celice, smo resuspendirali v svežem DMEM-FBS gojišču. Pri resuspendiranju smo s pipeto razbili skupke celic, ki so se ustvarili med centrifugiranjem, da bi dobili enakomerno suspenzijo celic.

Koncentracijo celic v gojišču smo določili s štetjem v Burker-Turkovi števni komori, tako da smo manjšo količino vzorca s pipeto prenesli iz laminarija na števno komoro. Gojišče s celicami smo nato ustrezno razredčili, tako da smo dobili koncentracijo 200.000 celic/mL. Del gojišča s celicami smo prenesli v novo gojilno posodo, ji dodali ustrezno količino svežega gojišča. Preostanek celic smo uporabili pri eksperimentalnem delu.

3.5 NASAJANJE CELIC NA MIKROTITRSKE PLOŠČE

Celice SH-SY5Y smo nasadili na mikrotitrne plošče s 96 vdolbinicami, v vsako od njih pa je bilo dodanih 100 µL gojišča s celicami, kar ustreza 20.000 celicam na vdolbinico. V prvo ali zadnjo vrstico na mikrotitrski plošči smo dodali samo gojišče brez celic, kar je služilo za odštevanje ozadja pri spektrofotometričnih meritvah. Plošče smo nato inkubirali 24 ur pri nadzorovanih pogojih v inkubatorju (37 °C, atmosfera s 5 % CO₂, visoka zračna vlažnost), da so se celice posedle in pritrdile na dno posameznih vdolbinic.

3.6 PRIPRAVA SUSPENZIJ NANODELCEV

Uporabili smo 7 različnih nanodelcev - delce bakrovega oksida (CuO), cinkovega oksida (ZnO), silicijevega dioksida (SiO₂), srebrove nanodelce (Ag) ter 3 različne vzorce titanovega dioksida (TiO₂), katerih lastnosti so navedene v preglednici 2 (stran 14). Za vsak tip nanodelcev ter vsako koncentracijo smo opravili 3 biološke ponovitve s korono Iz BSA in 3 biološke ponovitve brez le-te. Pri vsaki koncentraciji in biološki ponovitvi smo naredili 6 tehničnih ponovitev.

Vsi omenjeni nanodelci so bili že pripravljene v suspenziji s koncentracijo 10 mg/mL. Vse ND z izjemo ND titanovega dioksida smo naprej 15 minut sonicirali s pomočjo ultrazvočne vodne kopeli.

3.6.1 Priprava nanodelcev brez biomolekularne korone, t.i. neoblečeni ND

Vse ND smo pred redčenjem vorteksirali. Neoblečene nanodelce smo pripravili tako, smo iz 700 μ L ND koncentracije 10 mg/mL, dodali 700 μ L gojišča miliQ vode. Tako pripravljene delce smo centrifugirali 15 minut pri 21000 g. V naslednjem koraku, smo odstranili supernatant, ostalo pa nam je 700 μ L ND, ki smo jih razredčili do koncentracije 1 mg/mL z dodatkom gojišča DMEM brez dodatka FBS. Pri tem smo pazili, da so bili delci resuspendirani in enakomerno razporejeni v gojišču. Tako pripravljene ND smo nato razredčili do koncentracij 1, 10, 20 in 50 μ g/mL, ki smo jih nato uporabili pri testiranju – dodajanju na plošče.

3.6.2 Priprava nanodelcev z biomolekularno korono, t.i. oblečeni ND

Najprej smo predhodno filtriran BSA razredčili iz založne koncentracije 10 mg/mL na koncentracijo 0,5 mg/mL. Za vsakega od delcev, na katerih smo pripravili biomolekularno korono smo potrebovali 700 μ L BSA. Delce z biomolekularno korono smo pripravili tako, da smo k 700 μ L nanodelcem koncentracije 10 mg/mL dodali 700 μ L 0,5 mg/mL BSA. Pripravili smo tudi dve kontroli za test BCA Protein Assay, pri čemer smo uporabili 700 μ L miliQ vode ter 700 μ L 0,5 mg/mL BSA. Nato smo vzorce 45 minut inkubirali na rotorju pri sobni temperaturi in 20 obratih/min. Vzorce smo nato centrifugirali 15 minut pri 21000 g.

V naslednjem koraku (BCA Protein Assay) smo preverili, koliko BSA se je vezalo na delce. To smo izvedli preko merjenja koncentracije BSA v supernatantu. Za to smo uporabili supernatant, ki je nastal po centrifugiranju. Po meritvi smo odstranili ves supernatant, ND v peletu pa smo resuspendirali v 1 mL gojišča DMEM brez FBS, tako da smo dobili koncentracijo 7 mg/mL. Tako pripravljene ND smo, nato razredčili do koncentracij 1, 10, 20 in 50 μ g/mL, ki smo jih kasneje dodali na mikrotitrne plošče.

3.6.3 Merjenje vsebnosti proteinov BSA v supernatantu s testom BCA Protein Assay

Količino proteinov v supernatantu smo določili s pomočjo testnega kompleta BCA Protein Assay. Reagentno mešanico smo pripravili tako, da smo zmešali reagent A in reagent B v razmerju 50:1 v 15 mL centrifugirki, ter jo ovili z aluminijasto folijo, ki je služila kot zaščita pred svetlobo. Pripravili smo znane koncentracije govejega serumskega albumina (ang. *Bovine serum albumine*; BSA), tako da smo BSA pri koncentraciji 10 mg/mL redčili v gojišču DMEM brez FBS do koncentracij 2, 1.5, 1.0, 0.5, 0.1 ter 0 mg/mL. Na mikrotitrsko ploščo smo nanесли 25 μ L vzorcev znanih koncentracij in jim dodali 180 μ L reagentne mešanice. Te vzorce smo pripravili v dveh tehničnih ponovitvah, služili pa so kot umeritvena krivulja za izračun koncentracije proteinov pri naših vzorcih.

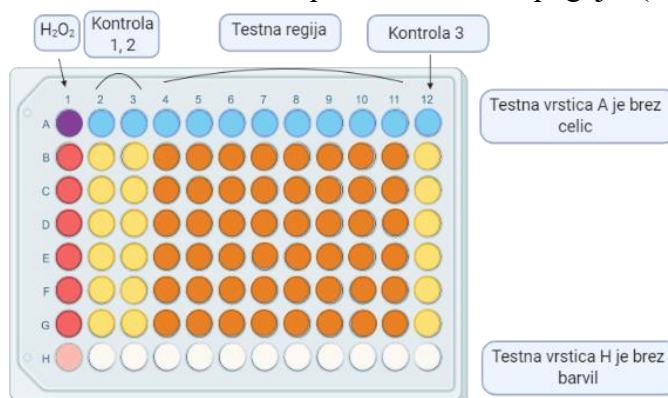
Dve kontroli za BCA protein assay smo pripravili v koraku ustvarjanja korone na nanodelcih. V kontroli smo dodali 700 μl 0,5 mg/mL BSA in 700 μl miliQ vode nato pa smo jih 15 minut centrifugirali pri 21000 g. Za testiranje BCA protein assay smo uporabili med centrifugiranjem pridobljen supernatant teh kontrol. Na mikrotitrsko ploščo smo nanесли 25 μL vzorcev znanih koncentracij in jim dodali 180 μL reagentne mešanice.

Pri testiranju BCA protein assay smo testirali koncentracijo proteinov preostalih v supernatantu po centrifugiranju proteinov z nanodelci (proces ustvarjanja korone). Vse vzorce z neznanimi količinami proteinov ter kontrole smo na ploščo prav tako nanесли v dveh ponovitvah. Nanesli smo 25 μL posameznega vzorca supernatanta ter dodali 180 μL reagentne mešanice. Pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo nato 30 minut inkubirali pri nadzorovanih pogojih (37 °C, atmosfera s 5 % CO₂, visoka zračna vlažnost). Po inkubaciji smo izmerili absorbanco s spektrofotometrom in s programom i-control 2.0. Iz dobljenih podatkov smo s pomočjo umeritvene krivulje izračunali količino proteinov, ki so se vezali na nanodelce.

3.7 DODAJANJE PRIPRAVLJENIH NANODELCEV NA 96-KANALNO MIKROTITRSKO PLOŠČO S CELICAMI SH-SY5Y

Iz 96-kanalnih mikrotitrskih plošč, kjer so že bile predhodno nasajene celice SH-SY5Y (20.000 celic na vdolbinico), smo odesali DMEM-FBS. Pri tem smo pazili, da s koncem steklene pipete nismo praskali po dnu vdolbinic, kjer se nahajajo celice. V naslednjem koraku smo dodali 50 μl gojišča z nanodelci ustreznih koncentracij (50, 20, 10 ali 1 mg/ml), z že ustvarjeno biomolekularno korono ali brez nje, ki so bili razredčeni v gojišču DMEM brez FBS. Gojišče s celicami smo pred dodajanjem vsakič premešali s pipeto, da se celice niso posedale, ampak so bile enakomerno suspendirane v gojišču.

V tri stolpce na plošči smo vnesli 50 μL samega gojišča DMEM brez FBS brez celic, ti stolpci pa so služili kot kontrola. Za pozitivno kontrolo smo uporabili 0,5 mM H₂O₂, ki smo ga dobili z redčenjem 100 mM H₂O₂ z gojiščem DMEM. Tako pripravljeno 0,5 mM H₂O₂ smo v volumnu 50 μL dodali posameznim vdolbinicam na mikrotitrski plošči. Robne vdolbinice na testnih ploščah smo uporabili za pozitivno kontrolo ali pa je v rezultatih nismo upoštevali. Tako pripravljene vzorce smo nato inkubirali 24 ur pri nadzorovanih pogojih (37 °C, atmosfera s 5 % CO₂, visoka zračna vlažnost). Postavitev sheme je prikazana tudi spodaj (Slika 2).



Slika 2: Prikaz tipične postavitve na mikrotitrski plošči. Shema je bila ustvarjena s pomočjo spletnega programa Biorender.

3.8 TESTI VIABILNOSTI, STABILNOSTI LIZOSOMOV TER METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC

Vse delo z barvili ter celicami je potekalo aseptično v laminariju. Po 24-urni inkubaciji celic z ND smo naredili teste z rezazurinom, privzemom barvila nevtralnno rdeče (NR) ter obarvanje proteinov v celicah z barvilom Coomassie Brilliant Blue (CBB).

3.8.1 Priprava barvil resazurin in nevtralnno rdeče ter testiranje - resaurin, NR in CBB

Najprej smo pripravili barvilo NR. Barvilo smo najprej premešali na stresalniku, nato pa iz založne koncentracije 4 mg/mL pripravili koncentracijo 0,4 mg/mL, tako da smo barvilo 10-krat redčili v fosfatnem pufru PBS. Tako pripravljeno delovno koncentracijo barvila smo nato prefiltrirali skozi sterilno brizgalko, na kateri je bil nameščen sterilni filter (Chromafil Xtra, PVDF 0,20 μ m). Tako smo odstranili morebitne kristale v barvilu ter barvilo sterilizirali. Delovno koncentracijo resazurina smo pripravili tako, da smo založno koncentracijo barvila najprej vorteksirali nato pa 10-krat redčili v fosfatnem pufru, da smo dobili koncentracijo 0,15 mg/mL.

V vsako izmed vdolbinic na mikrotitrski plošči smo vnesli 18 μ L barvila NR in 30 μ L resazurina. Barvila nismo dodali v zadnjo vrstico testne plošče, kar je razvidno tudi iz zgornje sheme (Slika 2). Tako pripravljeno mikrotitrsko ploščo smo nato inkubirali pri nadzorovanih pogojih (37 °C, atmosfera s 5 % CO₂, visoka zračna vlažnost) od 3 do 3,5 ur.

Po inkubaciji smo na mikročitalcu spektrofluorimetrično izmerili fluorescenco barvila resazurin pri valovnih dolžinah 560 nm/590 nm. Podatke za posamezne vdolbinice smo shranili ter uporabili pri statistični obdelavi. Nato smo odesali gojišče ter v vse vdolbinice na plošči dodali 80 μ L topila za nevtralnno rdeče (50 % EtOH (96 %), 49 % dH₂O, 1 % ledocetna kislina), da se je v celicah ujeto barvilo lahko izločilo v gojišče, kjer smo njegovo koncentracijo nato lahko izmerili z merjenjem fluorescence. Mikrotitrsko ploščo smo nato 15 minut inkubirali pri sobni temperaturi ter jih občasno stresali. Nato smo na mikročitalcu spektrofotometrično izmerili fluorescenco, tokrat za barvilo NR pri valovnih dolžinah 530 nm/645 nm.

Za tem smo ponovno odesali vso tekočino, ter dodali barvilo Coomassie Brilliant Blue (0.05% Coomassie Brilliant Blue G250 pripravljen v 30 % metanol, 10 % očetna kislina, 60 % MilliQ) vse razen zadnje vrstice na mikotitrski plošči. Plošče smo nato 15 minut inkubirali pri sobni temperaturi, nato pa smo odesali barvilo ter dodali 60 μ L topila NaOH (50 % EtOH, 49 % miliQ; 1 % očetna kislina). Plošče smo nato stresali približno minuto, za tem pa smo dodali še 60 μ L topila za NR (50 % EtOH (96 %), 49 % dH₂O, 1 % očetna kislina). Po tem smo na mikročitalcu izmerili absorbanco, tokrat za CBB pri valovni dolžini 595 nm.

3.9 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Statistična obdelava podatkov je potekala v programu Excel Office 365.

3.9.1 BCA Assay

Najprej smo naredili umeritveno krivuljo iz podatkov za absorbance znanih koncentracij BCA. Te koncentracije so bile 2, 1.5, 1.0, 0.5, 0.1 ter 0 mg/mL, za vsako od koncentracij pa smo naredili dve ponovitvi ter izračunali povprečje. Podatke smo predstavili na raztresenem grafikonu absorbance v odvisnosti od koncentracije (x), ter dodali trendno črto - premico. Iz grafa smo razbrali enačbo premice $y = k \cdot x + n$ ter iz nje odčitali vrednosti za k in n . Želeli smo ugotoviti koncentracijo proteinov v supernatantu naših vzorcev iz podatkov absorbance. Podatke o absorbanci smo zato vstavili v enačbo premice $y = k \cdot x + n$, pri čemer je y enak A (absorbanci), x pa je enak c oziroma neznani koncentraciji, ki jo želimo izračunati. Končna enačba je $A = k \cdot c + n$.

Preden smo podatke o absorbanci vstavili v enačbo, da bi dobili iskane koncentracije, pa smo morali podatke še obdelati. Za vsak testiran nanodelec smo naredili tri neodvisne ponovitve, iste vzorce pa smo testirali v dveh ponovitvah. Vsakič smo naredili še dve kontroli (BCA protein in miliQ voda), vsako od kontrol smo nanесли na ploščo v dveh ponovitvah. Najprej smo izračunali povprečje obeh ponovitev istih vzorcev ter kontrol. Povprečne testne vrednosti absorbance pa smo nato vstavili v dobljeno enačbo, da bi dobili koncentracijo proteinov v supernatantu.

Dobljene vrednosti koncentracije proteinov v supernatantu vzorcev z nanodelci smo odšteli od vrednosti povprečja kontrol, da bi dobili delež proteinov, ki so se ob centrifugiranju posedli z nanodelci. Podatek o vseh treh ponovitvah vzorca smo nato množili s skupnim volumnom vzorca (1,4 ml), da bi po enačbi $m = c \cdot V$ dobili podatek o masi proteinov, ki so se vezali na nanodelce. Podatek smo nato delili še s 7, saj smo imeli v vsakem vzorcu 7 mg nanodelcev. Tako smo dobili maso vezanih proteinov na miligram delcev. Te podatke lahko medsebojno primerjamo, da bi ugotovili, kakšna masa proteinov se je vezala na katere delce.

3.9.2 Test z barvili resazurin, nevtralnno rdeče in Coomassie Brilliant Blue

Podatke smo obdelali za vsako izmed bioloških ponovitev ter vsak test z barvilom posebej. Najprej smo od podatkov fluorescence oz. absorbance odšteli ozadje. Za vrednosti ozadja smo uporabili prvo vrstico na mikrotitrski plošči, v katero nismo dodali celic, dodali pa smo vse uporabljene reagente in barvila ter gojišče DMEM brez FBS. Za tem smo izračunali povprečje vseh tehničnih ponovitev za posamezne teste in kontrole. To smo naredili za vse 3 biološke ponovitve s korono (oblečeni delci) ter ločeno še za ponovitve brez korone (neoblečeni delci). Vse podatke o povprečjih smo nato normalizirali na povprečje kontrol z enačbo - podatek * 100 / povprečje dveh kontrol. Iz dobljenih normaliziranih povprečij smo nato izračunali povprečje vseh treh bioloških ponovitev za oblečene delce, ločeno pa še za neoblečene. Tako dobljene podatke smo nato prikazali na grafu.

Statistično analizo smo izvedli s t-testom na podatkih normaliziranih povprečij vseh treh testnih ponovitev, v primerjavi s podatki o kontrolah, tako za oblečene kot tudi za neoblečene nanodelce. S t-testom smo primerjali še podatke oblečenih in neoblečenih nanodelcev. Rezultate t testa za statistično značilno razliko (P vrednost je pod 0,05) smo prikazali na grafu, pri čemer smo uporabili dodatek k programu Excel imenovan XY Chart Labeler, ki je prosto dostopen na spletu.

4 REZULTATI

4.1 REZULTATI TESTA BCA ZA DOLOČANJE VSEBNOSTI PROTEINOV

S testom BCA smo določili koncentracijo preostalih proteinov v supernatantu vzorca nanodelcev, ki smo jim predhodno ustvarili korono. Iz podatkov koncentracije proteinov v supernatantu, smo izračunali koncentracijo proteinov, vezanih v predhodno ustvarjeno korono na nanodelcih. Najvišja koncentracija proteinov, vezanih v korono, je bila prisotna pri nanodelcih TiO₂_A, najnižjo koncentracijo pa smo dobili pri srebrovih nanodelcih.

Preglednica 3: Koncentracija vezanih proteinov na nanodelcih. Podatki so pridobljeni z metodo BCA za merjenje količine proteinov v vzorcu. Prikazani podatki so povprečja 3 ponovitev pri vsakem delcu in standardna napaka – vsako ponovitev smo ponovili v dveh tehničnih ponovitvah.

Vrsta delcev	Koncentracija proteinov vezanih na nanodelce [ng proteinov/mg nanodelcev]
TiO ₂ _A	69300 ±290
TiO ₂ _B	9100 ±4280
TiO ₂ _C*	2200 ±820
SiO ₂	46200 ±850
Ag	900 ±1650
CuO	17500 ±1280
ZnO**	54500 ±7850

* – povprečje dveh ponovitev.

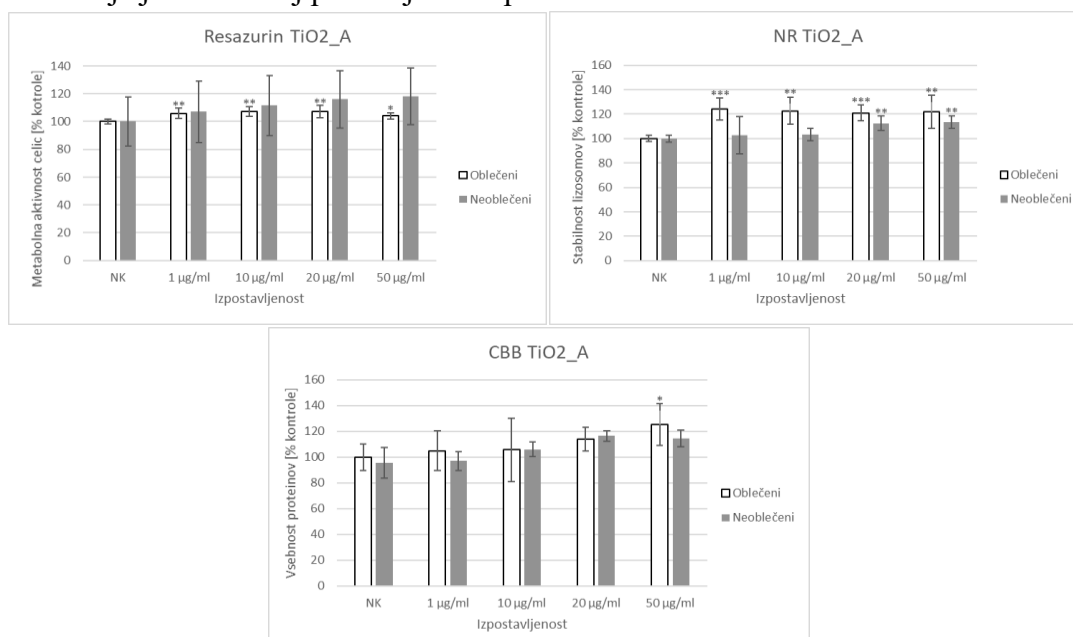
** – eno testiranje ZnO smo morali ponoviti, zato imamo v tem primeru navedeno povprečje štirih ponovitev.

4.2 NANODELCI TITANOVEGA DIOKSIDA TiO₂_A

Test z rezazurinom po izpostavitvi ND TiO₂_A (nepremazani ND, z mešano kristalno strukturo – 85 % strukture in 15 % rutilne strukture) je pokazal, da je bila metabolna aktivnost celic SH- SY5Y izpostavljenim ND TiO₂_A, tako za ND s korono, kot tiste brez nje pri vseh koncentracijah višja v primerjavi s kontrolo, naraščala pa je z višanjem koncentracije ND. Statistično značilne razlike med učinki ND s predhodno ustvarjeno korono in tistimi brez korone, nismo zaznali pri nobeni koncentraciji ND (Slika 3).

Test z privzemom barvila nevtralnno rdeče po izpostavitvi celic ND TiO₂_A, je pri vseh koncentracijah ND in obeh tretmajih pokazal višjo stabilnost lizosomov v primerjavi s kontrolo, pri vseh koncentracijah predhodno oblečenih delcev pa je bila ta višja kot pri predhodno neoblečenih ND. Pri primerjavi med tretmajema ni bilo statistično značilne razlike v učinku pri nobeni od koncentraciji.

Test z barvilom Coomassie Brilliant Blue je pokazal vsebnost proteinov in s tem število živih celic v vzorcu po izpostavitvi celic nanodelcem ND TiO₂_A. V primerjavi s kontrolo so bile vrednosti učinkov pri tretmajih višje, vrednosti pa so naraščale s koncentracijo ND pri obeh tretmajih. Do statistično značilne razlike v učinku v primerjavi s kontrolo je prišlo le v primeru oblečenih ND koncentracije 50 µg/ml. Učinek oblečenih in neoblečenih ND enake koncentracije je med seboj primerljiv – ni prišlo do statistično značilnih razlik.



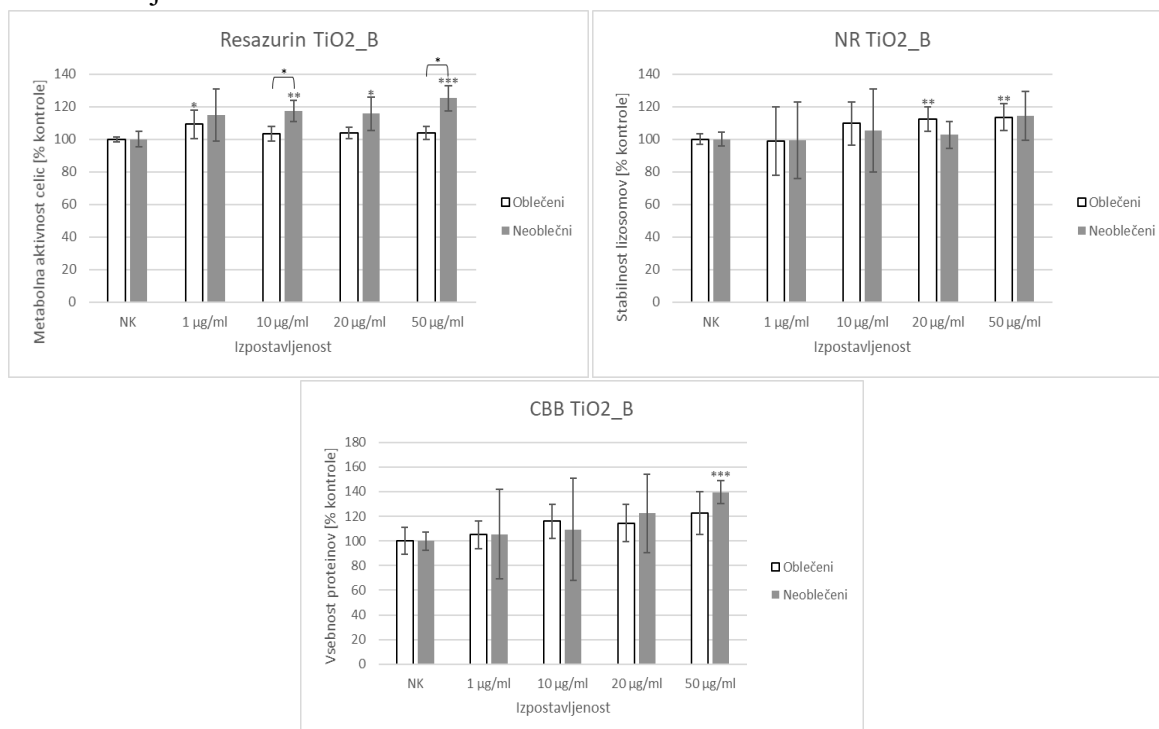
Slika 3: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND TiO₂_A. Za vsako testno koncentracijo ND smo izvedli tri neodvisne biološke ponovitve, pri vsaki je bilo izmerjenih 6 paralelnih ponovitev. NK = negativna kontrola. Prikazani podatki so normalizirani na vrednosti celic negativne kontrole. Pozitivna kontrola (dodan je bil 0,5 mM H₂O₂) ni prikazana, znašala pa je med 46 % in 53 % negativne kontrole. Zvezdica nad stolpci prikazujejo statistično značilno razliko v učinku posameznih tretmajev določenih koncentracij v primerjavi s celicami kontrole povezave med stolpci enake koncentracije pa predstavljajo statistično značilno razliko v učinku med obema tretmajema. Legenda statistično značilne razlike: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.3 NANODELCI TITANOVEGA DIOKSIDA TiO₂_B

Test z resazurinom na celicah SH-SY5Y po izpostavitvi ND TiO₂_B (nepremazani ND z rutilno kristalno strukturo), je pokazal, da je bila metabolna aktivnost celic SH-SY5Y izpostavljenim ND TiO₂_B, tako za ND s korono, kot tiste brez nje pri vseh koncentracijah višja od kontrole. Statistično značilno razliko med učinki ND z in tistimi brez predhodno ustvarjene korone smo zaznali pri koncentracijah 10 µg/ml in 50 µg/ml (Slika 4).

Test s privzemom barvila nevtralnno rdeče je pokazal, da je bila stabilnost lizosomov v celicah SH-SY5Y pri obeh tretmajih ND TiO₂_B vseh koncentracij višja od kontrole. Statistično značilna razlika v učinku je bila v primerjavi s kontrolo prisotna le pri oblečenih ND, pri koncentracijah 20 in 50 µg/ml. Statistično značilne razlike v učinku med tretmajema nismo opazili pri nobeni koncentraciji.

Test z barvilom Coomassie Brilliant Blue je pokazal vsebnost proteinov in s tem število živih celic v vzorcu, pri čemer smo statistično značilno razliko v učinku v primerjavi s kontrolo opazili samo pri prehodno neoblečenih ND TiO₂_B koncentracije 50 µg/ml. Statistično značilne razlike v učinku predhodno oblečenih in neoblečenih ND nismo opazili pri nobeni koncentraciji.



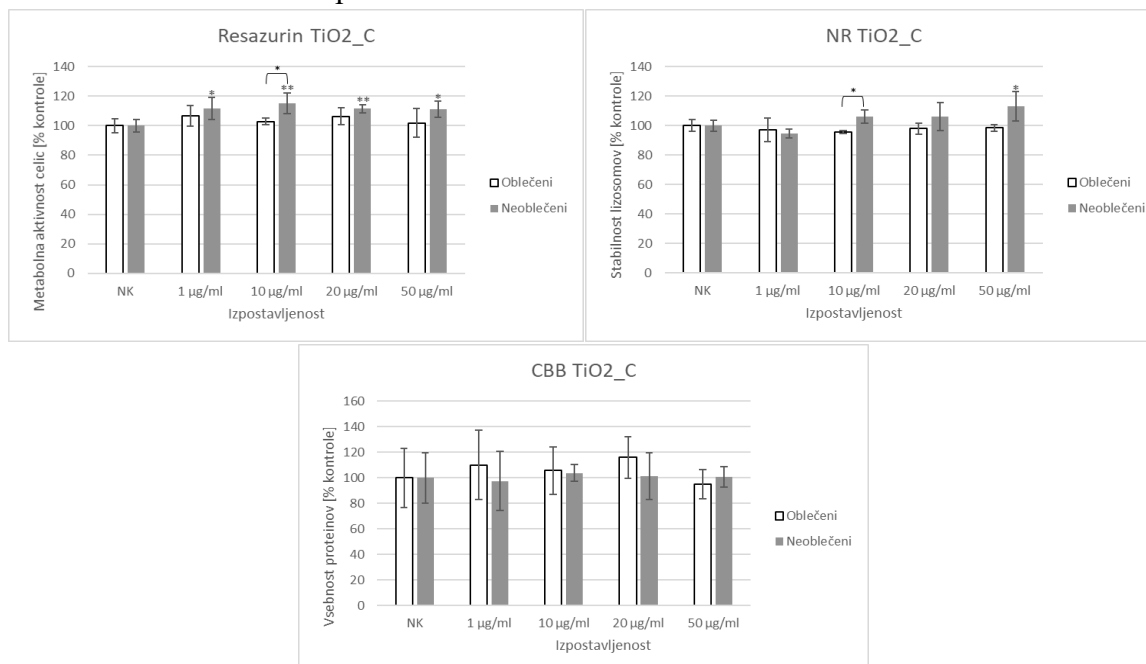
Slika 4: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND TiO₂_B. Za vsako testno koncentracijo ND smo izvedli tri neodvisne biološke ponovitve, pri vsaki je bilo izmerjenih 6 paralelnih ponovitev. NK = negativna kontrola. Prikazani podatki so normalizirani na vrednosti celic negativne kontrole. Pozitivna kontrola (dodan je bil 0,5 mM H₂O₂) ni prikazana, znašala pa je med 46 % in 53 % negativne kontrole. Zvezdica nad stolpci prikazujejo statistično značilno razliko v učinku posameznih tretmajev določenih koncentracij v primerjavi s celicami kontrole povezave med stolpci enake koncentracije pa predstavljajo statistično značilno razliko v učinku med obema tretmajema. Legenda statistično značilne razlike: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

4.4 NANODELCI TITANOVEGA DIOKSIDA TiO₂_C

Test z resazurinom na celicah SH-SY5Y po izpostavitvi ND TiO₂_C (ND premazani s SiO₂, z rutilno kristalno strukturo), je pokazal, da je bila metabolna aktivnost celic SH-SY5Y izpostavljenim ND TiO₂_C, tako za ND s korono, kot tiste brez nje pri vseh koncentracija višja od kontrole. Statistično značilno razlike v učinku ND z in tistimi brez korone smo zaznali pri koncentraciji 10 µg/ml (Slika 5).

Test s privzemom barvila nevtralnno rdeče je pokazal, da je bila stabilnost lizosomov v celicah, tako za ND TiO₂_C s predhodno ustvarjeno korono, kot tiste brez nje, pri vseh koncentracijah 94 % ali višja. Te vrednosti učinka so primerljive ali rahlo višje od kontrole. Statistično značilna razlika v učinku je bila v primerjavi s kontrolo prisotna le pri neoblečenih ND, pri koncentraciji 50 µg/ml. Statistično značilna razlika v učinku oblečenih in neoblečenih ND je prisotna samo pri koncentraciji 10 µg/ml.

Test z barvilom Coomassie Brilliant Blue je pokazal, da je bila povprečna vsebnost proteinov v celicah in s tem število živih celic v vzorcu, tako za ND TiO₂_C s korono, kot tiste brez nje, pri vseh koncentracijah 94 % ali višja. Statistično značilne razlike v učinku v primerjavi s kontrolo nismo opazili pri nobenem tretmaju ali koncentraciji, prav tako ni bilo bistvenih razlik v številu celic med predhodno oblečenimi in neoblečenimi ND različnih koncentracij.



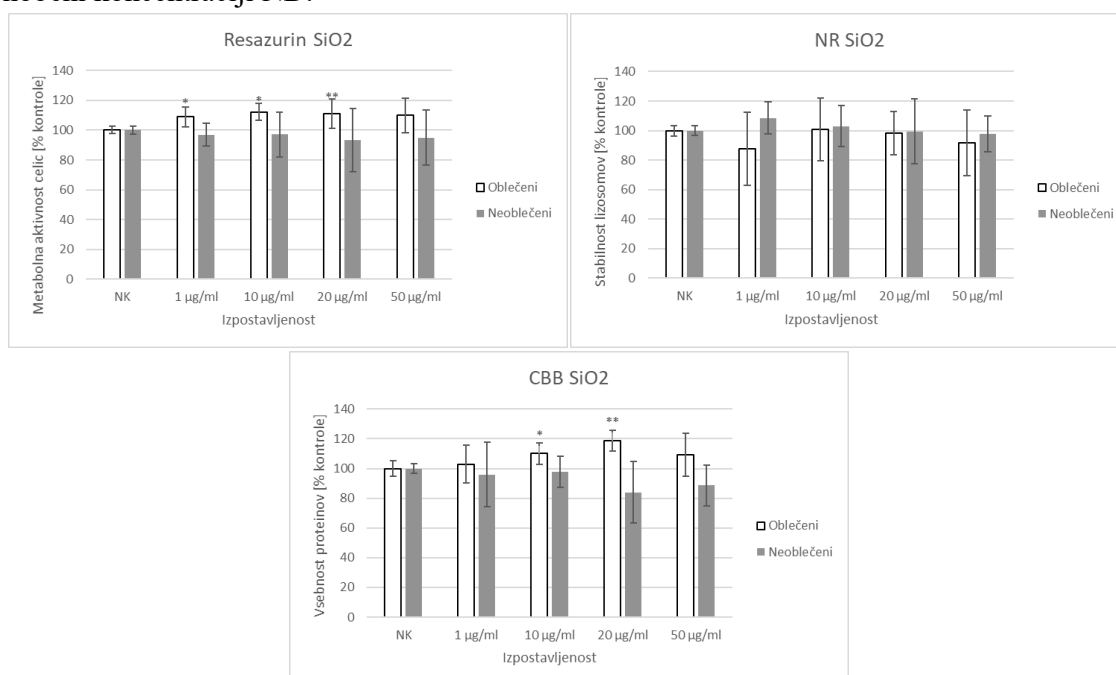
Slika 5: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi TiO₂_C. Za vsako testno koncentracijo ND smo izvedli tri neodvisne biološke ponovitve, pri vsaki je bilo izmerjenih 6 paralelnih ponovitev. NK = negativna kontrola. Prikazani podatki so normalizirani na vrednosti celic negativne kontrole. Pozitivna kontrola (dodan je bil 0,5 mM H₂O₂) ni prikazana, znašala pa je med 46 % in 53 % negativne kontrole. Zvezdica nad stolpci prikazujejo statistično značilno razliko v učinku posameznih tretmajev določenih koncentracij v primerjavi s celicami kontrole povežave med stolpci enake koncentracije pa predstavljajo statistično značilno razliko v učinku med obema tretmajema. Legenda statistično značilne razlike: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001.

4.5 NANODELCI SILICIJEVEGA DIOKSIDA SiO₂

Rezultati testa z resazurinom na celicah SH-SY5Y kažejo na to, da višje koncentracije ND SiO₂ ne vplivajo znatno na metabolno aktivnost celic v primerjavi s kontrolo. Pri predhodno oblečenih ND vseh koncentracij je vrednost metabolne aktivnosti celic SH-SY5Y glede na kontrolo znašala nad 100 %. Statistično značilno razliko s primerjavi s kontrolo smo opazili pri oblečenih ND pri koncentracijah 1, 10 in 20 µg/ml. Statistično značilne razlike v učinku pri primerjavi oblečenih in neoblečenih ND ni bilo pri nobeni koncentraciji (Slika 6).

S testom privzema nevtralnno rdeče smo ugotovili, da so se vrednosti tako za oblečene kot neoblečene ND SiO₂ gibale okoli 100 % v primerjavi s kontrolo. Statistično značilna razlika v učinku v primerjavi s kontrolo ni bila opazna pri nobenem od tretmajev ali koncentraciji, prav tako pa te razlike ni bilo pri primerjavi oblečenih in neoblečenih ND SiO₂.

Test z barvilom Coomassie Brilliant je pokazal, da je bil učinek pri neoblečenih ND SiO₂ vedno nižji kot pri oblečenih, v primerjavi s kontrolo. Pri oblečenih ND je do statistično značilne razlike v učinku v primerjavi s kontrolo prišlo le v primeru koncentracijah 1 in 10 µg/ml, medtem ko pri neoblečenih ND do statistično značilno razliko ni prišlo pri nobeni koncentraciji. Prav tako nismo zabeležili statistično značilne razlike v učinku med oblečenimi in neoblečenimi ND pri nobeni koncentraciji ND.



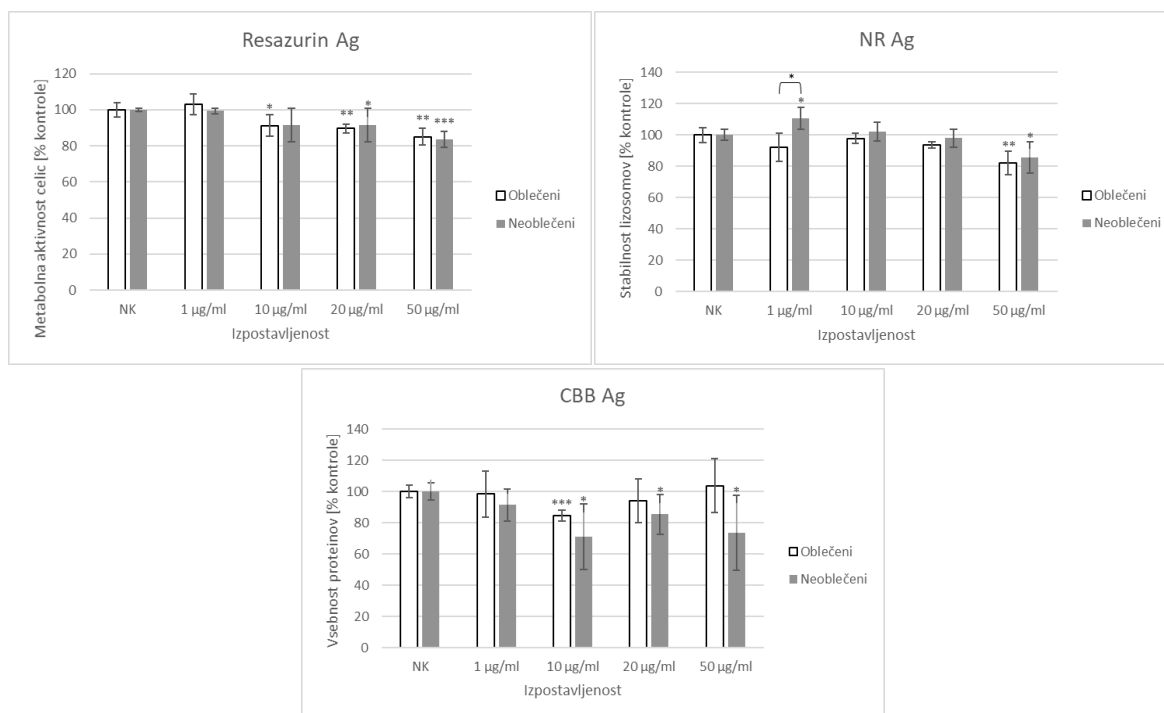
Slika 6: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND SiO₂. Za vsako testno koncentracijo ND smo izvedli tri neodvisne biološke ponovitve, pri vsaki je bilo izmerjenih 6 paralelnih ponovitev. NK = negativna kontrola. Prikazani podatki so normalizirani na vrednosti celic negativne kontrole. Pozitivna kontrola (dodan je bil 0,5 mM H₂O₂) ni prikazana, znašala pa je med 46 % in 53 % negativne kontrole. Zvezdica nad stolpci prikazujejo statistično značilno razliko v učinku posameznih tretmajev določenih koncentracij v primerjavi s celicami kontrole (test z barvilom resazurin) povezave med stolpci enake koncentracije pa predstavljajo statistično značilno razliko v učinku med obema tretmajema. Legenda statistično značilne razlike: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.6 SREBROVI NANODELCI Ag

Rezultati testa z resazurinom na celicah SH-SY5Y, kažejo na to, da imajo predhodno oblečeni in neoblečeni nanodelci Ag negativen vpliv na metabolno aktivnost celic primerjavi s kontrolo. Učinek nanodelcev se viša z njihovo koncentracijo, vrednosti metabolne aktivnosti oblečenih in neoblečenih ND pa sta primerljivi pri vseh koncentracijah ND. Najnižja koncentracija 1 mg/ml ne vpliva na metabolno aktivnost celic SH-SY5Y pri obeh tretmajih ND. Med učinki ND Ag s predhodno ustvarjeno in brez predhodno ustvarjene korone ni statistično značilne razlike pri nobeni koncentraciji (Slika 7, stran 27).

S testom privzema barvila nevtralnno rdeče po izpostavitvi celic SH-SY5Y ND Ag, smo ugotovili, da se statistično značilna razlika v učinku v primerjavi s kontrolo pri obeh tretmajih ND pojavi pri koncentraciji 50 µg/ml, pri nižjih koncentracijah pa negativen učinek ni zaznaven. Izstopa učinek neoblečenih ND pri koncentraciji 1 µg/ml, saj izmerjena vrednost presega 100 %. Do statistično značilne razlike v učinku med predhodno oblečenimi in neoblečenimi nanodelci pride samo koncentraciji 1 µg/ml ND Ag, pri ostalih pa so učinki obeh tretmajev primerljivi.

Test z barvilom Coomassie Brilliant Blue in ND Ag je pokazal, da je predhodno oblečeni in neoblečeni nanodelci znižajo vsebnost proteinov in s tem število živih celic v vzorcu v primerjavi s kontrolo. Vrednosti vsebnosti proteinov pa niso padale pričakovano z višajem koncentracije nanodelcev. Pri primerjavi predhodno oblečenih in neoblečenih nanodelcev opazimo močnejši negativni vpliv neoblečenih delcev na število živih celic, vendar pa do statistično značilne razlike v učinku ni prišlo.



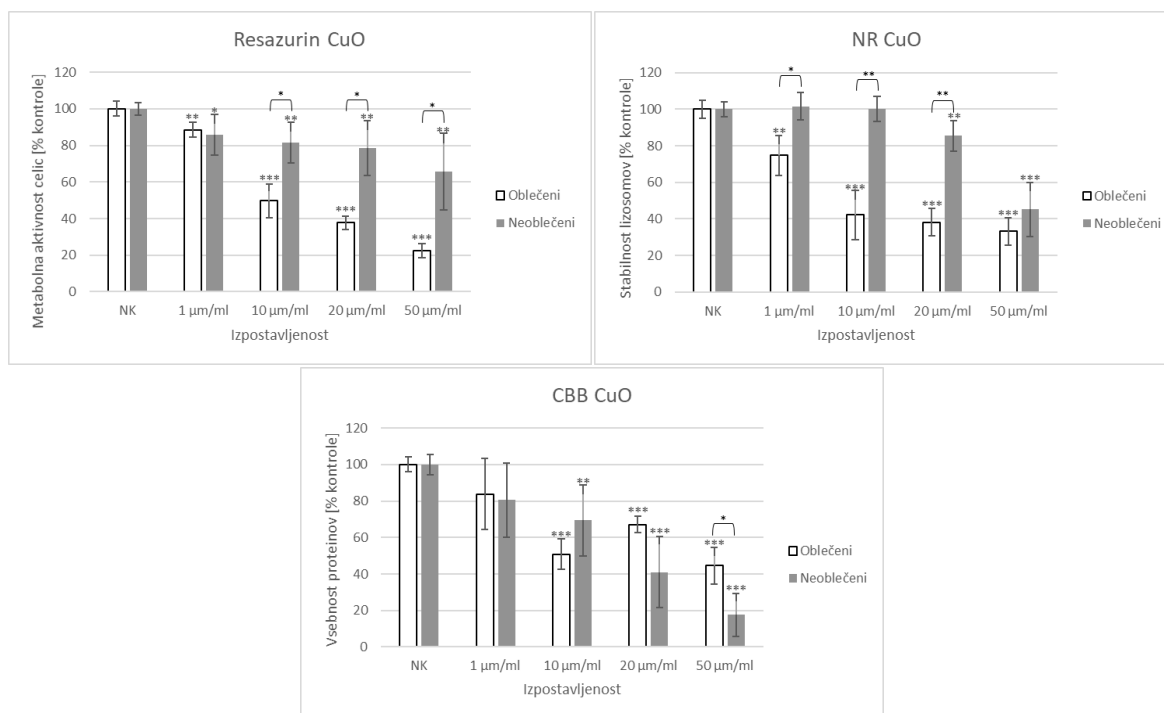
Slika 7: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND Ag. Za vsako testno koncentracijo ND smo izvedli tri neodvisne biološke ponovitve, pri vsaki je bilo izmerjenih 6 paralelnih ponovitev. NK = negativna kontrola. Prikazani podatki so normalizirani na vrednosti celic negativne kontrole. Pozitivna kontrola (dodan je bil 0,5 mM H₂O₂) ni prikazana, znašala pa je med 46 % in 53 % negativne kontrole. Zvezdica nad stolpci prikazuje statistično značilno razliko v učinku posameznih tretmajev določenih koncentracij v primerjavi s celicami kontrole (test z barvilom resazurin) povezave med stolpci enake koncentracije pa predstavljajo statistično značilno razliko v učinku med obema tretmajema. Legenda statistično značilne razlike: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.7 NANODELCI BAKROVEGA OKSIDA CuO

Rezultati testa z rezazurinom na celicah SH-SY5Y kažejo na to, da imajo ND CuO citotoksičen učinek že pri najnižji izmerjeni koncentraciji - 1 mg/ml, tako za oblečen kot tudi neoblečene ND. Učinek se pri obeh tipih ND jasno povečuje s koncentracijo, do statistično značilne razlike med tretmajema pa prvič pride pri koncentraciji 10 µg/ml, oblečeni ND imajo pri tem večji kvarni učinek na metabolno aktivnost celic SH-SY5Y (Slika 8, stran 29).

S testom privzema barvila nevtralnno rdeče, smo ugotovili, da imajo tako oblečeni kot neoblečeni ND CuO negativni vpliv na stabilnost lizosomov v celicah SH-SY5Y v primerjavi s kontrolo. Opazimo pa, da imajo oblečeni ND vseh koncentracij večji vpliv na stabilnost lizosomov v celicah SH-SY5Y, kot ND brez predhodno ustvarjene korone enakih koncentracij. Pri oblečenih ND je učinek razviden že pri koncentraciji 1 µg/ml ND, pri neoblečenih ND pa do statistično značilne razlike v učinku v primerjavi s kontrolo prvič pride pri koncentraciji 20 µg/ml. Oblečeni ND imajo vidno močnejši vpliv na stabilnost lizosomov, kar se odraža tudi v statistično značilno razliko v učinku med oblečenimi in neoblečenimi ND. Ta se pojavi pri vseh koncentracijah delcev razen pri najvišji, kjer je učinek oblečenih in neoblečenih ND na stabilnost lizosomov pri celicah SH-SY5Y primerljiv.

Test z barvilom Coomassie Brilliant Blue na celicah SH-SY5Y po izpostavitvi ND CuO, je pokazal, da je učinek ND CuO na viabilnost celic viden pri vseh koncentracijah in obeh tretmajih. Pri koncentraciji 10 µg/ml je bila nižja vsebnost proteinov pri oblečenih ND v primerjavi z neoblečenimi, pri dveh višjih koncentracijah pa je bila vrednost nižja za neoblečene ND v primerjavi z oblečenimi. Statistično značilna razlika v učinku pri primerjavi oblečenih in neoblečenih ND se je pojavila samo pri koncentraciji 50 µg/ml.



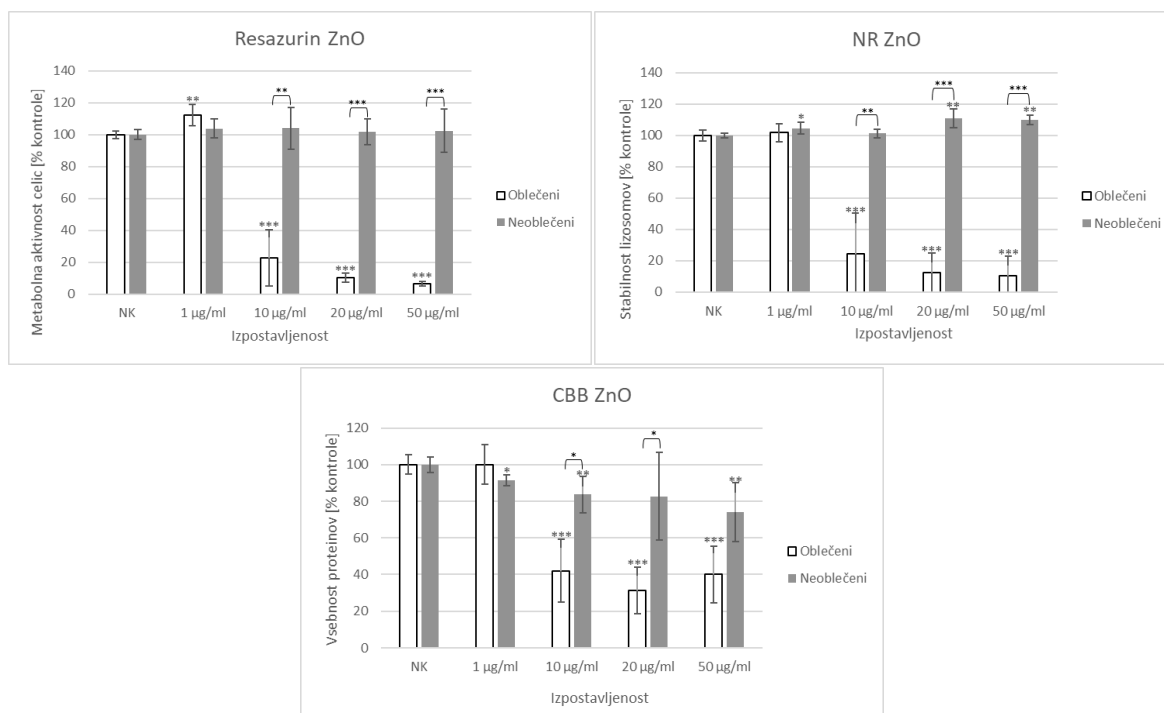
Slika 8: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND CuO. Za vsako testno koncentracijo ND smo izvedli tri neodvisne biološke ponovitve, pri vsaki je bilo izmerjenih 6 paralelnih ponovitev. NK = negativna kontrola. Prikazani podatki so normalizirani na vrednosti celic negativne kontrole. Pozitivna kontrola (dodan je bil 0,5 mM H₂O₂) ni prikazana, znašala pa je med 46 % in 53 % negativne kontrole. Zvezdica nad stolpci prikazujejo statistično značilno razliko v učinku posameznih tretmajev določenih koncentracij v primerjavi s celicami kontrole med stolpci enake koncentracije pa predstavljajo statistično značilno razliko v učinku med obema tretmajema. Legenda statistično značilne razlike: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

4.8 NANODELCI CINKOVEGA OKSIDA ZnO

Rezultati testa z resazurinom na celicah SH-SY5Y so pokazali, da imajo ND ZnO s predhodno ustvarjeno korono močan učinek na metabolno aktivnost celice. Znatno znižanje metabolne aktivnosti zaznamo že pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$ oblečenih ND. Vrednost metabolne aktivnosti celic SH-SY5Y se pri višjih koncentracijah ND znižuje. Neoblečeni ND na metabolno aktivnost celic niso vplivali negativno, saj se vrednosti pri vseh koncentracijah gibajo okoli 100 %. Statistično značilno razliko v učinku v primerjavi s kontrolo smo zaznali pri oblečenih ND pri vseh koncentracijah, pri neoblečenih ND pa te razlike ni bilo. Pri primerjavi med neoblečenimi in oblečenimi ND je do statistično značilne razlike v učinku prišlo pri koncentracijah 10, 20 in 50 $\mu\text{g/ml}$ (Slika 9, stran 31).

S testom privzema nevtralnno rdeče in ND ZnO, smo ugotovili, da imajo neoblečeni ZnO ND manjši vpliv na stabilnost lizosomov, kot tisti s predhodno ustvarjeno korono. Pri oblečenih ND je učinek razviden pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$, vrednost pa pada z višjo koncentracijo ND. Statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo opazimo pri koncentracijah 1, 20 in 50 $\mu\text{g/ml}$. Pri neoblečenih ND se vrednosti stabilnosti lizosomov pri vseh koncentracijah gibajo okoli 100 %. Statistično značilna razlika v učinku pri primerjavi oblečenih in neoblečenih ND je prisotna pri koncentracijah 10, 20 in 50 $\mu\text{g/ml}$, pri čemer so vrednosti nižje (negativni učinek je močnejši) pri predhodno oblečenih ND.

Test z barvilom Coomassie Brilliant Blue in ND ZnO je pokazal, da imajo tako prehodno oblečeni kot tudi neoblečeni ND vpliv vsebnost proteinov in s tem število živih celic v vzorcu v primerjavi s kontrolo. Statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolo smo opazili pri vseh koncentracijah, razen v primeru predhodno oblečenih ND koncentracije 1 $\mu\text{g/ml}$. Učinek oblečenih ZnO ND na vsebnost proteinov pa je bil načeloma višji, kot učinek neoblečenih ND. Pri koncentraciji 1 $\mu\text{g/ml}$ sta se vrednosti obeh tretmajev gibali okoli 100 %, razliko med tretmajema pa opazimo pri višjih koncentracijah. Statistično značilna razlika je bila pri primerjavi oblečenih in neoblečenih ND prisotna pri koncentracijah 10, 20 in 50 $\mu\text{g/ml}$ (Slika 9).



Slika 9: Metabolna aktivnost celic, stabilnost lizosomov v celicah ter vsebnost proteinov v vzorcih celic SH-SY5Y po 24 urni izpostavitvi ND ZnO. Za vsako testno koncentracijo ND smo izvedli tri neodvisne biološke ponovitve, pri vsaki je bilo izmerjenih 6 paralelnih ponovitev. NK = negativna kontrola. Prikazani podatki so normalizirani na vrednosti celic negativne kontrole. Pozitivna kontrola (dodan je bil 0,5 mM H₂O₂) ni prikazana, znašala pa je med 46 % in 53 % negativne kontrole. Zvezdica nad stolpci prikazujejo statistično značilno razliko v učinku posameznih tretmajev določenih koncentracij v primerjavi s celicami kontrole povezave med stolpci enake koncentracije pa predstavljajo statistično značilno razliko v učinku med obema tretmajema. Legenda statistično značilne razlike: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

5 RAZPRAVA

Namen magistrske naloge je bil preveriti vpliv nanodelcev s predhodno ustvarjeno korono in tistih brez predhodno ustvarjene korone na citotoksičnost ND pri nevroblastičnih celicah SH-SY5Y. Korono smo na delcih ustvarili z inkubacijo ND v raztopini BSA. Uporabili smo 7 vrst nanodelcev – tri različne delce TiO₂, nanodelce SiO₂, Ag, CuO in ZnO, katerih lastnosti so navedene v preglednici 2 (stran 14). Citotoksične učinke delcev smo preverjali s tremi različnimi testi – testom z resazurinom za merjenje metabolne aktivnosti celic, testom privzema barvila NR, ki preverja stabilnost lizosomov ter test z barvilom CBB, s katerim smo preverili vsebnost proteinov v vzorcu iz te vrednosti smo lahko predvidevali število viabilnih celic.

Pričakovali smo, da bodo ND s predhodno ustvarjeno biomolekularno korono (oblečeni ND) na celice vplivali drugače kot ND brez predhodno ustvarjene korone (neoblečeni ND), ter da bo vpliv predhodno ustvarjene biomolekularne korone pri določenih vrstah nanodelcev bolj opazen, kot pri drugih. Testirali smo tri vrste delcev, pri katerih prihaja do odtapljanja ionov – CuO, Ag in ZnO, ter štiri delce pri katerih do odtapljanja ne prihaja – SiO₂ in tri vrste TiO₂ nanodelcev. Pri tem smo pričakovali, da bodo nanodelci, ki se odtapljajo delovali bolj citotoksično kot tisti, pri katerih do odtapljanja ne prihaja.

Pri testih resazurin, NR in CBB so dobljene vrednosti pri različnih koncentracijah ND, ponekod povišane nad 100 % vrednosti kontrole, kar je lahko posledica lastnosti testa, variabilnosti in napak pri izvajanju testiranja ali pa interference. Do interference ND z barvili lahko pride zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti ND ter njihove reaktivnosti (Ong in sod., 2014). Zaradi možnosti interference smo uporabili tri različne teste (resazurin, NR, CBB), ki merijo različne kazatelje citotoksičnosti v celicah, da smo tako dobili boljši vpogled v stanje celic. Vrednosti pri testu privzema barvila NR so lahko pri testiranju lahko višje kot pri kontroli, ker se lahko nanodelci kopičijo v lizosomih celic. To poveča velikost in tudi število lizosomov v celicah in omogoči, da se v celice ujame več barvila nevtralnno rdeče (Kononenko in sod., 2019).

5.1 VPLIV NANODELCEV TITANOVEGA DIOKSIDA - TiO₂_A, B IN C NA CELICE SH-SY5Y

Rezultati testov z resazurinom, NR in CBB so pokazali, da nanodelci TiO₂_A, B in C niso statistično značilno zmanjšali metabolne aktivnosti in viabilnosti celic ter stabilnosti lizosomov v celicah. Prišlo pa je do povečane metabolne aktivnosti nad 100 % v primerjavi s kontrolo, vendar je bila ta metabolna aktivnost večinoma okoli 110 %, 120 % pa je presegla le v enem primeru (slika 4, stran 23). Statistično značilne razlike v učinku med predhodno oblečenimi in neoblečenimi delci večinoma nismo opazili. V primerih, kjer se je ta razlika pojavila, so normalizirane vrednosti znašale nad 100 %, kar nakazuje na možnost interference ND z barvili, uporabljenimi pri testih citotoksičnosti.

Testirali smo tri različne delce titanovega dioksida, ki se med seboj razlikujejo po velikosti, premazu in kristalni strukturi. Na citotoksičnost nanodelcev vpliva vrsta kristalne strukture, pri čemer so nanodelci z anatazno kristalno strukturo bolj citotoksični od tistih z rutilno kristalno strukturo (Ferraro in sod., 2020). Velikost nanodelcev vpliva na velikost njihove površine, saj imajo manjši delci večjo skupno površino kot enaka masa večjih delcev, površina pa poveča njihovo reaktivnost ter ojača interakcije z biomolekulami (Zoroddu in sod., 2014). Vpliv premaza na ND je odvisen od snovi, iz katere je ta grajen. $\text{TiO}_2\text{-C}$ nanodelci so bili v našem primeru prevlečeni s SiO_2 . SiO_2 nanodelci veljajo za stabilne in biokompatibilne (Kim in sod., 2015), zaradi tega nismo pričakovali povečanih citotoksičnih učinkov. Na lastnosti nanodelcev vpliva ustvarjena korona (Corbo in sod., 2016). Največ vezanih proteinov smo opazili pri nanodelcih $\text{TiO}_2\text{-A}$, najmanj pa pri delcih $\text{TiO}_2\text{-C}$. Učinkov teh lastnosti ND na pri testiranju nismo opazili, zaradi visokih vrednosti (več kot 100 %) pri testih citotoksičnosti.

Valdiglesias in sodelavci (2013b) pri koncentracijah 20-150 $\mu\text{g/ml}$ TiO_2 nanodelcev ter različnih časih izpostavitve (3,6 in 24 ur) s testom MMT ter s testom privzema barvila nevtralnno rdeče niso opazili zmanjšanja celične viabilnosti pri celicah SH-SY5Y, opazili pa so večjo pogostost apoptoze – programirane celične smrti. Tudi naši rezultati pri vseh treh delcih z resazurinom ter CBB nakazujejo na to, da celična viabilnost ni bila zmanjšana, prav tako nismo opazili statistično značilne razlike med oblečenimi in neoblečenimi nanodelci $\text{TiO}_2\text{-A}$, B in C. S testom NR prav tako nismo opazili zmanjšane stabilnosti lizosomov, kar je prav tako v skladu z rezultati študije Valdiglesias in sodelavci (2013b).

Pri vseh treh testih citotoksičnosti smo opazili primere vrednosti, ki so bile povišane nad 100 % negativne kontrole, to pa nakazuje na možnost interference nanodelcev z barvili resazurin, NR in CBB. Ong in sodelavci (2014) za nanodelce TiO_2 niso opazili interference z barvilom resazurinom pri koncentraciji 10 $\mu\text{g/ml}$ so pa jo opazili pri koncentraciji 100 $\mu\text{g/ml}$ ND. Ferraro in sodelavci (2020) so v svoji študiji citotoksičnosti nanodelcev TiO_2 poročali o interferenci nanodelcev s testom MMT. Navedli so študije, ki poročajo o tem, da lahko nanodelci TiO_2 absorbirajo in razpršijo vidno svetlobo, kar lahko vpliva na absorbanco izmerjeno pri kolometričnih testih. O interferenci nanodelcev TiO_2 z barvilom nevtralnno rdeče so poročali Guadagnini in sodelavci (2015), pri čemer so poročali o povišanih vrednostih fluorescence in absorbance. Zaradi teh dejavnikov je najverjetnejši vzrok povišanih vrednosti fluorescence in absorbance pri vseh treh testih interferenca ND TiO_2 z barvili. Interferenca je prav tako potencialno zakrila ali zmanjšala morebiten kvantni učinek nanodelcev TiO_2 , na možnost tega pa v svoji študiji opozarjajo tudi Ong in sodelavci (2014).

5.2 VPLIV NANODELCEV SILICIJEVEGA DIOKSIDA - SiO_2 NA CELICE SH-SY5Y

Silicijevi nanodelci niso močno vplivali na metabolno aktivnost celic in stabilnost lizosomov v celicah. Do statistično značilnih razlik je prišlo le pri oblečenih delcih pri testu z resazurinom, ko so bile vrednosti za oblečene delce višje od 100 %, kar nakazuje na možnost

interference. Test z barvilom CBB je pokazal nekoliko večji vpliv neoblečenih delcev na vsebnost proteinov in s tem število viabilnih celic v vzorcu ter njihovo proliferacijo v odvisnosti od koncentracije, ni pa bilo statistično značilnih razlik v primerjavi s kontrolo. Pri oblečenih delcih pa so vrednosti presegale 100 %.

Rahlo večji vpliv na viabilnost in proliferacijo celic smo opazili pri neoblečeni delcih, pri vrednostih pa s primerjavo z neoblečenimi delci, ni prišlo do statistično značilnih razlik pri nobenem od testov in koncentracij. Glede na test BCA se je na miligram nanodelcev vezalo 0,0046 mg BSA, nanodelci primarna velikost delcev SiO₂ je bila 100 in 250 nm, v vodni suspenziji pa so se aglomerirali v 300-600 nm velike skupke. Tvorba skupkov nanodelcev pomeni, da so celice realno izpostavljene nižji koncentraciji, kot je bila dodana (Horie in sod., 2014).

Yang in sodelavci (2017) so ob izpostavljenosti celic SH-SY5Y ND SiO₂ v koncentracijah od 6,25 do 50 µg/mL, opazili poškodbe celične membrane, povečanje količine kalcija v okolici ter apoptozo celic. Horie in sod. (2014) so izmerili mitohondrijsko aktivnost celic po izpostavitvi različnim koncentracijam 10-1000 µg/ml SiO₂ nanodelcev in ugotovili, da tudi najvišja koncentracija delcev nima močnega učinka na mitohondrijsko aktivnost. Lesniak in sodelavci (2012) so preverjali stopnjo privzema SiO₂ nanodelcev v celice v gojišču brez seruma ter gojišču s serumom. Privzem nanodelcev v celice je bil veliko višji pri pogojih brez seruma.

5.3 VPLIV SREBROVIH NANODELCEV – Ag NA CELICE SH-SY5Y

Dva glavna mehanizma s pomočjo katerih nanodelci Ag povzročajo citotoksičnost sta nastanek ROS in s tem posledično indukcija oksidativnega stresa ter odtapljanje ionov Ag⁺ od nanodelcev, ki potem sprožijo učinek (Ahmed Riaz in sod., 2016).

Pri našem delu smo uporabili nanodelce s primarno velikostjo med 50 in 100 nm, ta je bila določena s pomočjo TEM. Z višanjem koncentracije nanodelcev Ag, smo pri testih citotoksičnosti opazili upad metabolne aktivnosti celic ter stabilnosti lizosomov v odvisnosti od koncentracije. Za oba tretmaja – obleče in neoblečene delce, je bil ta upad primerljiv. Pri koncentraciji 50 µg/ml je na primer vrednost metabolne aktivnosti celic za oblečene delce znašala 85 % negativne kontrole, pri enaki koncentraciji in tretmaju pa je bila stabilnost lizosomov 82 %, vrednosti neoblečenih delcev so se gibale zelo blizu vrednosti oblečenih.

Razlika pa se je pojavila ob primerjavi testa z resazurin in nevtralnno rdečim. Pri primerjavi testov z resazurinom in NR smo vpliv na metabolno aktivnost celic opazili pri koncentraciji 10 µg/ml, medtem ko je vpliv na stabilnost lizosomov poznal komaj pri koncentraciji 50 µg/ml. Iz tega sklepamo, da je do poškodb, ki so ogrozile viabilnost celic, prišlo pri nižjih koncentracijah, medtem ko so bili lizosomi poškodovani komaj pri višjih koncentracijah delcev. Ahmed Riaz in sodelavci (2016) navajajo, da se nanodelci Ag internalizirajo s

pomočjo endocitoze, receptorsko posredovanega signaliziranja, ioni pa naj bi prehajali v celico ob odtapljanju ionov ob celični membrani. Po privzemu se nanodelci prenesejo na tarčne organele – predvsem mitohondrije in jedro celice, kjer citotoksične učinke povzročajo povečanjem oksidativnega stresa, napak v delovanju mitohondrijev in poškodb DNA. V tej literaturi neposredno delovanje Ag delcev na lizosome ni omenjeno.

Pri testu z barvilom CBB smo s pomočjo količine vezanega barvila na proteine razbrali vsebnost proteinov v vzorcu, ta vrednost pa korelira s številom viabilnih celic v vzorcu, o številu viabilnih celic v vzorcu pa lahko sklepamo tudi iz test z resazurinom. Rezultati teh dveh testov so se razlikovali. Pri testu CBB so vrednosti za oblečene delce naraščale z višjo koncentracijo, kar je obratno od pričakovanega. Za neoblečene delce so bile vrednosti vsebnosti proteinov prav tako nižje kot pri testu z resazurinom, izstopala pa je vrednosti pri 10 mg/ml nanodelcev (Slika 7), prav tako pri testu CBB opazili večje standardne odklone. Možna razlaga za rezultate je interferenca srebrovih nanodelcev z metodo. Srebrovi nanodelci lahko absorbirajo vpadno svetlobo ali pa jo razpršijo, kar lahko privede do lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov pri meritvah absorbance in fluorescence (Ahmed Riaz in sod., 2016). O interferenci so poročali tudi Mello in sodelavci (2020), ki so navedli, da lahko nekateri srebrovi nanodelci pri testiranju z barvilom NR znižajo signal, pri barvilu resazurin pa je bila interferenca testiranih srebrovih nanodelcev zanemarljiva.

Rezultati za vse tri teste so bili primerljivi za oblečene in neoblečene srebrove nanodelce, opazili smo samo eno statistično značilno razliko med oblečenimi in neoblečenimi delci, v primeru, ko je bila vrednost stabilnosti lizosomov za neoblečene delce presegla 100 %. Iz tega lahko sklepamo, da srebrovi delci oblečeni v proteine BCA v povprečju niso bili bolj ali manj citotoksični kot delci brez predhodno ustvarjene korone.

Shannahan in sodelavci (2015), ki so primerjali vpliv korone, ustvarjene iz različnih proteinov na citotoksičnost, so ugotovili, da tvorba korone zmanjša površinski naboj, zaradi česar se zmanjša privzem nanodelcev v celice. Pri oblečenih nanodelcih so opazili zmanjšano citotoksičnost pri višjih koncentracijah (25 in 50 $\mu\text{g/ml}$). Naši rezultati se ne skladajo z literaturo, saj smo pri testiranjih opazili približno enak citotoksičen učinek delcev obeh tretmajev. Za razliko je več možnih razlag. S testom BCA smo določili, da se je na srebrove nanodelce vezalo 0,001 mg proteinov/mg nanodelcev, kar je najnižja vrednost od vseh testiranih nanodelcev. Mogoče je, da se korona ni ustvarila v tolikšni meri, in zaradi tega ni imela močnega vpliva na rezultate v primerjavi z neoblečenimi delci. Upoštevati moramo tudi, da so Shannahan in sodelavci (2015) citotoksičnost določali po 3 in 6 urah od inkubacije celic z nanodelci, medtem ko smo mi teste citotoksičnosti izvajali po 24 urah. Rezultati spektralne analize Shannahan in sodelavci (2015) po vnosu oblečenih nanodelcev v celice nakazujejo na izgubo proteinske korone, sproščanje srebrovih ionov pa se po izgubi korone poveča. Tretja možnost je že omenjena interferenca nanodelcev z metodo, ki bi lahko zakrila razlike med tretmajema.

5.4 VPLIV NANODELCEV BAKROVEGA OKSIDA – CuO NA CELICE SH-SY5Y

Nanodelci bakrovega oksida so znižali metabolno aktivnost ter stabilnost lizosomov v celicah, negativno pa so vplivali tudi na število proteinov v vzorcih, s tem pa torej na število viabilnih celic. Citotoksični učinki so se višali v odvisnosti od koncentracije nanodelcev.

Nanodelci bakrovega oksida so eni od najbolj strupenih kovinskih nanodelcev (Chang in sod., 2012). Njihovo strupeno delovanje izhaja iz tega, da se od delcev odtapljajo Cu^+ ioni prav tako pa lahko sami CuO delci direktno povzročajo oksidativen stres in vnetja, kar povzroča genotoksične in citotoksične učinke. Nanodelci naj bi vplivali tudi na delovanje lizosomov, poškodbe le-teh pa lahko sprožijo celično smrt (Zhang in sod., 2016).

Pri primerjavi neoblečenih bakrovih nanodelcev ter nanodelcev predhodno oblečenih z BSA, opazimo jasno razliko pri vseh treh testih. Pri testih resazurin in NR je jasno razvidno, da so imeli oblečeni nanodelci močnejši kvarni učinek na celice, medtem ko pri testu CBB pri najvišjih dveh koncentracijah opazimo obraten učinek – vpliv neoblečenih delcev je višji (Slika 8). Oblečeni nanodelci so imeli hkrati tudi močnejši vpliv na metabolno aktivnost ter stabilnost na lizosomov že pri manjših koncentracijah kot neoblečeni delci (Slika 8). Predvidevamo, da je do močnejših citotoksičnih učinkov prišlo zaradi povečane endocitoze oblečenih nanodelcev, v primerjavi z neoblečenimi, vendar slednjega nismo potrdili.

Biomolekularna korona poveča privzem teh nanodelcev v celice, saj proteini v koroni z vezavo na receptorje sprožijo endocitozo (Corbo in sod., 2016). Po endocitozi se nanodelci najpogosteje prenesejo v lizosome, Zhang in sodelavci (2017) pa so ob nalaganju bakrovih nanodelcev v lizosome opazili nabrekanje ter agregacijo lizosomov. Rezultati njihove študije nakazujejo še na to, da naj bi kisel pH v lizosomih vplival na povečanje odtapljanja ionov po akumulaciji bakrovih nanodelcev v lizosomih.

Predvidevamo, da je kombinacija teh dejavnikov – povečana endocitoza ter povečano odtapljanje ionov iz nanodelcev – verjetna razlaga za večji kvarni učinek nanodelcev s predhodno ustvarjeno korono. Zraven prej navedenih dejavnikov je na povečan privzem lahko vplival tudi medij. Celice SH-SY5Y so bile zraven delcev inkubirane v gojišču DMEM brez dodatka FBS. Oblečeni nanodelci so imeli v korono vezane proteine, kar so bili tudi edini dodani proteini v okolju teh celic.

5.5 VPLIV NANODELCEV CINKOVEGA OKSIDA – ZnO NA CELICE SH-SY5Y

S testom BCA smo določili, da se je na miligram delcev vezalo 0,051 mg proteinov BSA, povprečna primarna velikost delcev ZnO pa je bila 237 nm. Njihov zeta potencial v vodi je znašal -17 mV. Učinki oblečenih in neoblečenih delcev so se močno razlikovali. Medtem ko neoblečenimi delci niso znižali metabolne aktivnosti celic in stabilnosti lizosomov so imeli oblečeni delci močan vpliv (Slika 9). Vpliv oblečenih nanodelcev je naraščal v odvisnosti od njihove koncentracije, medtem ko sta vrednosti za neoblečene delce pri teh dveh testih

znašali okrog 100 % za vse izmerjene koncentracije. Razlika je bila očitna tudi pri testu CBB s katerim smo izmerili vsebnost proteinov in s tem število viabilnih celic v vzorcu ter njihovo stopnjo proliferacije. Vrednost za oblečene delce je bila tam rahlo višja kot pri drugih testih, vrednosti za neoblečene delce pa so bile rahlo nižje kot pri drugih dveh testih, in sicer okoli 80 %.

Pogosto se pri *in vitro* raziskavah nanodelcev ZnO celična viabilnost zmanjša iz okoli 100 % do skoraj ničle v majhnem razponu koncentracije nanodelcev – krivulja viabilnosti glede na koncentracijo nanodelcev je zelo strma (Vandebriel in De Jong, 2012). To smo opazili tudi pri svojih rezultatih z neoblečenimi delci. Vandebriel in De Jong (2012) nadaljujeta, da je ta pojav najverjetneje posledica visoke topnosti ZnO, zaradi katere se poveša znotrajcelična koncentracija prostih Zn^{2+} . Cink je komponenta mnogih encimov in transkripcijskih faktorjev, motnje znotrajcelične homeostaze cinka pa so povezane z izgubo viabilnost celic, oksidativnim stresom in napakami v delovanju mitohondrijev. Glede na podatke testov z resazurinom in NR, neoblečeni nanodelci niso imeli citotoksičnega vpliva, medtem ko smo s testom CBB zaznali manjši vpliv, oblečeni nanodelci pa so imeli pri enakih koncentracijah močan citotoksični učinek. Predvidevamo, da je vzrok za ta pojav razlika v endocitozi nanodelcev.

Hsiao in Huang, (2013) sta s testom MTT primerjala citotoksičnost nanodelcev ZnO različnih velikosti v gojišču s serumom ali brez seruma in ugotovila, da imajo nanodelci ZnO močnejši citotoksični učinek v gojišču brez seruma. V našem primeru smo imeli samo nanodelce v okolju brez seruma, s tem, da so imeli oblečeni nanodelci predhodno ustvarjeno korono iz BSA. Valdiglesias in sodelavci (2013a) so citotoksičnost nanodelcev ZnO preverjali s testi MTT, LDH ter privzemom barvila NR v gojišču s serumom na celicah SH-SY5Y ter zabeležili, da je učinek nanodelcev odvisen od koncentracije. Pri testu z NR niso opazili interference nanodelcev z metodo. Tudi v našem primeru je prišlo do jasnega učinka, ki je bil odvisen od koncentracije, vendar samo v primeru oblečenih nanodelcev.

Predlagan mehanizem citotoksičnega delovanja ZnO je, da pri odtapljanju ZnO v zunajceličnem okolju, pride do povišane koncentracije Zn^{2+} ionov, kar naj bi pri celicah A549 in BEAS-2B vodilo v povišano znotrajcelično koncentracijo Zn^{2+} . Alternativni predlagan mehanizem citotoksičnosti nanodelcev pa je endocitoza teh nanodelcev in njihovo odtapljanje znotraj celic. Ta mehanizem je bil predlagan pri celicah RKO. V lizosomih pride do odtapljanja ionov iz nanodelcev, nizek pH pa pripomore k razgradnji proteinske korone. To vodi v povečano koncentracijo Zn^{2+} ionov znotraj lizosomov, kar vodi v destabilizacijo lizosomov (Vandebriel in De Jong, 2012). Valdiglesias in sodelavci (2013a) privzema nanodelcev ZnO v celice SH-SY5Y v gojišču s serumom niso opazili.

Hsiao in Huang (2013) sta navedla, še da odtapljanje ionov Zn^{2+} v ekstracelularnem okolju ni vplivalo na citotoksičnost delcev za celice SH-SY5Y v gojišču bodisi z ali pa brez seruma.

Ti rezultati nakazujejo na to, da imajo nanodelci sami v zunajceličnem prostoru večji vpliv na citotoksičnost, kot odtapljanje ionov zunaj celic. Četudi je sproščanje Zn^{2+} ionov v zunajceličnem okolju imelo zanemarljiv vpliv na citotoksičnost teh delcev pa to ne drži nujno za znotrajcelično odtapljanje ionov, ko se delci odtapljajo v kislih okoljih v lizosomih.

Hsiao in Huang (2013s) sta testirala vpliv koncentracije seruma v okolici celic na citotoksičnost nanodelcev ZnO. Navedla sta, da gojišča brez seruma lahko vpliva na rast in hitrost transkripcije v celicah med drugimi pa tudi na fizikalno-kemijske lastnosti nanodelcev, zaradi česar je teste citotoksičnosti nanodelcev smiselno izvajati v gojišču z dodatkom seruma.

Predvidevamo, da je do razlike v učinkih predhodno oblečenih in neoblečnih nanodelcev prišlo zaradi povišane endocitoze predhodno oblečenih nanodelcev, ter povečanega odtapljanja ionov iz predhodno oblečenih nanodelcev v kislem okolju lizosomov.

6 SKLEPI

- *Hipoteza 1: Ker je vpliv nanodelcev na celice odvisen od molekulske korone, predpostavljamo, da bodo predhodno oblečeni delci s proteini in tisti, ki niso bili predhodno oblečeni, drugače vplivali na celice.* Predhodno ustvarjena proteinska korona na nanodelcih (oblečeni ND) je imela pri določenih nanodelcih večji vpliv na metabolno aktivnost celic, stabilnost lizosomov ter viabilnost celic kot pri drugih vrstah nanodelcev. Primerjali smo oblečene in neoblečene nanodelce enake kemijske sestave. Nanodelci s predhodno ustvarjeno korono so imeli pri CuO in ZnO nanodelcih močnejši vpliv na celice, kot nanodelci brez predhodno ustvarjene korone. Nanodelci Ag so prav tako imeli citotoksični učinek na celice, vendar pa je bil vpliv oblečenih in neoblečenih delcev primerljiv. Pri nanodelcih SiO₂ in TiO₂ nismo opazili statistično značilnih razlik med tretmajema. Hipoteza delno drži, saj velja v primerih nanodelcev CuO in ZnO, SiO₂ in TiO₂, ne drži pa v primeru nanodelcev Ag. Vpliv korone je torej v veliki meri odvisen od kemijske sestave ND pa tudi od tipa testa.
- *Hipoteza 2: Razlike v učinku med predhodno oblečenimi in neoblečenimi nanodelci bodo manj izrazite v primeru, ko se iz delcev ne odtapljajo ioni, v primerjavi z delci od katerih se ioni odtapljajo.* Ta hipoteza se delno nanaša že na prejšnjo, kjer smo navedli, da smo zelo izrazite učinke predhodno oblečenih ND v primerjavi z neoblečenimi opazili v primeru nanodelcev ZnO in CuO, od katerih se odtapljajo ioni. Našo hipotezo podpirajo tudi ugotovitve z nanodelci SiO₂ in TiO₂, od katerih se ioni ne odtapljajo, saj v primeru ND SiO₂ in TiO₂ razlik v citotoksičnih učinkih oblečenih in neoblečenih delcev na celice nismo opazili. Pri nanodelcih Ag, od katerih se odtapljajo ioni pa so bili citotoksični učinki nanodelcev sicer vidni, ampak so imeli predhodno neoblečeni in oblečeni delci podoben vpliv. Naša hipoteza zato drži le delno.

7 POVZETEK

V bioloških tekočinah, kot je krvna plazma, se na površino nanodelcev veže sloj proteinov, ki ga imenujemo proteinska korona. Zraven proteinov se na površino nanodelcev adsorbirajo tudi nukleinske kisline, lipidi, sladkorji in majhne molekule, zato se je kasneje začel uporabljati izraz biomolekularna korona (Nienhaus in Nienhaus, 2019). Biomolekularna korona nanodelcem določi novo biološko identiteto, ta pa se lahko močno razlikuje od fizikalno-kemijske identitete nanodelcev, tvorba korone tako spremeni lastnosti nanodelcev (Forest, 2019; Ge in sod., 2015). Interakcije delca z biološkim okoljem po tvorbi korone potekajo z nastalo biomolekularno korono (Forest, 2019; Treuel in Nienhaus, 2012). Prav tako pa so interakcije biomolekul in nanodelcev ter njihov vpliv edinstveni za vrsto nanodelca, zaradi tega vpliva korone ne moremo posplošiti (Ahsan in sod., 2018).

Naš namen je bil preučiti vpliv predhodno ustvarjene biomolekularne korone na nanodelcih na viabilnost in proliferacijo celic. To smo naredili tako, da smo posamezne nanodelce inkubirali s proteini BSA, tako da se je ustvarila proteinska korona, ter jih šele nato dodali k nevroblastomalnim celicam SH-SY5Y v gojišču DMEM brez prisotnosti seruma. Enake nanodelce smo inkubirali v vodi miliQ, da se proteinska korona ni ustvarila, nato pa smo jih dodali k celicam SH-SY5Y v gojišču DMEM brez seruma. Po 24 urah smo izvedli teste citotoksičnosti z rezazurinom, privzemom barvila nevtralnno rdeče in barvilom Coomassie Brilliant Blue.

Pri primerjavi obeh tretmajev – nanodelcev s predhodno ustvarjeno korono in tistih brez nje je imela proteinska korona iz BSA pri nekaterih delcih močnejši vpliv na viabilnost in proliferacijo celic. Razlik med nanodelci obeh tretmajev nismo opazili pri nanodelcih Ag ter vseh treh TiO₂ nanodelcih, pri SiO₂ smo opazili manjšo razliko, ki ni bila statistično značilna. Največje razlike smo opazili pri nanodelcih ZnO in CuO, nanodelcih kovinskih oksidov, od katerih se odtapljajo ioni. Predvidevamo, da je v zadnjih dveh primerih do velike razlike med tretmajema prišlo zaradi povečane endocitoze oblečenih nanodelcev v primerjavi z neoblečenimi, ter povečano odtapljanje ionov iz endocitiranih nanodelcev ZnO in CuO.

Pri našem testiranju je bila tudi verjetnost interference nanodelcev z uporabljenimi metodami. Zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti nanodelcev ter njihove reaktivnosti obstaja visoka možnost interference s pogosto uporabljenimi spektrofotometričnimi in spektrofouometričnimi testi (Ong in sod., 2014). O možnosti interference raznih nanodelcev pri testiranjih z barvili poročajo številne druge raziskave, katerih izsledke smo uporabili v diskusiji (Ahmed Riaz in sod., 2016; Guadagnini in sod., 2015; Mello in sod., 2020).

Vzajemno delovanje med nanodelci in celicami je zapleteno in odvisno od številnih lastnosti vključenih celic, nanodelcev ter pogojev okolja, v katerem se ti srečajo (Nienhaus in Nienhaus, 2019; Forest, 2019; Liu in sod., 2020). Naši rezultati kažejo na to, da imajo

predhodno oblečeni nanodelci ZnO, CuO močnejši citotoksični učinek kot predhodno oblečeni nanodelci TiO₂, SiO₂ in Ag enake koncentracije. Predhodno oblečeni nanodelci ZnO in CuO, od katerih se odtapljajo ioni, pa imajo močnejši kvarni vpliv na celice SH-SY5Y v pogojih z medijem DMEM brez FBS kot predhodno neoblečeni nanodelci enake kemijske sestave. Tega nismo nadaljnjo testirali, predvidevamo pa, da je do teh razlik v učinkih predhodno oblečenimi in neoblečenimi nanodelcev prišlo zaradi olajšane endocitoze predhodno oblečenih nanodelcev.

8 VIRI

- Adjei I. M., Sharma B., Labhasetwar V. 2014. Nanoparticles: Cellular Uptake and Cytotoxicity. V: Nanomaterial. Capco D. G. in Chen Y. (ur.). Dordrecht, Springer: 73-91
- Ahsan S. M., Rao C. M., Ahmad M. F. 2018. Nanoparticle-Protein Interaction: The Significance and Role of Protein Corona. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1048: 175-198
- Akter M., Sikder M. T., Rahman M. M., Ullah A. K. M. A., Hossain K. F. B., Banik S., Hosokawa T., Saito T., Kurasaki M. 2018. A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research*, 9: 1-16
- Aslantürk Ö. S. 2017. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. V: Genotoxicity. A Predictable Risk to Our Actual World. Larramendy, M. L., Soloneski S. (ur.). IntechOpen: 1-17
- Casey A., Herzog E., Davoren M., Lyng F. M., Byrne H. J., Chambers G. 2007. Spectroscopic analysis confirms the interactions between single walled carbon nanotubes and various dyes commonly used to assess cytotoxicity. *Carbon*, 45, 7: 1425-1432
- Chang Y. N., Zhang M., Xia L., Zhang J., Xing G. 2012. The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles. *Materials*, 5, 12: 2850-2871
- Chew A. L., Maibach H. L. 2000. 4. In Vitro Methods to Predict Skin Irritation. V: In Vitro Toxicology. 2nd ed. Gad, S. C. (ur.). New York, Taylor & Francis: 49-61
- Corbo C., Molinaro R., Parodi A., Toledano Furman N. E., Salvatore F., Tasciotti E. 2016. The impact of nanoparticle protein corona on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. *Nanomedicine*, 11, 1: 81-100
- De Matteis V., Rinaldi R. 2018. Toxicity Assessment in the Nanoparticle Era. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1048: 1-19
- Donahue N. D., Acar H., Wilhelm S. 2019. Concepts of nanoparticle cellular uptake, intracellular trafficking, and kinetics in nanomedicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 143: 68-96
- Falahati M., Attar F., Sharifi M., Haertlé T., Berret J. F., Khan R. H., Saboury A. A. 2019. A health concern regarding the protein corona, aggregation and disaggregation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1863, 5: 971-991

- Ferraro S. A., Domingo M. G., Etcheverrito A., Olmedo D. G., Tasat D. R. 2020. Neurotoxicity mediated by oxidative stress caused by titanium dioxide nanoparticles in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 57: 126413, doi: 10.1016/j.jtemb.2019.126413: 8 str.
- Forest V. 2019. Biological Significance of the Nanoparticles Protein Corona. V: *Nanoparticle Protein Corona: Biophysics to Biology*. Kumar, A. in Ddawan, A. (ur.). London, Royal Society of Chemistry: 31-60
- Francia V., Yang K., Deville S., Reker-Smit C., Nelissen I., Salvati, A. 2019. Corona Composition Can Affect the Mechanisms Cells Use to Internalize Nanoparticles. *ACS Nano*, 13, 10: 11107-11121
- Guadagnini R., Halamoda Kenzaoui B., Walker L., Pojana G., Magdolenova Z., Bilanicova D., Saunders M., Juillerat-Jeanneret L., Marcomini A., Huk A., Dusinska M., Fjellsbø L. M., Marano F., Boland S. 2015. Toxicity screenings of nanomaterials: Challenges due to interference with assay processes and components of classic *in vitro* tests. *Nanotoxicology*, 9: 13-24
- Horie M., Nishio K., Kato H., Endoh S., Fujita K., Nakamura A., Hagihara Y., Yoshida Y., Iwahashi H. 2014. Evaluation of cellular effects of silicon dioxide nanoparticles. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 24, 3: 196-203
- Hsiao I. L., Huang Y. J. 2013. Effects of serum on cytotoxicity of nano- and micro-sized ZnO particles. *Journal of Nanoparticle Research: An Interdisciplinary Forum for Nanoscale Science and Technology*, 15, 9: 1829, doi: 10.1007/s11051-013-1829-5: 16 str.
- Istifli E. S., Hüsunet M. T., Ila H.B. 2019. Cell Division, Cytotoxicity, and the Assays Used in the Detection of Cytotoxicity, Cytotoxicity - Definition, Identification, and Cytotoxic Compounds. V: *Cytotoxicity*. Istifli E.S. (ur.). IntechOpen, <https://www.intechopen.com/books/cytotoxicity-definition-identification-and-cytotoxic-compounds/cell-division-cytotoxicity-and-the-assays-used-in-the-detection-of-cytotoxicity> (17. april 2020)
- Kim I. Y., Joachim E., Choi H., Kim K. 2015. Toxicity of silica nanoparticles depends on size, dose, and cell type. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11, 6: 1407-1416
- Kononenko V., Drobne D. 2019. In Vitro Cytotoxicity Evaluation of the Magnéli Phase Titanium Suboxides (Ti_xO_{2x-1}) on A549 Human Lung Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1: 196, doi: 10.3390/ijms20010196: 15 str.

- Kononenko V., Warheit D. B., Drobne D. 2019. Grouping of Poorly Soluble Low (Cyto)Toxic Particles: Example with 15 Selected Nanoparticles and A549 Human Lung Cells. *Nanomaterials*, 704, doi: 10.3390/nano9050704: 14 str.
- Król A., Pomastowski P., Rafińska K., Railean-Plugaru V., Buszewski B. 2017. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249: 37-52
- Lee Y. K., Choi E. J., Webster T. J., Kim S. H., Khang D. 2014. Effect of the protein corona on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. *International Journal of Nanomedicine*, 10: 97-113
- Lesniak A., Fenaroli F., Monopoli M. P., Åberg C., Dawson K. A., Salvati A. 2012. Effects of the Presence or Absence of a Protein Corona on Silica Nanoparticle Uptake and Impact on Cells. *ACS Nano*, 6, 7: 5845-5857
- Lesniak A., Salvati A., Santos-Martinez M. J., Radomski M. W., Dawson K. A., Åberg C. 2013. Nanoparticle Adhesion to the Cell Membrane and Its Effect on Nanoparticle Uptake Efficiency. *Journal of the American Chemical Society*, 135, 4: 1438-1444
- Liu N., Tang M., Ding, J. 2020. The interaction between nanoparticles-protein corona complex and cells and its toxic effect on cells. *Chemosphere*, 245: 125624, doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125624: 19 str.
- Mello D. F., Trevisan R., Rivera N., Geitner N. K., Di Giulio R. T., Wiesner M. R., Hsu-Kim H., Meyer J. N. 2020. Caveats to the use of MTT, neutral red, Hoechst and Resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. *Chemico-Biological Interactions*, 315: 108868, doi: 10.1016/j.cbi.2019.108868: 6 str.
- Monopoli M. P., Walczyk D., Campbell A., Elia G., Lynch I., Baldelli Bombelli F., Dawson K. A. 2011. Physical–Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to *in Vitro* and *in Vivo* Biological Impacts of Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 8: 2525-2534
- Murugadoss S., Lison D., Godderis L., Van Den Brule S., Mast, J., Brassinne F., Sebaihi, N., Hoet P. H. 2017. Toxicology of silica nanoparticles: An update. *Archives of Toxicology*, 91, 9: 2967-3010
- Neufeld B. H., Tapia J. B., Lutzke A., Reynolds M. M. 2018. Small Molecule Interferences in Resazurin and MTT-Based Metabolic Assays in the Absence of Cells. *Analytical Chemistry*, 90, 1: 6867-6876

- Nienhaus K., Nienhaus G. U. 2019. Towards a molecular-level understanding of the protein corona around nanoparticles – Recent advances and persisting challenges. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10: 11-22
- Noble J. E., Bailey M. J. A. 2009. Chapter 8 Quantitation of Protein. V: *Methods in Enzymology*. Burgess, R. R., Deutscher M.P. (ur.). Academic Press, 463: 73-95
- Ong K. J., MacCormack T. J., Clark R. J., Ede J. D., Ortega V. A., Felix L. C., Dang M. K. M., Ma G., Fenniri H., Veinot J. G. C., Goss G. G. 2014. Widespread Nanoparticle-Assay Interference: Implications for Nanotoxicity Testing. *PLoS ONE* 9, 3: e90650, doi: 10.1371/journal.pone.0090650: 9 str.
- Pozzi D., Caracciolo, G., Digiacomio, L., Colapicchioni, V., Palchetti, S., Capriotti, A. L., Cavaliere C., Zenezini Chiozzi R., Puglisi A., Laganà A. 2015. The biomolecular corona of nanoparticles in circulating biological media. *Nanoscale*, 7, 33: 13958-13966
- Rahman M., Laurent S., Tawil N., Yahia L., Mahmoudi M. 2013. *Protein-Nanoparticle Interactions*. (Springer Series in Biophysics, 15). Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 86 str.
- Repetto G., Peso A., del Zurita J. L. 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Protocols*, 3, 7: 1125-1131
- Riaz Ahmed K. B., Nagy A. M., Brown R. P., Zhang Q., Malghan, S. G., Goering, P. L. 2017. Silver nanoparticles: Significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of *in vitro* cytotoxicity studies. *Toxicology in Vitro*, 38: 179-192
- Riediker M., Zink D., Kreyling W., Oberdörster G., Elder A., Graham U., Lynch I., Duschl A., Ichihara G., Ichihara S., Kobayashi T., Hisanaga N., Umezawa M., Cheng T. J., Handy R., Gulumian M., Tinkle S., Cassee F. 2019. Particle toxicology and health—Where are we? *Particle and Fibre Toxicology*, 16. doi: 10.1186/s12989-019-0302-8: 33 str.
- Shah J. in Singh S. 2019. Nanoparticle-Protein Corona Complex: Composition, Kinetics, Physico-Chemical Characterization, and Impact on Biomedical Applications. V: *Nanoparticle Protein Corona: Biophysics to Biology*. Kumar, A. in Ddawan, A. (ur.). London, Royal Society of Chemistry: 1-30
- Shakeel M., Jabeen F., Shabbir S., Asghar M. S., Khan M. S., Chaudhry A. S. 2016. Toxicity of Nano-Titanium Dioxide (TiO₂-NP) Through Various Routes of Exposure: A Review. *Biological Trace Element Research*, 172, 1: 1-36
- Shannahan J. 2017. The biocorona: A challenge for the biomedical application of nanoparticles. *Nanotechnology Reviews*, 6, 4: doi: 10.1515/ntrev-2016-0098: 10 str.

- Shannahan J. H., Podila R., Aldossari A. A., Emerson H., Powell B. A., Ke P. C., Rao A. M., Brown J. M. 2015. Formation of a Protein Corona on Silver Nanoparticles Mediates Cellular Toxicity via Scavenger Receptors. *Toxicological Sciences*, 143, 1: 136-146
- Shi H., Magaye R., Castranova V., Zhao J. 2013. Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology*, 10, 15: doi: 10.1186/1743-8977-10-15: 33 str.
- Tenzer S., Docter D., Kuharev J., Musyanovych A., Fetz V., Hecht R., Schlenk F., Fischer D., Kiuopstsi K., Reinhardt C., Landfester K., Schild H., Maskos M., Knauer S. K., Stauber R. H. 2013. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nature Nanotechnology*, 8, 10: 772-781
- Thermo Scientific™. Pierce™ BCA Protein Assay Kit. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225#/23225> (5. feb. 2020)
- Treuel L., Nienhaus G. U. 2012. Toward a molecular understanding of nanoparticle–protein interactions. *Biophysical Reviews*, 4, 2: 137-147
- Valdiglesias V., Costa C., Kiliç G., Costa S., Pásaro E., Laffon B., Teixeira J. P. 2013a. Neuronal cytotoxicity and genotoxicity induced by zinc oxide nanoparticles. *Environment International*, 55: 92-100
- Valdiglesias V., Costa C., Sharma V., Kiliç G., Pásaro E., Teixeira J. P., Dhawan A., Laffon B. 2013b. Comparative study on effects of two different types of titanium dioxide nanoparticles on human neuronal cells. *Food and Chemical Toxicology*, 57: 352-361
- Vandebriel R. J., De Jong W. H. 2012. A review of mammalian toxicity of ZnO nanoparticles. *Nanotechnology, Science and Applications*, 5: 61-71
- Xie H.R., Hu L.S., Li G.Y. 2010. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: In vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chinese Medical Journal*, 123 8: 1086-1092
- Yang Y., Yu Y., Wang J., Li Y., Li Y., Wei J., Zheng T., Jin M., Sun Z. 2017. Silica nanoparticles induced intrinsic apoptosis in neuroblastoma SH-SY5Y cells via CytC/Apaf-1 pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 52: 161-169
- Zanganeh S., Spitler R., Erfanzadeh M., Alkilany A. M., Mahmoudi M. 2016. Protein corona: Opportunities and challenges. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 75: 143-147
- Zeng L., Gao J., Liu Y., Gao J., Yao L., Yang X., Liu X., He B., Hu L., Shi J., Song M., Qu G., Jiang G. 2019. Role of protein corona in the biological effect of nanomaterials: Investigating methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118: 303-314

Zhang X.F., Liu Z.G., Shen W., Gurunathan S. 2016. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 9: 1534, doi: 10.3390/ijms17091534: 34 str.

Zhdanov V. P. 2019. Formation of a protein corona around nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 41: 95-103

Zoroddu M. A., Medici S., Ledda A., Nurchi V. M., Lachowicz J. I., Peana M. 2014. Toxicity of nanoparticles. *Current Medicinal Chemistry*, 21, 33: 3837-3853

ZAHVALA

Za strokovno pomoč, vodenje, svetovanje in spodbudo se zahvaljujem svoji mentorici prof. dr. Damjani Drobne. Dr. Venu Kononenku se zahvaljujem za pomoč pri praktičnem delu in rezultatih ter nasvetih pri pisanju. Zahvaljujem se tudi recenzentki doc. dr. Aniti Jemec Kokalj za pomoč pri izdelavi dela.

Za podporo in potrpežljivost se zahvaljujem tudi svojim staršem in družini. Za motivacijo, podporo ter zagon hvala fantu Luki, za moralno podporo pa hvala še prijateljicam Anji, Tjaši in Karin, s katerimi smo se skupaj prebijale skozi pisanje magistrskih nalog. Hvala tudi prijateljem Ivi, Janji, Kristianu, Barbari in Patriciji, ter vsem, ki jih nisem omenila poimensko, da so vame verjeli in mi pomagali.