

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA ELEKTROTEHNIKO

Barbara DRAŠLER

**INTERAKCIJE RAZLIČNIH NANOMATERIALOV Z UMETNIMI
IN BIOLOŠKIMI LIPIDNIMI MEMBRANAMI**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Mentorica: prof. dr. Damjana DROBNE
Somentorica: prof. dr. Kristina SEPČIĆ

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA ELEKTROTEHNIKO

Barbara DRAŠLER

**INTERACTIONS OF DIFFERENT NANOMATERIALS WITH
ARTIFICIAL AND BIOLOGICAL LIPID MEMBRANES**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: prof. dr. Damjana DROBNE
Co-supervisor: prof. dr. Kristina SEPČIĆ

Ljubljana, 2014

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dd
DK	591:620.3:611(043.3)=163.6
KG	nanomateriali/primarna oblika/lastnosti površine/fosfolipidni vezikli/ človeški eritrociti/acetilholinesteraze/kationski nanodelci/lizosomi
AV	DRAŠLER, Barbara
SA	DROBNE, Damjana (mentorica)/SEPČIĆ, Kristina (somentorica)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Tržaška cesta 25
ZA	Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko
LI	2014
IN	INTERAKCIJE RAZLIČNIH NANOMATERIALOV Z UMETNIMI IN BIOLOŠKIMI LIPIDNIMI MEMBRANAMI
TD	Doktorska disertacija
OP	XI, 111 str., 6 pregl., 26 sl., 3 pril., 258 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V doktorskem delu smo proučevali vpliv nanomaterialov (NM) z različno kemijsko sestavo, primarnimi oblikami in lastnostmi površine. Kot modelne sisteme smo uporabili umetne in biološke membrane, aktivnost encimov acetilholinesteraz ter celične kulture <i>in vitro</i>. Na izoliranem sistemu fosfolipidnih veziklov, membranah eritrocitov in na acetilholinesterazah smo pokazali od primarne oblike odvisen vpliv ogljikovih NM; aglomerati amorfnega ogljika ali ploščice grafenovega oksida so povzročili bolj izrazit odziv v primerjavi s fulereni C₆₀ ali večslojnimi ogljikovimi nanocevkami. Zabeležili smo od lastnosti površin odvisen vpliv nanodelcev (ND) kobaltovega ferita: ND z adsorbirano citronsko kislino so povzročili pokanje unilamelarnih in razbitje multilamelarnih veziklov ter bolj izrazito spremembo oblik eritrocitov v primerjavi s površinsko neobdelanimi ND. Rezultati poskusov na umetnih in bioloških membranah so pokazali na skoraj zanemarljiv vpliv ND železovega oksida, ki se tudi ni razlikoval med ND z različno površino. Zabeležili smo odsotnost povezave med količino površinsko vezanih aminoskupin na polistirenskih ND in kvarnim učinkom na celične linije <i>in vitro</i>. Najizrazitejši vpliv in največje razlike med ND z različno površino (z vezanimi aminoskupinami ali trimetilamonijevimi skupinami) smo zabeležili na nivoju lizosomov (znotrajcelične lizosomalne membrane). Zaključujemo, da primarna oblika in lastnosti površine NM narekujejo lastnosti NM, ki se oblikujejo v suspenziji ali v bioloških medijih (aglomeracija, oplaščenje z biološkimi molekulami), in te ključno vplivajo na interakcijo NM z biološkimi sistemi.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dd
DC	591:620.3:611(043.3)=163.6 nanomaterials/primary shape/surface characteristics/phospholipid
CX	vesicles /human erythrocytes/acetylcholinesterase/cationic nanoparticles/lysosomes
AU	DRAŠLER, Barbara
AA	DROBNE, Damjana (supervisor)/ SEPČIČ, Kristina (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Tržaška cesta 25
PB	University of Ljubljana, Faculty of electrical engineering
PY	2014
TI	INTERACTIONS OF DIFFERENT NANOMATERIALS WITH ARTIFICIAL AND BIOLOGICAL LIPID MEMBRANES
DT	Doctoral dissertation
NO	XI, 111 p., 6 tab., 26 fig., 3 ann., 258 ref.
LA	sl sl/en
AL	We investigated the effect of nanomaterials (NMs) with different chemical composition, primary shapes and surface properties on artificial and biological membrane model systems, activities of enzyme acetylcholinesterase and <i>in vitro</i> cell cultures. Experiments with isolated phospholipids, human red blood cells and enzymatic tests showed primary shape-dependent effect of carbon NM; carbon black agglomerates or graphene oxide platelets caused more pronounced effect than fullerenes C ₆₀ or multiwalled carbon nanotubes. We observed different effect of surface modified cobalt ferrite nanoparticles (NPs): citric acid-adsorbed NPs caused bursting of artificial phospholipid vesicles and rupture of multilamellar liposomes, and more pronounced shape alterations of erythrocytes in comparison to bare NPs. Results on artificial and biological membranes showed almost negligible effect of iron oxide NPs; there was no significant difference between the NPs with different surface characteristics. No clear relationship between the amount of surface-bound amino groups on polystyrene NPs and deleterious effects on <i>in vitro</i> cell lines was observed; the effect on the lysosomal level appeared to be the most distinguished parameter between the NPs with different surface characteristics and the early cell response to NM. We conclude that the primary shape and NM surface affect NM and agglomerates characteristics in suspension or biological medium (NM agglomeration, corona formation), and that those are the main factors governing NM-membrane interactions.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	I
KEY WORDS DOCUMENTATION	II
KAZALO VSEBINE	III
KAZALO SLIK	VII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 OPREDELITEV PROBLEMA IN HIPOTEZE.....	1
1.1 NAMEN IN HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NANOZNANOSTI IN NANOTEHNOLOGIJA	3
2.2 LASTNOSTI NANOMATERIALOV IN NJHOVA BIOLOŠKA REAKTIVNOST	3
2.2.1 Proteinska korona na površini nanomaterialov	3
2.2.2 Problem aglomeracije ali agregacije nanomaterialov	4
2.2.3 Površinska reaktivnost nanomaterialov	4
2.2.4 Različna oblika nanomaterialov	5
2.3 NANOMATERIALI, UPORABLJENI V DOKTORSKI NALOGI	6
2.3.1 Magnetni nanomateriali.....	6
2.3.2 Ogljikovi nanomateriali	7
2.4 INTERAKCIJE NANOMATERIALOV Z BIOLOŠKIMI SISTEMI	11
2.5 VREDNOTENJE INTERAKCIJE NANOMATERIALOV Z UMETNIMI MEMBRANAMI.....	12
2.5.1 Fosfolipidni vezikli.....	12
2.5.2 Metode za spremljanje lastnosti fosfolipidnih membran.....	13
2.5.3 Izpostavljene lastnosti membranskih fosfolipidov	15
2.6 VREDNOTENJE INTERAKCIJE NANOMATERIALOV Z BIOLOŠKIMI MEMBRANAMI ERITROCITOV	16
2.6.1 Spremembe morfologije eritrocitov	16
2.6.2 Mikrovezikulacija.....	17

2.7 VREDNOTENJE VPLIVA NANOMATERIALOV NA BELJAKOVINE: ENCIMI ACETILHOLINESTERAZE.....	17
2.8 VEČPARAMETRSKO VREDNOTENJE KVARNEGA UČINKA NANOMATERIALOV: CELIČNE KULTURE IN VITRO	18
2.8.1 Lizosomi in nanomateriali	18
2.8.2 Lamelarna telesca	19
3 MATERIALI IN METODE	20
3.1 NANOMATERIALI, UPORABLJENI V ŠTUDIJI.....	20
3.2 SHEMA IZVEDBE POSKUSOV	20
3.3 ANALIZE UMETNIH FOSFOLIPIDNIH MEMBRAN.....	22
3.3.1 Svetlobna fazno-kontrastna mikroskopija	22
3.3.2 Sipanje X-žarkov pod majhnim kotom	24
3.3.3 Fluorescenčna spektrofotometrija	26
3.3.4 Diferenčna dinamična kalorimetrija	27
3.4 ANALIZE BIOLOŠKIH MEMBRAN.....	28
3.4.1 Vrednotenje sprememb membran človeških eritrocitov	28
3.5 ENCIMSKI TESTI: TESTIRANJE VPLIVA OGLJIKOVIH NANOMATERIALOV NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZ	30
3.5.1 Določanje inhibicije encima in adsorpcije acetilholinesteraze na nanomateriala	30
3.6 CELIČNE METODE <i>IN VITRO</i>	31
3.6.1 Večparametrsko vrednotenje kvarnih učinkov nanodelcev PS-NH ₂ in PS-N(CH ₃) ₃ na celične kulture <i>in vitro</i>	31
4 REZULTATI.....	33
4.1 LASTNOSTI IZBRANIH NANOMATERIALOV	33
4.1.1 Suspenzije nanodelcev CoFe ₂ O ₄ ali CoFe ₂ O ₄ -CA	33
Suspenzije nanodelcev Fe ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃ -Si, Fe ₂ O ₃ -Si-COOH ali Fe ₂ O ₃ -Si-NH ₂	35
4.1.2 Ogljikovi nanomateriali	36
4.1.3 Ploščice grafenovega oksida.....	38
4.1.4 Večplastne ogljikove nanocevke	39
4.1.5 Polistirenski nanodelci	40

4.2 VPLIV NANOMATERIALOV NA SPREMEMBE UMETNIH FOSFOLIPIDNIH MEMBRAN	41
4.2.1 Vpliv nanomaterialov na orjaške unilamelarne vezikle.....	41
4.2.2 Vpliv nanomaterialov na multilamelarne vezikle.....	47
4.2.3 Vpliv nanomaterialov na fluidnost membran unilamelarnih veziklov.....	52
4.2.4 Vpliv nanomaterialov na toplotni profil multilamelarnih veziklov	53
4.3 VPLIV NANOMATERIALOV NA BIOLOŠKE MEMBRANE.....	55
4.3.1 Vpliv nanomaterialov na morfološke spremembe človeških eritrocitov	55
4.3.2 Mikrovezikulacija eritrocitnih membran.....	57
4.4 VPLIV OGLJIKOVIH NANOMATERIALOV NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZ	58
4.4.1 Inhibicija in adsorpcija ribje acetilholinesteraze na NM.....	58
4.4.2 Inhibicija in adsorpcija acetilholinesteraze iz človeških eritrocitov na NM	59
4.4.3 Primerjava vpliva NM na vretenčarsko in nevretenčarsko acetilholinesterazo	60
4.5 KVARNI UČINKI POLISTIRENSKIH NANODELCEV NA CELIČNE KULTURE	61
4.5.1 Kvarni učinki PS-NH ₂ (z različno količino aminoskupin na površini).....	61
4.5.2 Kvarni učinki PS-N(CH ₃) ₃ (s stalnim pozitivnim površinskim nabojem)	62
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	64
5.1 RAZPRAVA.....	64
5.1.1 Vpliv nanomaterialov različnih primarnih oblik	64
5.1.2 Vpliv površinskih lastnosti nanomaterialov	74
5.1.3 Kvarni učinki kationskih nanodelcev na celične kulture <i>in vitro</i>	81
5.1.4 Vpliv nanomaterialov na lipidni metabolizem.....	83
5.1.5 Skupni predpostavljeni mehanizem vpliva nanomaterialov na membrane....	85
5.2 SKLEPI.....	87
6 POVZETEK (SUMMARY).....	89
6.1 POVZETEK	89
6.2 SUMMARY	91
7 PRISPEVEK AVTORICE K DOKTORSKEMU DELU	93
8 VIRI	95

ZAHVALA

PRILOGE

Priloga A: MATERIALI IN METODE.....A1

PRILOGA B: REZULTATI IN RAZLAGA B1

PRILOGA C: Dovoljenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko.....C1

KAZALO SLIK

Slika 1: Splošna shema izvedbe poskusov testiranja vpliva izbranih nanomaterialov na umetne ali biološke modelne sisteme.	21
Slika 2: Prikaz eksperimentalnih kamric za pripravo mikroskopskih preparatov orjaških unilamelarnih veziklov.	23
Slika 3: Posnetek TEM CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$	33
Slika 4: Posnetek TEM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ s 5 nm debelo plastjo silicijevega dioksida na površini.	35
Slika 5: Posnetek TEM skupka C_{60} v agregiranem stanju.	37
Slika 6: Posnetek TEM skupka CB.	38
Slika 7: Posnetek TEM večplastnih ogljikovih nanocevk.	39
Slika 8: Število GUV vseh oblik ali v obliki hrušk po inkubaciji v dH_2O , ZnCl_2 ali suspenziji C_{60}	42
Slika 9: Vpliv inkubacije GUV v suspenziji CB na število, premer in obliko GUV.	43
Slika 10: Vpliv inkubacije GUV v suspenziji CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ na število, premer in obliko GUV.	45
Slika 11: Vpliv inkubacije GUV v suspenziji Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ na število, premer in obliko GUV.	46
Slika 12: Vpliv C_{60} na vzorec sipanja svetlobe SAXS s POPC MLV.	47
Slika 13: Temperaturno odvisni vpliv CB, GO ali C_{60} na razdaljo med lipidnimi dvosloji POPC MLV.	48
Slika 14: Temperaturno odvisni vpliv C_{60} na strukturne parametre POPC MLV.	49
Slika 15: Profil elektronske gostote membran POPC MLV v prisotnosti dH_2O ali C_{60}	50
Slika 16: Vpliv CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ na vzorec sipanja svetlobe SAXS s POPC MLV.	51
Slika 17: Spremembe fluidnosti membrane POPC LUV v prisotnosti CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$	52
Slika 18: Spremembe fluidnosti membrane v prisotnosti Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-NH}_2$	53
Slika 19: Vpliv CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$, Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$, CB ali C_{60} na toplotni profil DPPC MLV.	54
Slika 20: Vpliv CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ na morfološke spremembe eritrocitov.	55
Slika 21: Vpliv $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ na morfološke spremembe eritrocitov (delež nediskoidnih oblik).	56
Slika 22: Vpliv GO, CB, C_{60} ali MWCNT na morfološke spremembe eritrocitov (delež nediskoidnih oblik).	57

Slika 23: Inhibicija ribje AChE v prisotnosti ogljikovih NM GO, CB, C ₆₀ ali MWCNT..	
.....	58
Slika 24: Inhibicija AChE iz človeških eritrocitov v prisotnosti ogljikovih NM GO, CB, C ₆₀ ali MWCNT ter adsorpcija encima na NM.	59
Slika 25: Primerjava vpliva CB in GO na nevretenčarski (žuželčja AChE) in vretenčarski (ribja AChE) encim	60
Slika 26: Predpostavljeni mehanizmi vpliva nanomaterialov in njihovih aglomeratov na umetne ali biološke membrane.	86

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Okvirne vrednosti ζ -potenciala suspenzij ND CoFe ₂ O ₄ in CoFe ₂ O ₄ -CA v dH ₂ O, 10 mM pufru HEPES, 0,3 M raztopini glukoze in PBS-citratnem pufru.....	34
Preglednica 2: Okvirne vrednosti ζ -potenciala suspenzij ND in hidrodinamskega polmera Fe ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃ -Si, Fe ₂ O ₃ -Si-COOH in Fe ₂ O ₃ -Si-NH ₂ v dH ₂ O, 10 mM pufru HEPES in PBS-citratnem pufru	36
Preglednica 3: Primerjava okvirne vrednosti ζ -potenciala in hidrodinamskih premerov ogljikovih NM C ₆₀ , CB, GO, MWCNT	39
Preglednica 4: Izmerjene velikosti TEM, okvirne vrednosti hidrodinamskega premera in ζ -potenciala suspenzij ND PS	40
Preglednica 5: Povzetek vpliva testiranih polistirenskih nanodelcev na izbrane celične linije: astrocite, celice pljučnega epitelija in hepatocite	62
Preglednica 6: Povzetek vpliva izbranih NM na umetne membrane (POPC SUV, LUV ali GUV, POPC ali DPPC MLV), encime (ribja AChE in AChE iz človeških eritrocitov) in membrane človeških eritrocitov	63

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AAS – atomska absorpcijska spektrometrija
AChE – acetilholinesteraza
BCC – koncept sklopljenega delovanja dvoslojev (membranskih) (ang. *bilayer couple concept*)
C₆₀ – molekule fulerenov C₆₀
CA – citronska kislina (ang. *citric acid*)
CB – amorfni ogljik (ang. *carbon black*)
CHCl₃ – kloroform
CNT – ogljikove nanocevke (ang. *carbon nanotubes*)
CoFe₂O₄ – nanodelci kobaltovega ferita
CoFe₂O₄-CA – nanodelci kobaltovega ferita z adsorbirano citronsko kislino
DLS – dinamično sipanje svetlobe (ang. *dynamic light scattering*)
DMSO – dimetilsulfoksid
DPH – 6-difenil-1,3,5-heksatrien, nepolarna fluorescenčna sonda
DPPC – dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin
DSC – diferenčna dinamična kalorimetrija (ang. *differential scanning calorimetry*)
DWCNT – dvoslojne ploščice ogljikovih nanocevk (ang. *double-walled carbon nanotubes*)
EC50 – polovična vrednost maksimalne efektivne koncentracije
EDS – energijska disperzija X-žarkov
Fe₂O₃ ali γ -Fe₂O₃ – nanodelci železovega oksida
Fe₂O₃-Si – nanodelci γ -Fe₂O₃ s tanko plastjo silicijevega dioksida na površini
Fe₂O₃-Si-COOH – nanodelci γ -Fe₂O₃ s tanko plastjo silicijevega dioksida in z vezanimi molekulami s karboksilnimi skupinami (–COOH)
Fe₂O₃-Si-NH₂ – nanodelci γ -Fe₂O₃ s tanko plastjo silicijevega dioksida in z vezanimi molekulami z aminoskupinami (–NH₂)
GO – ploščice grafenovega oksida
GUV – orjaški unilamelarni vezikel/vezikli (ang. *giant unilamellar vesicle*)
HCA – večparametrna analiza populacij celic (ang. *high content screening analysis*)
IC50 – polovična vrednost maksimalne inhibitorne koncentracije
K1, K2, K3 – preliminarni kontrolni poskusi pri metodi na orjaških unilamelarnih veziklih
LUV – veliki unilamelarni vezikel/vezikli (ang. *large unilamellar vesicle*)
MLV – multilamelarni vezikel/vezikli (ang. *multilamellar vesicle*)
MWCNT – večplastne ogljikove nanocevke (ang. *multi-walled carbon nanotubes*)
ND – nanodelec/nanodelci
NM – nanomaterial/nanomateriali

POPC – 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3 fosfatidilholin

PS – polistiren, polistirenski nanodelci

PS-COOH – nanodelci polistirena s karboksilnimi skupinami (–COOH)

PS-N(CH₃)₃ – nanodelci polistirena s trimetilamonijevimi skupinami ((–NCH₃)₃)

PS-NH₂ – nanodelci polistirena z aminoskupinami (–NH₂)

PS-NH₂-Bang's – komercialni nanodelci polistirena z aminoskupinami (–NH₂)

SAXS – sipanje X-žarkov pod majhnim kotom (ang. *small angle X-ray scattering*)

SEM – vrstična elektronska mikroskopija (ang. *scanning electron microscopy*)

SWCNT – enoplastne ogljikove nanocevke (ang. *single-walled carbon nanotubes*)

TMA-DPH – trimetilamonij-6-fenil-1,3,5-heksatrien, fluorescenčna sonda, kationski derivat nepolarne DPH

TMRM – tetrametilrodamin metilester

X-žarki – rentgenski žarki

1 OPREDELITEV PROBLEMA IN HIPOTEZE

Nanotehnologije so trenutno med najbolj obetavnimi tehnologijami in v prihodnosti si proizvodov brez vključitve proizvodov nanotehnologij najverjetneje ne bomo mogli predstavljati. Lastnosti nanomaterialov (NM) se dokazano razlikujejo od materialov enake kemijske sestave in večje velikosti, saj se ob zmanjšani velikosti delca poveča število atomov na površini glede na prostornino in tako delci nanometrskih dimenzij postanejo bolj reaktivni (Jefferson, 2000; Verma in Stellacci, 2010). Proizvedene NM že uporabljamo v predmetih za vsakdanjo rabo (športni pripomočki kot antibakterijski agensi), v prihodnosti pa bo njihova uporaba še naraščala predvsem v terapevtske in diagnostične medicinske namene (Lascialfari in Sangregorio, 2011; Naahidi in sod., 2013).

Napredek tehnologij mora iti v korak z raziskavami potencialnih kvarnih učinkov NM na biološke sisteme. Hiter razvoj odpira vedno več možnosti uporabe NM v medicini in farmaciji, kjer morajo NM ustrezati določenim kriterijem, kot je npr. možnost usmerjenega delovanja na tarčne sisteme, biokompatibilnost, obstojnost, v nekaterih primerih tudi biorazgradljivost ali nasprotno, inertnost v stiku z biološkim okoljem. Razumevanje interakcij med NM in celičnimi membranami je posebno pomembno ob potencialni uporabi NM v medicinske namene; ob intravenozni administraciji NM ti pridejo v stik s tarčnimi in netarčnimi celicami, kar lahko vodi v koagulacijo krvi in destabilizacijo membrane okoliških tkiv (De Jong in Borm, 2008).

Splošno sprejeto dejstvo je, da prve interakcije NM z biološkim sistemom nastopijo na celičnih membranah (Verma in Stellacci, 2010), t.j. na plazmalemi ali membranah organelov, neodvisno od načina izpostavitve organizma NM (Banaszak-Holl, 2009). Novo smernico v razumevanju interakcij med NM in biološkimi sistemi je postavil Dawson s sodelavci (2009) na osnovi predpostavke raziskovalne skupine Steva Granicka in sodelavcev (Wang in sod., 2008), in sicer, da so interakcije med NM in biološkimi membranami osnovane na neposrednih fizikalnih interakcijah.

Na interakcije med NM in biološkimi sistemi bistveno vplivajo fizikalno-kemijske lastnosti NM. Poleg osnovnih lastnosti (kemijska sestava, velikost, oblika in lastnosti površine, npr. naboj in hidrofobnost) so pri preverjanju biološkega potenciala NM ključnega pomena sekundarne značilnosti NM, ki se oblikujejo v suspenziji, kot so porazdelitev velikosti NM in njihovih aglomeratov, površinski naboj na dvosloju NM ali aglomeratov ter oplaččenje z biomolekulami (Nel in sod., 2009; Verma in Stellacci, 2010), t.j. vezava beljakovin, lipidov in sladkorjev na površino NM v kompleksnem

biološkem mediju (Cedervall in sod., 2007; Lundqvist in sod., 2008; Monopoli in sod., 2012).

1.1 NAMEN IN HIPOTEZE

Osrednji namen doktorske naloge je bil ugotoviti vpliv različnih oblik NM na biološke membrane. Zanimalo nas je, ali so interakcije med NM in biološkimi membranami izrazitejše, če so NM manjši in okrogle oblike, v primerjavi z daljšimi, ki so nanometrskih velikosti le v eni dimenziji; in kakšen je vpliv NM enakih oblik (npr. sferičnih ND) z različnimi lastnostmi površine na interakcije z biološkimi sistemi.

Velik del študije je potekal na biosenzorskih sistemih z umetnimi fosfolipidnimi membranami, predvsem na orjaških unilamelarnih veziklih. Opažene učinke na umetnih membranah smo želeli preveriti na bioloških celičnih sistemih: a) plazmalemi (zunanji celični membrani) krvnih celic (eritrocitov), b) membranskih proteinih (encimi acetilholinesteraze kot modelni sistem živčnega in krvnega sistema ter dobro uveljavljeni biomarkerji nevrotoksičnosti) ter c) znotrajceličnem membranskem sistemu (lizosomalna membrana).

Hipoteze:

- 1.) Nanomateriali povzročijo spremembe fizikalno-kemijskih lastnosti membran, kar med drugim vodi do spremenjene permeabilnosti membran, razsutja membran, vpliva na tvorbo membranskih veziklov ter na kvarne učinke na celice.
- 2.) Nanomateriali različnih oblik se razlikujejo po biološki reaktivnosti. Predpostavljamo, da so delci v obliki vlaken ali cevok bolj biološko reaktivni kot delci v obliki kristalov ali kroglic. Pri NM iste oblike z različnimi lastnostmi površine pa predvidevamo, da je njihova biološka aktivnost odvisna od lastnosti površine NM.
- 3.) Predvidevamo, da obstaja povezava med učinki NM na umetne membrane in realne biološke membranske sisteme (plazmalema, membranski proteini ter znotrajcelični membranski sistemi).

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANOZNANOSTI IN NANOTEHNOLOGIJA

Nanoznanosti uvrščamo v eno izmed najaktualnejših področij znanstvenih raziskav, saj vključujejo poznavanje lastnosti nanomaterialov (NM), njihovo proizvodnjo in razumevanje interakcij med NM in biološkimi sistemi na molekularnem nivoju, kot tudi na višjih ravneh biološke organizacije. Osrednja značilnost nanoznanosti je prepletanje in nadgradnja različnih, že obstoječih znanstvenih področij, kar ustvarja izrazito interdisciplinarni značaj. Nanotehnologije so trenutno med najbolj obetavnimi tehnologijami s potencialnimi aplikacijami v skoraj vseh vejah gospodarstva. Bistveno doprinesejo k razumevanju pojavov in materialov nanometrskih velikosti ter k proizvodnji in uporabi struktur, naprav in sistemov z novimi lastnostmi in funkcijami, nastalimi kot posledica njihove majhne velikosti (Narducci, 2007).

Nanomateriali lahko nastanejo pri naravnih procesih (izbruhi vulkanov, erozija, vodni aerosoli) ali pa so rezultat človeškega delovanja, kot je izgorevanje biomase in fosilnih goriv, proizvodnja materialov, promet, gradbeništvo itd. V tehnoloških procesih lahko ustvarjamo NM različnih oblik, velikosti, z različnimi lastnostmi površin in iz skoraj vsake kemikalije, vendar običajno uporabljamo NM iz prehodnih kovin, silicijevega dioksida, ogljika (fulereni) in kovinskih oksidov (različni železovi oksidi, cinkov oksid, titanov dioksid idr.) (Naahidi in sod., 2013). Tehnološko proizvedene NM že uporabljamo v predmetih za vsakdanjo rabo, športnih pripomočkih, polprevodnikih, v tekstilni in prehrabni industriji, energetiki, idr., v prihodnosti pa bo uporaba NM še naraščala, predvsem v medicinske diagnostične in terapevtske namene za tarčno dostavo in zdravljenje malignih obolenj (Lascialfari in Sangregorio, 2011; Naahidi in sod., 2013).

2.2 LASTNOSTI NANOMATERIALOV IN NJIHOVA BIOLOŠKA REAKTIVNOST

Največji problem pri bioloških študijah NM je aglomeracija ali agregacija v biološkem okolju in tvorba proteinske korone (Xia in sod., 2011; Walter in sod., 2013).

2.2.1 Proteinska korona na površini nanomaterialov

Izraz *proteinska korona* se uporablja za vezavo proteinov iz plazme na površino proizvedenih NM (Cedervall in sod., 2007; Lundqvist in sod., 2008). Poleg beljakovin se na površino NM vežejo tudi sladkorji in lipidi, torej ne le proteini, ampak celotni sloj na površini NM, ki se oblikuje v kompleksnem biološkem okolju, igra pomembno vlogo pri biološki prepoznavnosti NM (Monopoli in sod., 2012).

2.2.2 Problem aglomeracije ali agregacije nanomaterialov

Povečana površinska reaktivnost NM je lahko zaželena, kadar interakcije NM z biološkimi komponentami načrtujemo (npr. pri tarčno usmerjenem delovanju NM na celice ali v katalizatorjih), lahko pa povzroča kvarne učinke na bioloških sistemih. Od površinskih lastnosti NM je odvisno oblikovanje skupkov NM; ti so lahko v obliki aglomeratov, nastalih s povezavo primarnih delcev s fizikalnimi interakcijami, ali močnejše povezani v bolj kompaktne agregate (Walter, 2013).

2.2.3 Površinska reaktivnost nanomaterialov

Nedavne študije predlagajo, da je glavni mehanizem, ki vodi procesa oblikovanja proteinske korone in aglomeracije NM, povečana reaktivnost NM, ki je odvisna od adsorpcijskega potenciala NM. Opredeljujemo ga s t.i. indeksom adsorpcije na biološke površine (ang. *biological surface adsorption index*, BSAI), ki je odraz realnega stanja aglomeracije v suspenziji in ne konceptualne velikosti NM v očiščeni obliki pred pripravo suspenzij (Xia in sod., 2011). Avtorji izpostavljajo površinske lastnosti NM, ki prispevajo k vrednosti BSAI in s tem vplivajo na interakcijo NM z biološkimi sistemi: hidrofobnost, prisotnost vodikovih vezi, polarnost/polarizabilnost, prisotnost prostih elektronskih parov (Xia in sod., 2011).

2.2.3.1 Lastnosti površin nanomaterialov

Tako za učinkovito uporabo v biomedicini kot tudi za bazične in aplikativne študije interakcij z biološkimi sistemi je glavni pogoj čim boljša disperzija NM v suspenziji in v biološkem okolju; za ta namen se uporablja adsorpcija ali kemijska vezava različnih molekul (npr. citronska kislina ali oleilna kislina) z različnimi funkcionalnimi skupinami na površino NM. Lastnosti skupin ključno vplivajo na oplaščenje NM z biomolekulami, npr. oblikovanje proteinske korone v prisotnosti človeških serumskih proteinov (Monopoli in sod., 2011, 2012) in na posledične interakcije z biološkim sistemom (Safi in sod., 2011; Jedlovsky-Hajdú in sod., 2012; Salvati in sod., 2013). Znano je, da kationska površina v odsotnosti serumskih proteinov močno reagira z biološkimi membranami ter lahko vodi do porušanja membrane (Wang in sod., 2008; Ruenraroengsak in sod., 2012; Wang in sod., 2013a,b) in do celične smrti (Bexiga in sod., 2011; Ruenraroengsak in sod., 2012; Wang in sod. 2013a,b), medtem ko v kompleksnem biološkem okolju proteinska korona lahko zasenči vpliv površinskega naboja (op.:

pozitivnega pri aminoskupinah), zato je interakcija teh NM z liposomi¹ ali celičnimi membranami takrat podobna kot pri neobdelanih in negativno nabitih NM (Salvati in sod., 2011; Wang in sod., 2013a).

2.2.4 Različna oblika nanomaterialov

Poleg površinskih lastnosti, kemijske sestave jedra in velikosti NM je oblika eden izmed glavnih faktorjev, ki vpliva na interakcije NM z membranami (Monticelli in sod. 2009; Schulz, 2012) in drugimi komponentami bioloških sistemov (Park in sod., 2003; Albanese, 2012). Po obliki NM razlikujemo med nanofilmi in nanoploščicami (z eno dimenzijo, manjšo od 100 nm), nanovlakni, nanožicami in nanocevkami (z dvema dimenzijama, manjšima od 100 nm), sferičnimi nanodelci (ND) (s premerom, manjšim od 100 nm), kompozitnimi NM in nanostrukturiranimi površinami (Borm in sod., 2006). Novejše študije potrjujejo, da so interakcije NM z biološkimi sistemi in njihova citotoksičnost v veliki meri povezane z njihovo površinsko reaktivnostjo, manj pa je podatkov o vplivu različnih oblik delcev na njihovo biološko aktivnost (Drobne in Kralj-Iglič, 2009). Računalniške simulacijske študije poročajo o vplivu primarne oblike NM na lipide (Yang in Ma, 2010; Verma in Stellaci, 2010; Schulz, 2012) in oblikovanje proteinske korone (Ramezani, 2014), vendar pri interpretaciji redko upoštevajo obliko NM in aglomeratov, ki nastenjo v suspenziji. Nekatere nanotoksikološke študije nakazujejo na vpliv različnih oblik NM na internalizacijo in njihove kvarne učinke, npr. inhibicijo delovanja ionskih kanalov (Park in sod., 2003). Internalizacija paličasto oblikovanih NM je hitrejša od sferičnih ND (Gratton in sod., 2008), medtem ko, nasprotno, nekateri avtorji poročajo o hitrejši internalizaciji sferičnih ND v primerjavi s paličastimi, kar razlagajo z daljšim časom, potrebnim za ovitje paličasto oblikovanih NM z membrano (Verma in Stellaci, 2010).

2.2.4.1 Posredni vpliv oblike nanomaterialov

Oblika NM lahko vpliva tudi na razlike v mobilnosti in difuziji delcev v plinasti ali tekoči fazi zaradi velikih razlik v hidrodinamskem premeru NM, npr. sferičnih ND v primerjavi s podolgovatimi cevki. Naslednji pomembni vpliv oblike je tudi na velikost oz. površino NM, dostopno za interakcijo z biološkim sistemom. Značilnost majhnih delcev je veliko razmerje med površino in prostornino delca, torej v večjem številu atomov na

¹ Liposom je izraz za umetno pripravljene vezikel, sestavljen iz mešanice fosfolipidov in holesterola, ki se v nadzorovanih pogojih v vodnem okolju oblikuje v sferično strukturo ("liposome." Encyclopædia Britannica Online, 2014). Sestavljen je lahko iz ene ali več membran iz sintetičnih lipidov, lahko pa ga pripravimo z mehansko obdelavo bioloških membran, npr. s sonikacijo (Patil in sod., 2014).

površini glede na prostornino, kar poveča njihovo reaktivnost (npr. preko vpliva na adsorpcijski potencial NM (Xia in sod., 2011; Lynch in sod., 2014). Poleg oblike na interakcijo NM s proteini ali fosfolipidi vpliva tudi nanostrukturiranost površine NM; npr. Roiter in sod. (2008) poročajo, da je prekrivanje NM s fosfolipidi izrazitejše na gladkih površinah (npr. na nanoploščicah v primerjavi z aglomerati ND).

2.3 NANOMATERIALI, UPORABLJENI V DOKTORSKI NALOGI

V doktorski nalogi smo za študije vpliva na membrane izbrali NM, ki se pogosto uporabljajo v različnih študijah kvarnega učinka na biološke sisteme, in/ali NM, primerne za potencialno uporabo v medicinske namene.

2.3.1 Magnetni nanomateriali

Poznavanje interakcij med magnetnimi NM in biološkimi membranami je ključnega pomena za načrtovanje biomedicinskih aplikacij NM (de Planque in sod., 2011), kot so slikanje z magnetno resonanco (ang. *magnetic resonance imaging*, MRI), magnetno-tekočinsko hipertermično uničevanje malignih celic in usmerjeno dostavo učinkovin (Thanh in sod., 2010). Problem, ki se pojavi pri uporabi in študijah magnetnih NM, je močna aglomeracija magnetnih NM v suspenziji ali biološkem okolju, ki je še izrazitejša zaradi magnetnih lastnosti; zato se v študijah pogosto uporabljajo magnetni NM z različnimi površinami (Safi in sod., 2011).

2.3.1.1 Nanodelci kobaltovega ferita

Nanodelci kobaltovega ferita (CoFe_2O_4) so zaradi elektromagnetnih lastnosti eni izmed najpogostejše testiranih magnetnih NM (Grigorova in sod., 1998). Zaradi ustreznih magnetnih lastnosti jih obravnavamo kot potencialno uporabne NM za zdravljenje rakavih celic z magnetno-tekočinsko hipertermijo, ki temelji na povišani temperaturi jedra kobaltovega ferita, inducirani z izmeničnim magnetnim poljem (Verde in sod., 2012). Prav tako so primerni za uporabo v elektrokemijskih produktih kot sestavni deli senzorjev, zvočnih in videotrakovih, pri katalizi, kot pigmenti ali v magnetnih tekočinah (povzeto v Zi in sod., 2009).

Znani so genotoksični vplivi ND CoFe_2O_4 (Colognato in sod., 2007) in visoka stopnja internalizacije v celičnih kulturah *in vitro*, ki vodijo v celično smrt (Marmorato in sod., 2011). Zaradi povečane tvorbe znotrajceličnih lipidnih kapljic v prisotnosti internaliziranih ND avtorji predpostavljajo, da CoFe_2O_4 vplivajo na lipidni metabolizem. Redke študije poročajo o neposredni interakciji CoFe_2O_4 z umetnimi ali biološkimi

membranami (Drašler in sod., 2014). Raziskovalna skupina Nappini in sodelavci (2010, 2011) se ukvarja s študijami kontroliranega sproščanja CoFe_2O_4 z različno površino iz veziklov na podlagi povečanja propustnosti membrane, kar je pomembno pri uporabi ND za tarčno dostavo učinkovin.

2.3.1.2 Nanodelci železovega oksida

Nanodelci železovega oksida (Fe_2O_3 ; z velikostjo posameznega jedra < 20 nm) so zaradi superparamagnetnih² lastnosti predmet intenzivnega proučevanja zaradi potencialne uporabe v medicini, kot so kontrastno sredstvo pri MRI, magnetno-tekočinsko hipertermično zdravljenje in na magnetno polje odzivna tarčna dostava učinkovin (Lien in sod., 2011; Bhattacharya in sod., 2011; Perez-Artacho in sod., 2012; Thomas in sod. 2013; Visscher in sod., 2014).

Pri študijah vpliva magnetnih NM na biološke sisteme je smiselna uporaba večjih koncentracij Fe_2O_3 , saj je pri uporabi ojačitve kontrasta pri MRI treba v telo vnesti okvirno 2,5 mg Fe/kg telesne teže (Bu in sod., 2012), kar vodi v visoke lokalne koncentracije Fe_2O_3 . Nanodelci Fe_2O_3 lahko povzročajo kvarne učinke na celicah (vnetni odziv, oksidativni stres, genotoksičnost), kar se lahko odrazi tudi na celičnih membranah (Safi in sod., 2011; Yang in sod., 2013). Zaradi močnega potenciala za aglomeracijo je treba ND ustrezno spremeniti površinske lastnosti z vezavo molekul z različnimi funkcionalnimi skupinami; vendar ravno prisotnost različnih kemijskih skupin na površini poglavitno vpliva na potencial ND Fe_2O_3 za interakcije z membranami (Safi in sod., 2011; Kralj in sod., 2012).

2.3.2 Ogljikovi nanomateriali

Ogljikovi NM so eni izmed najbolj obetavnih produktov nanotehnologije. Stabilne nanostrukture ogljika se oblikujejo z razvrščanjem ogljikovih atomov v različne geometrijske ravnine. V osnovi ločimo dva osnovna alotropa ogljika, ki se bistveno razlikujeta v fizikalnih lastnostih: skoraj prozoren, neprevoden in zelo trd inertni material (diamant) in mehak, črn in dober prevodnik (grafit). Ostale alotrope ogljika obravnavamo kot ogljikove NM, med katerimi razlikujemo amorfni ogljik (ang. *carbon black*, CB), dvodimenzionalne ploščice grafena (sestavljene ravnine heksagonalno urejenih atomov C), fullerene (sferične, zaprte molekule, sestavljene iz 60 ali več atomov C ter ogljikove

² Superparamagnetizem je poseben tip magnetizma, ki je značilen za majhne delce. Pri superparamagnetnih delcih se magnetni moment termično relaksira; odzovejo se na prisotnost zunanega magnetnega polja, v odsotnosti magnetnega polja pa nimajo magnetnih lastnosti (Mikhaylova in sod., 2004).

nanocevk, ki se oblikujejo s spontanim zvitjem molekul grafena v cevasto strukturo, ter nanovlakna) (Hurt in sod., 2006; Naahidi in sod., 2013).

Različni alotropi ogljika se ne razlikujejo le po primarni obliki, temveč so bistvene tudi lastnosti površine. Kot primer izpostavljamo grafenov oksid (GO), oksidirano obliko grafena; epoksidne in hidroksilne skupine na robovih molekule ustvarijo značilno amifilno naravo molekule (Batzill, 2012), kar poveča reaktivnost molekule v primerjavi s hidrofobnimi molekulami C_{60} ali C_{70} , t.j. atomov C_{60} v obliki zaprte kletke (Bakry in sod., 2007; Park in Ruoff, 2009).

2.3.2.1 Molekula C_{60}

Najstabilnejši in najpogostejše uporabljani fulereni so t.i. *buckminsterfullerene* (molekula C_{60} ; Kroto in sod., 1985). Zaradi lastnosti, kot so majhna velikost (okoli 7 Å), hidrofobnost, tridimenzionalna oblika oz. sferičnost in prazna notranjost, je C_{60} eden izmed najbolj preiskovanih NM za uporabo v medicini, saj struktura v obliki ogljikove kletke omogoča oblikovanje potencialnih diagnostičnih in terapevtskih učinkovin (Bakry in sod., 2007; Farré in sod., 2010; Dellinger in sod., 2013). Edinstvena struktura in kombinacija fotokemičnih, elektrokemičnih in fizikalnih lastnosti omogoča uporabo C_{60} kot lovilce prostih radikalov, antioksidante, kot protivirusne učinkovine in inhibitorje encimov (Bakry in sod., 2007; Kato in sod., 2010; Rossi in sod., 2013; Dellinger in sod., 2013). Poleg tega je skupina raziskovalcev Ikeda in sodelavci predstavila uspešno uporabo umetnih liposomov kot topilo za C_{60} in s tem predstavila nov način vnosa C_{60} v celice (Ikeda in sod., 2005, 2012).

Hkrati ima molekula C_{60} zaradi navedenih lastnosti močan potencial za povzročanje fotodinamične škode na bioloških sistemih (Jensen in sod., 1996; Partha in Conyers, 2009), tudi lipidnih membranah (Oberdoster, 2004; Sayes in sod., 2005). V nedavni študiji so predpostavili (Rossi in sod., 2013), da je vpliv na lipidne membrane ključni dejavnik pri kvarnem učinku C_{60} na biološke sisteme. Na podlagi dostopne literature zaenkrat ni soglasja o mehanizmu toksičnosti C_{60} , vendar se predpostavlja, da je povezana s spremembo integritete in delovanja celičnih membran (Dellinger in sod., 2013). Računalniške simulacijske študije predpostavljajo oblikovanje por v membranah v prisotnosti molekul C_{60} ali manjših skupkov, translokacijo preko membrane ali vgrajevanje v hidrofobni sloj (Chang in Violi, 2006; Qiao in sod., 2007; Wong-Ekkabut in sod., 2008; Monticelli in sod., 2009, Chang in Lee, 2010; Bouropoulos in sod., 2012). Nedavne eksperimentalne študije poročajo o vplivu izvornih C_{60} in njihovih vodotopnih derivatov na spremenjene strukturne in elastične lastnosti lipidnih dvoslojev (Jeng in sod.,

2003, 2005; De Maria in sod., 2006; Chen in Bothun, 2009; Katsamenis in sod., 2009), medtem ko se večji aglomerati najverjetneje na membrane adsorbirajo (Chang in Violi, 2006).

Velik problem pri uporabi fulerenov je slaba topnost v vodnih raztopinah, ki je posledica hidrofobnosti molekule (Ruoff in sod., 1993; Crane in sod., 2008). Z uporabo organskih topil (npr. kloroform ali ogljikov disulfid; Ruoff in sod., 1993) ali s sonikacijo lahko delno ločimo aglomerate, da se oblikujejo manjši skupki molekul C_{60} (Crane in sod., 2008; Spohn in sod., 2009), z vezavo hidrofilnih skupin pa lahko povečamo topnost v polarnih topilih (Jensen in sod., 1996; Da Ros in sod., 1999; Wilson in sod., 2000; Partha in Conyers, 2009), vendar takrat neposredna primerjava vpliva C_{60} z derivati fulerenov, npr. hidrofilnimi fulerenoli $C_{60}(OH)_{36}$, ni mogoča.

2.3.2.2 Ogljikove nanocevice

Ogljikove nanocevice (ang. *carbon nanotubes*, CNT) so alotropi ogljika cevaste strukture (Iijima, 1991). Gradi jih lahko enojna (ang. *single-walled carbon nanotubes*, SWCNT), dvojna (ang. *double-walled carbon nanotubes*, DWCNT) ali večslojna plast grafena (ang. *multi-walled carbon nanotubes*, MWCNT); lahko so odprte ali zaprte, slednje zapira polovična molekula fulerena. Zaradi kombinacije lastnosti, kot so majhna molekulska masa, mehanska trdnost, visoka električna in toplotna prevodnost ter visoka kapaciteta adsorpcije, imajo CNT potencial za uporabo kot biosenzorji, nanobiokatalizatorji, prenašalci zdravil pri biomedicinski aplikaciji in tudi za adsorpcijo in imobilizacijo encimov (Wang in sod., 2009; Zhang in sod., 2013a). Ogljikove nanocevice so lahko oksidirane, lahko imajo vezane aminoskupine ali karboksilne skupine, dolge so lahko nekaj μm ali manjše od enega μm (Meng in sod., 2012, Zhang in sod., 2013a), medtem ko je premer SWCNT običajno med 0,7 in 3 nm (Jorio in sod., 2001), MWCNT pa od 10 do 200 nm (Hou in sod., 2003).

Nedavne študije potrjujejo visok adsorpcijski potencial CNT (Xia in sod., 2011); poročajo o visoki afiniteti SWCNT in MWCNT za vezavo proteinov (Zhang in sod., 2013a), med njimi tudi acetilholinesteraz (Wang in sod., 2009). Številne računalniške simulacijske študije predpostavljajo možnost vsidranja (inkorporacije) CNT v lipidne membrane, kar vpliva na konformacijo in difuzijo posameznih lipidnih molekul znotraj lipidnega dvosloja in posledično na fluidnost celotne membrane; izpostavljajo predvsem njihovo sposobnost prodiranja preko celičnih membran (Li in sod., 2012; Parthasarathi in sod., 2012; Baoukina in sod., 2013; Naahidi in sod., 2013). Zaradi zmožnosti CNT za prodor preko membrane (vsidranje) je testiranje interakcij z lipidnimi membranami in

komponentami krvnega sistema ključnega pomena pri oceni kvarnih učinkov CNT pred klinično uporabo (Meng in sod., 2012), vendar je področje še zelo neraziskano. Ogljikove nanocevice so se adsorbirale na človeške eritrocite, odvisno od velikosti in lastnosti površine (vezava različnih molekul s funkcionalnimi skupinami (npr. karboksilne skupine ali aminoskupine)) (Meng in sod., 2012; Baoukina in sod., 2013).

2.3.2.3 Amorfn ogljik

Amorfn ogljik (ang. *carbon black*, CB) je amorfn alotrop elementarnega ogljika, ki nastane z nepopolnim izgorevanjem katranskih naftnih derivatov. Material je v obliki črnega prahu, ki je sestavljen iz agregatov in delcev v velikostnem razponu od 20 do 300 nm. Amorfn ogljik nastaja v procesih avtomobilske, usnjarske, živilske, farmacevtske idr. industrij. Uporablja se v različnih kemijskih in industrijskih produktih, kot so barvila, premazi, črnila, plastični izdelki, elektrode v baterijah, idr. (Hussain in sod., 2009). Industrijsko obliko saj CB ločimo od ogljikovih saj naravnega izvora, vsebujejo pa tudi organski material in policiklične aromatske ogljikovodike (CAS RN, 2013); njihova struktura je podobna plastem grafita, ki so manjše in niso urejene v kristalno strukturo.

Lastnosti komercialno dostopnega CB so dobro raziskane, zato se v različnih študijah pogosto uporablja kot referenčni (primerjalni) material ali kot modelni sistem za izpušne delce dizelskih goriv (Jackson in sod., 2012). Številne toksikološke študije poročajo o kvarnem učinku delcev CB na nivoju celic (Schara in sod., 2008; Ema in sod., 2013) in celotnega organizma (Yeates in Mauderly, 2001; Colvin, 2003; Vermynen in sod., 2005; Hussain in sod., 2009; Reijnders, 2012). Najverjetnejši stik CB z organizmom je preko dihal, zato se večina študij osredotoča na vpliv CB na respiratorne bolezni, poškodbe pljuč in kardiovaskularne bolezni (Koike in Kobayashi, 2006; Vattanasit in sod., 2014). Zaradi visokega adsorpcijskega potenciala (Xia in sod., 2011) imajo veliko afiniteto vezave na proteine (Mesarič in sod., 2013) in fosfolipide, vendar vpliv CB na umetne ali biološke membrane še ni dobro raziskan.

2.3.2.4 Grafenov oksid

Grafen je aromatska molekula, sestavljena iz obročev s šestimi ogljikovimi atomi, ki nastane z razslojitvijo grafita v posamezne plasti (Geim in Novoselov, 2004). Oksidirane plasti grafena, t.j. ploščice grafenovega oksida (GO), so zaradi epoksidnih in hidroksilnih skupin na površini ter hidroksilnih skupin na robovih amfifilne narave (Park in Ruoff, 2009). Lastnost dvodimenzionalnosti skupaj z ostalimi edinstvenimi lastnostmi (prosojnost in elastičnost materiala, dobra toplotna in električna prevodnost) se izkorišča

v znanosti materialov, fiziki, kemiji, medicini in nanotehnologiji. Poleg uporabe v elektronskih napravah, prevodnikih in različnih nanokompozitnih materialih ima velik potencial za medicinske aplikacije kot biosenzor, za tarčno dostavo zdravil in fototermično zdravljenje tumorjev (Yang in sod., 2010) ali kot sintetični proteinski inhibitor (De in sod., 2011).

Računalniške simulacijske in eksperimentalne študije poročajo o visokem potencialu GO za prečkanje lipidnih dvoslojev in posledične poškodbe membran (Liao in sod., 2011; Frost in sod., 2012; Lammel in sod., 2013). Eksperimentalne študije na umetnih membranah poročajo o elektrostatskih interakcijah med GO in glavami fosfolipidov, kar je povzročilo razbitje liposomov (Frost in sod., 2012). Poskusi na celičnih kulturah *in vitro* (Lammel in sod., 2013) so potrdili visoko afiniteto GO za vezavo na plazmalemo; že nizki odmerki so povzročili strukturne poškodbe membran. Nanoploščice GO v citosolu modelnih jetrnih celic so povzročile povišanje znotrajceličnih reaktivnih kisikovih zvrsti, vplivale na spremembe celične ultrastrukture in metabolne aktivnosti (Lammel in sod., 2013).

2.4 INTERAKCIJE NANOMATERIALOV Z BIOLOŠKIMI SISTEMI

Interakcija med NM in lipidnimi membranami je določena z nabojem, sestavo in velikostjo komponent, ki so udeležene v interakciji (Schulz, 2012). Številne eksperimentalne, računalniške simulacijske in teoretične študije predpostavljajo, da interakcija NM z membranskimi lipidi vpliva na spremembo strukture in delovanja umetnih in bioloških membran (Wang in sod., 2008; Dawson in sod., 2009; Yu in Granick, 2009; de Planque in sod., 2011; Drašler in sod., 2014). Nanomateriali in njihovi aglomerati se na membrane lahko adsorbirajo in povzročijo morfološko reorganizacijo lipidnih dvoslojev; predvsem nabiti NM lahko preko elektrostatskih interakcij povzročijo močne deformacije membran zaradi prerazporejanja lipidnih molekul znotraj dvosloja (Wang in sod., 2008; Yu in Granick, 2009; Chen in sod., 2012). Adsorpcija NM na membrane lahko vodi v spremembe membranske ukrivljenosti (Roiter in sod., 2008; Thomassen in sod., 2011; Westerhausen in sod., 2012), internalizacijo NM (Fošnarič in sod., 2009) in oblikovanje por ali lukenj v membranah (Mecke, 2005; Ginzburg in Ballijepalli, 2007; Alexeev in sod., 2008; Leroueil in sod., 2008) in ovijanje fosfolipidov okoli NM (ang. *membrane wrapping*) (Alexeev in sod., 2008; Nel in sod., 2009; Fošnarič in sod., 2009; Michel in Gradzielski, 2008); pri tem imajo negativno nabiti ali nevtralni NM manjši potencial oblikovanja por v primerjavi s pozitivno nabitimi (Hong in sod., 2006). Vendar je tudi bližina anionskih ND povzročila lokalno spremembo orientacije fosfolipidnih glav (Goertz in sod., 2011). Glede vpliva velikosti NM na membrane še ni

enotnega mnenja; manjši ND lahko oblikujejo pore v membrani; nasprotno pa se lahko na večjih aglomeratih oblikuje dvosloj fosfolipidov (Roiter in sod., 2008).

2.5 VREDNOTENJE INTERAKCIJE NANOMATERIALOV Z UMETNIMI MEMBRANAMI

Umetne fosfolipidne membrane v obliki veziklov različnih velikosti služijo kot redukcioniistični modelni sistem za študije interakcij med NM in membranami pri fiziološkem pH (Zhang in sod., 2012) in so zaradi velike podobnosti z biološkimi membranami komplementarne študijam vpliva NM na različne nivoje bioloških sistemov (Wang in sod., 2008). Fosfolipidni vezikli omogočajo študije strukture bioloških membran, urejenosti membran, spremembe fluidnosti, transporta preko membrane, njihovega samosestavljanja, elastičnosti, obnašanja v območjih faznih prehodov in za proučevanje membranskih interakcij z različnimi makromolekulami. Prednost umetnih membran pred celičnimi je manjša heterogenost, kar omogoča opazovanje izbranih komponent, ter možnost kontroliranega spreminjanja njihove sestave in okoliškega medija (Drobne in Kralj-Iglič, 2009). V študijah interakcij med NM in vezikli so delci lahko (i) enkapsulirani v vezikle, (ii) v obliki pripravljenih hibridov med vezikli in anorganskimi NM ali (iii) vezikli, inkubirani v suspenziji NM (Wang in sod., 2008; Zupanc in sod., 2012; Frascione in sod., 2012).

2.5.1 Fosfolipidni vezikli

Fosfolipidni vezikli so lahko v obliki uni- ali večlamelarnih liposomov (ang. *multilamellar vesicles*). Orjaški unilamelarni fosfolipidni vezikli (ang. *giant unilamellar vesicles*, GUV) so s svojim povprečnim premerom od 1 do 100 μm (Döbereiner, 2000) v istem velikostnem razredu kot celice in dovolj veliki za opazovanje pod svetlobnim mikroskopom, ki med drugim omogoča direktno sledenje spreminjanju njihove oblike (Drobne in Kralj-Iglič, 2009). Veliki in majhni unilamelarni vezikli (ang. *large unilamellar vesicles*, LUV; in ang. *small unilamellar vesicles*, SUV) se pogosto uporabljajo za študije vpliva substanc na membranske lastnosti, kot so fluidnost in propustnost (Gmajner in sod., 2011). Multilamelarni vezikli so najpreprostejši liposomi, ki se oblikujejo po mehanski disperziji suhih lipidov v vodni raztopini. Sestavljeni so iz koncentričnih lipidnih dvoslojev, vsak posamezni dvosloj je ločen z ozkim kanalom vodne raztopine (Patil in sod., 2014).

Za pripravo umetnih liposomov se pogosto uporablja glicerofosfolipide (Sessa in Weissmann, 1968), kot sta npr. 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3 fosfatidilholin (POPC) ali 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DPPC). Glicerofosfolipide sestavlja

dipolarna (t.i. zwitterionska³) glava, ki je v kontaktu z vodno raztopino, in dva nepolarna repa, sestavljena iz hidrofobnih maščobnih kislin (Velikonja in sod., 2013).

2.5.2 Metode za spremljanje lastnosti fosfolipidnih membran

Najpogostejše uporabljane tehnike za opazovanje vpliva snovi na posamezne umetne fosfolipidne vezikle so svetlobna, fluorescenčna, konfokalna, elektronska in ramanska mikroskopija, mikroskopija na atomsko silo ter pretočna citometrija (Ruozi in sod., 2005; Sato in sod., 2006; Bibi in sod., 2011; Chen in sod., 2013). Za vrednotenje membranskih lastnosti več veziklov hkrati oz. populacij veziklov pa različne spektroskopske tehnike ali tehnike sipanja in uklanjanja svetlobe (npr. dinamično sipanje svetlobe (DLS), sipanje X-žarkov), ter kalorimetrične tehnike (Pabst in sod., 2000; Pencer in sod., 2001; Rappolt in Pabst, 2008; Gill in sod., 2010; Zupanc in sod., 2014 v tisku).

2.5.2.1 Svetlobna fazno-kontrastna mikroskopija

Fazno-kontrastna svetlobna mikroskopija je ena izmed najbolj uporabnih tehnik za opazovanje orjaških unilamelarnih veziklov (GUV). Deluje na osnovi različne optične gostote vzorca; žarek svetlobe se lomi na robu objektov in tako ustvari t.i. difrakcijski vzorec, kar omogoča opazovanje faznih sprememb v vzorcih (npr. optično gostejša notranjost vezikla v primerjavi z okoliško raztopino). Vezikli sferične oblike se pogosto preoblikujejo v elipsoidno obliko, hruškasto, čašasto ali diskocitno oblikovane vezikle ter v vezikle z brsti (Lipowsky, 1991; Lipowsky in Döbereiner, 1998; Markvoort in sod., 2006; Yu in Granick, 2009). Že majhne asimetrične spremembe v lipidnem dvosloju GUV se lahko izrazijo kot močno spontano ukrivljanje membrane, kar vpliva na preoblikovanje veziklov ali njihovo razbitje (Zupanc in sod., 2012). Nekateri avtorji poročajo, da je najpomembnejši dejavnik vpliva na transformacijo oblike veziklov razlika med osmotskim pritiskom med zunanostjo in notranostjo vezikla (Hotani in sod., 1999; Kralj-Iglič in sod., 2001), obliko lahko spremeni tudi fizični stik (adsorpcija) snovi, tudi NM, na fosfolipide (Yu in Granick, 2009).

2.5.2.2 Sipanje X-žarkov pod majhnim kotom

Rentgenske-žarkovne tehnike so nedestruktivne analitične tehnike, ki temeljijo na opazovanju intenzitete razpršenih X-žarkov z vzorca kot funkcije kota sipanja svetlobe, polarizacije, valovne dolžine ali energije svetlobe, iz česar dobimo informacije o

³ Zwitterion je izraz za dipolarni ion ali t.i. ion dvojček, ki ima hkrati pozitiven in negativen naboj, navzven pa je molekula električno nevtralna (Velikonja in sod., 2013).

kristalografski strukturi, kemijski sestavi ter fizikalnih lastnostih materialov in tankih plasti. Tehnika sipanja X-žarkov pod majhnim kotom (SAXS) temelji na elastičnem sipanju X-žarkov z valovno dolžino med 0,1 in 0,2 nm in omogoča določitev strukturnih podrobnosti snovi v območju od 1 nm do 100 nm, kot so debelina lipidnega dvosloja, razdalja med lipidnimi dvosloji znotraj MLV in urejenost lipidnih dvoslojev (Glatter in Kratky, 1982; Guinier, 1963; Laggner in Mio, 1992; Pabst in sod., 2000). Urejena razporeditev dvoslojev multilamelarnih veziklov (MLV) predstavlja idealen sistem za študije z uporabo X-žarkov (Hope in sod., 1986); pri tem so POPC MLV, pripravljeni v deionizirani vodi, ovrednoten in pogosto uporabljen sistem za študije obnašanja membran pri konstantni temperaturi ali pod pogoji hitrega segrevanja (Rappolt in sod., 2003).

2.5.2.3 Fluorescenčna spektrofotometrija

Spremembe urejenosti lipidnega dvosloja se lahko odrazijo v spremenjeni fluidnosti⁴ membrane, ki je pomembna lastnost celičnih membran. Povišana fluidnost poveča prosto gibanje membranskih fosfolipidov in beljakovin in vpliva na npr. ionski transport, potek različnih signalnih poti in celično rast (Park in sod., 2005). Interakcija NM z membrano, npr. adsorpcija NM na fosfolipidni dvosloj ali enkapsulacija NM v liposome, vpliva na fluidnost membrane (Roiter in sod., 2008). Spremembe fluidnosti lahko vrednotimo z uporabo membransko vgrajenih sond, kot sta fluorofor 6-difenil-1,3,5-heksatrien (DPH), ki se vgradi med hidrofobne repe fosfolipidov, ali njegov kationski derivat trimetilamonij-6-fenil-1,3,5-heksatrien (TMA-DPH) v bližini polarnih fosfolipidnih glav (Hurjui in sod., 2013).

S spreminjanjem temperature izzovemo fazne prehode membranskih fosfolipidov, kar se odrazi tudi v fluidnosti membran; višja temperatura povzroči prehod iz stanja gel v tekoče stanje. Lipidi v bioloških membranah so običajno v tekočem stanju, kar olajša lateralno mobilnost in konformacijske spremembe membranskih proteinov (Riske in sod., 2009). V primeru vsidranih ali adsorbiranih NM v ali na membrano lahko prisotnost NM zmoti urejenost lipidov in inducira fazni prehod, kar se odrazi tudi v povečani membranski fluidnosti (Rappolt in Pabst, 2008). Merjenje spremenjene fluidnosti fosfolipidnih liposomov z merjenjem fluorescenčne polarizacije in anizotropije je pogosto uporabljena metoda za vrednotenje vpliva prisotnosti različnih NM na umetne membrane; običajno je povezano z analizo faznih prehodov membranskih lipidov (Bothun in sod., 2008; Frascione in sod., 2012).

⁴ Izraz fluidnost membrane se nanaša na viskoznost lipidnega dvosloja umetnih in celičnih membran (Lodish in sod., 2000).

2.5.2.4 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Diferenčna dinamična kalorimetrija (DSC) je učinkovita in široko uporabljana kalorimetrična metoda za določanje toplotno induciranih sprememb lipidne strukture, nastalih kot posledica interakcije različnih snovi z lipidnim dvoslojem (Abram in sod., 2013). Tehnika DSC se pogosto uporablja tudi v biologiji in nanoznanosti za vrednotenje temperaturno in/ali časovno pogojenih fizikalnih lastnosti lipidov in omogoča vrednotenje tudi zelo subtilnih sprememb na membrani (Riske in sod., 2009; Gill in sod., 2010). Termično induciran fazni prehod je mogoče ovrednotiti v ozkem temperaturnem intervalu le na lipidnih sistemih, sestavljenih iz nasičenih aminokislin s faznim prehodom v ozkem temperaturnem območju (Boggs, 1987). Glavni fazni prehod (T_m) ustreza izomerizaciji acilnih verig v stanje rotamere *gauche*⁵, kar pomeni prehod iz urejenega stanja gel v urejeno tekoče stanje (L_α), fazni predprehod pa iz urejene trdne faze gel (L_β , ang. *tilted*) v valujočo fazo gel (P_β , ang. *rippled*) (Riske in sod., 2009).

Termodinamske lastnosti membrane so pomemben faktor pri vrednotenju kvarnega vpliva NM na biološke sisteme, saj dinamika membranskih fosfolipidov ključno vpliva na morfološke spremembe membran, npr. oblikovanje izrastkov v obliki tub ali verižic in oblikovanje membranskih veziklov (Roux in sod., 2005; Westerhausen in sod., 2012). Z metodo DSC lahko sklepamo tudi na mehanski vpliv NM na membrane, npr. na ovijanje NM z membranskimi lipidi (ang. *membrane wrapping*), ki se odraža v spremenjeni temperaturi faznega prehoda fosfolipidov (Westerhausen in sod., 2012).

2.5.3 Izpostavljene lastnosti membranskih fosfolipidov

2.5.3.1 Fazni prehod fosfolipidov

Specifična značilnost posameznih fosfolipidov je oster glavni fazni prehod (Mabrey in Sturtevant, 1976), ki ustreza temperaturi faznega prehoda iz trdnega v tekoče stanje; v temperaturnem območju, ki je nižje od temperature glavnega faznega prehoda (T_m), van der Waalove vezi držijo ogljikovodikove repe tesno skupaj, membrana pa je v trdnem stanju, t.i. stanju gel (Janiak in sod., 1976). Nad T_m je za fosfolipide značilna lateralna mobilnost in mobilnost molekul med dvema slojema (t.i. pojav flip-flop; Kornberg in McConnel, 1971), kar je odgovorno za fluidnost membrane. Ob faznem prehodu se pojavi fenomen začasno povišane propustnosti membrane, kar omogoča npr. sproščanje snovi iz notranjosti liposoma pri uporabi liposomov kot prenašalcev učinkovin (Michel in

⁵ Izraz *gauche* opisuje konformacijsko izomero (konformero), kjer sta dve bližnji skupini ločeni s torzijskim (med dvema atomoma) kotom 60° (IUPAC, 2006).

Gradzielsky, 2012). Fluidnost membrane lahko opišemo s t.i. elastičnostjo ukrivljanja membrane (ang. *bending elasticity*), to je energija, potrebna za odmik lipidnega dvosloja od spontane ukrivljenosti (ravnotežje med adhezivnimi in elastičnimi silami), ki se ob faznem prehodu drastično spremeni (Michel in Gradzielsky, 2012).

2.5.3.2 Membranska ukrivljenost

Sprememba oblike fosfolipidnih veziklov in eritrocitov je določena z ukrivljenostjo membrane (Kralj-Iglič in sod., 1996), pri slednjih je odraz vzajemnega delovanja membranskih fosfolipidov in proteinov (McMahon in Gallop, 2005; Graham in Kozlov, 2010). Eden od najučinkovitejših mehanizmov za tvorbo in ohranjanje ukrivljenosti temelji na asimetriji membranskih monoslojev. Ukrivljenost membrane je geometrijska lastnost lokalnega značaja (različna na posameznih membranskih območjih), vendar lahko s povprečjem lokalnih ukrivljenosti opišemo globalno ukrivljenost oz. obliko membrane. Po dogovoru je ukrivljenost znotrajceličnih membran proti lumnu organela ali citoplazmi pozitivna, zunanjega monosloja pa negativna. Majhna ukrivljenost je značilna za membranske strukture s polmerom, večjim od debeline membrane (npr. plazmalema), večja pa za manjše transportne vezikle (Graham in Kozlov, 2010).

2.6 VREDNOTENJE INTERAKCIJE NANOMATERIALOV Z BIOLOŠKIMI MEMBRANAMI ERITROCITOV

Človeški eritrociti so v toksikoloških študijah in za primerjavo vpliva snovi na biološke in umetne membrane zaradi odsotnosti endocitoze (Laurencin in sod., 2010) ter hitrega odziva celic na spremenjene membranske lastnosti široko uporabljan sistem. Že zelo majhen vpliv snovi na eritrocitne membrane se odrazi v transformaciji celične oblike, kar lahko opazujemo s svetlobno ali elektronsko mikroskopijo (Asharani in sod., 2012; Han in sod., 2012; Šimundić in sod., 2013; Drašler in sod., 2014).

2.6.1 Spremembe morfologije eritrocitov

Rudenko (2010) je predpostavil, da morfološke spremembe eritrocitov vključujejo štiri glavne spontane transformacije oblik: začetna diskoidna oblika, ehinociti z več izrastki v obliki trnov, vmesna diskoidna stopnja in končna stomatocitna oblika z značilno nabrekli obodom oz. ugreznjeno srednjo regijo. Med nediskoidnimi oblikami so mogoči reverzibilni prehodi, medtem ko preoblikovanje iz ehinocite nazaj v diskoidno obliko ni mogoče. Na podlagi koncepta sklopljenega delovanja dvoslojev (ang. *bilayer couple concept*, BCC), ki sta ga predpostavila Sheetz in Singer (1974), razlagata, da vsak faktor, ki vodi v raztezanje notranje ali zunanje plasti lipidnega dvosloja, povzroči oblikovanje

konveksnih ali konkavnih struktur. Raztezanje zunanega lipidnega dvosloja se pri eritrocitih odrazi kot ehinocitni trni, nasprotno, razteg notranjega sloja sproži stomatocitozo (Iglič in sod., 1997).

Večina avtorjev predpostavlja, da je spreminjanje oblike eritrocitov skladno s konceptom BBC; večinsko sprejeto mnenje je, da gre za hkratno in usklajeno delovanje membranskih strukturnih proteinov in membranskega citoskeleta ter posrednega vpliva fosfolipidov na proteine (Gimsa in Reid, 1995; Hägerstrand in sod., 1999a,b, 2000; Betz, 2006; Grebowski in sod., 2013). Avtorji izpostavljajo, da je pri delu z eritrociti treba upoštevati visoko občutljivost na pogoje v eksperimentalnem mediju in na znotrajcelične spremembe, saj npr. visoka slanost, visok pH (znotrajcelično) in bližina stekla povzročijo raztezanje zunanega lipidnega dvosloja, obratni pogoji pa oblikovanje stomatocit (Lim in sod., 2002; Rudenko, 2009, 2010).

2.6.2 Mikrovezikulacija

Mikrovezikulacija je proces brstenja fosfolipidnih membran, prisoten pri skoraj vseh celičnih tipih evkariontskih celic tako *in vitro* kot *in vivo* (Iglič in sod., 1998; Šuštar in sod., 2011a,b; Jesenek in sod., 2013). Membranski vezikli se od celice ločijo v končni fazi procesa vezikulacije bioloških membran (Kralj-Iglič, 2012), vendar natančen mehanizem nastanka veziklov še ni poznan (Ogorevc, 2013). Pri eritrocitih so zabeležili pojav sferičnih (premer okoli 150 nm) ali cilindrično oblikovanih (premer okoli 80 nm, dolžina 400 do 850 nm) t.i. mikroeksoveziklov (Hägerstrand in sod., 1999a); mikrovezikulacija eritrocitov lahko vpliva na izgubo lipidov iz zunanega ali notranjega membranskega sloja, kar se odrazi v spremembah oblike eritrocitov (Almizraq in sod., 2013).

2.7 VREDNOTENJE VPLIVA NANOMATERIALOV NA BELJAKOVINE: ENCIMI ACETILHOLINESTERAZE

Adsorpcija in imobilizacija encimov na različnih površinah, med njimi tudi na površine NM, je pogosto uporabljen biosenzorski sistem za vrednotenje vpliva NM na beljakovine (Wang in sod., 2009). Acetilholinesteraza (AChE) je pomemben encim v živčnem sistemu, ki opravlja funkcijo hidrolize nevrottransmitorja acetilholina v holinergičnih sinapsah. Pri sesalcih je široko zastopan predvsem v možganih in v krvi, na ekstracelularni površini nevronov in eritrocitov (Rotundo, 2003; Arrieta in sod., 2009). Inhibicija aktivnosti AChE je široko uporabljan biomarker pri vrednotenju vpliva onesnaževalcev (npr. organofosfatnih in karbamidnih pesticidov) (Arufe in sod., 2007);

zabeležili so tudi inhibitorni vpliv različnih kovin, detergentov, ogljikovodikov, toksinov alg in naravnih fenolnih lipidov (Arduini in sod., 2007; Kopecka in sod., 2008; Stasiuk in sod., 2008), tudi NM (Wang in sod., 2009; Šinko in sod., 2013; Mesarič in sod., 2013). Posledica inhibicije AChE je akumulacija acetilholina v medsinaptičnih špranjah, kar lahko kritično oslabi delovanje živčnega sistema (Worek in sod., 2002).

Nanomateriali, posebno ogljikovi, ki imajo visoko adsorpcijsko sposobnost (Xia in sod. 2011; Ruh in sod., 2012), lahko povzročijo nespecifično adsorpcijo AChE na NM, kar vpliva na delovanje encima (Wang in sod., 2009; Mesarič in sod., 2013). Primeren sistem za spektrofotometrično vrednotenje inhibicije in adsorpcije AChE je modificirana metoda po Ellmanu (Ellman in sod. 1961; Wang in sod. 2009; Mesarič in sod., 2013). Wang in sod. (2009) poročajo o inhibiciji AChE kot posledici adsorpcije encima na NM, pri čemer so imeli ogljikovi NM (SWCNT in MWCNT) najvišjo vezavno afiniteto do encima v primerjavi s kovinskimi in silicijevimi NM.

2.8 VEČPARAMETRSKO VREDNOTENJE KVARNEGA UČINKA NANOMATERIALOV: CELIČNE KULTURE IN VITRO

Sesalčje celične kulture *in vitro* so ene najpogostejše uporabljenih bioloških sistemov pri študijah kvarnega vpliva snovi na celice in v nanotoksikoloških študijah. Klasične citotoksikološke študije so običajno usmerjene v detekcijo močnih vplivov snovi, tudi NM (celična smrt, letalni učinki), medtem ko je ravno ovrednotenje subletalnega odziva celic pomembno pri testiranju potencialnih kvarnih učinkov testiranih snovi na celice, tako pri kratkotrajnih kot pri kroničnih izpostavitvah (O'Brien in sod., 2008). Rezultati večparametrskih analiz na populaciji celic (ang. *high content screening analysis*, HCA) so pokazali, da je kombinacija parametrov, kot so štetje živih celic, permeabilnost plazmaleme, morfologija jedra, patologija lizosomov, mitohondrijski membranski potencial in znotrajcelična koncentracija kalcija, zelo primerna za vrednotenje zgodnjega odziva celic na stresni dejavnik (O'Brien in sod., 2008).

2.8.1 Lizosomi in nanomateriali

Lizosomi so celični organeli, ki so v celici večinsko razporejeni okoli jedra; sodelujejo pri shranjevanju in razgradnji snovi, ki v celice vstopijo z endocitozo in se v organelih kopičijo (Fröhlich in sod., 2012). Akutne poškodbe lizosomov lahko nastopijo preko delovanja reaktivnih kisikovih in dušikovih zvrsti ali zaradi membranskih poškodb (Maysinger in Lovric, 2007; Moore in sod., 2009; Fröhlich in sod., 2012). Spremenjeno delovanje lizosomov je eden izmed prvih pokazateljev oksidativnega stresa, hkrati pa je zmanjšana stabilnosti lizosomalne membrane relevantni indikator celične poškodbe, saj

nefunkcionalna lizosomalna membrana vodi v celično smrt (Fröhlich in sod., 2012). Zakisanost lumna organela vzpostavijo ATP-azne črpalke (tip V-ATP-aze), odgovorne za transport protonov v lumen; vzdrževanje nizkega pH poteka s kombinacijo anionskih in kationskih membranskih proteinskih kanalov (DiCiccio in Steinberg, 2011). Poškodbe lizosomalne membrane se najpogosteje vrednotijo na osnovi spremembe v zakisanosti lumna, npr. s testom zadrževanja barvila nevtral rdeče v notranjosti lizosomov, ali drugih, na nizek pH občutljivih, fluorecenčnih barvil, s tehnikami fluorescenčne mikroskopije ali fluorimetrično (Fröhlich in sod., 2012).

Znano je, da je normalno delovanje lizosomov lahko ovirano zaradi neposredne ali posredne inhibicije fosfolipaz v prisotnosti ksenobiotikov (Natalie in sod., 2009), tudi NM (Salvati in sod. 2011; Fröhlich in sod., 2012; Wang in sod., 2013a,b), in se lahko odrazi v motnji metabolizma fosfolipidov (Anderson in Borlak, 2006; Wang in Peterson, 2013). Dobro je raziskan vpliv predvsem kationskih ND, ki v lizosome vstopijo prekrti z ekstracelularnimi proteini, v notranjosti lizosoma se proteinska korona odstrani, ND se akumulirajo v lumnu in povzročijo nabrekanje organelov (Wang in sod., 2013a,b).

2.8.2 Lamelarna telesca

Lamelarna telesca ali lamelarne granule so organeli, sestavljeni iz več plasti tesno pakiranih fosfolipidnih membran, obdanih z zunanjo membrano (Schmitz in Müller, 1991). V pnevmocitih tipa II in keratinocitih imajo vlogo izločevalnih organelov v celicah, njihov nastanek pa lahko razložimo tudi kot prilagoditveni mehanizem, ki celicam omogoča zadrževanje visoke količine vnesenih snovi v kompleksu s fosfolipidi v izogib kvarnim učinkom (Reasor, 1989; Anderson in Borlak, 2006; Natalie in sod., 2009; Kuroda in Saito, 2010). Wang in Petersen (2013) poročata o povečani tvorbi lamelarnih teles v celicah pljučnega epitelija (A549) po izpostavitvi ND zlata.

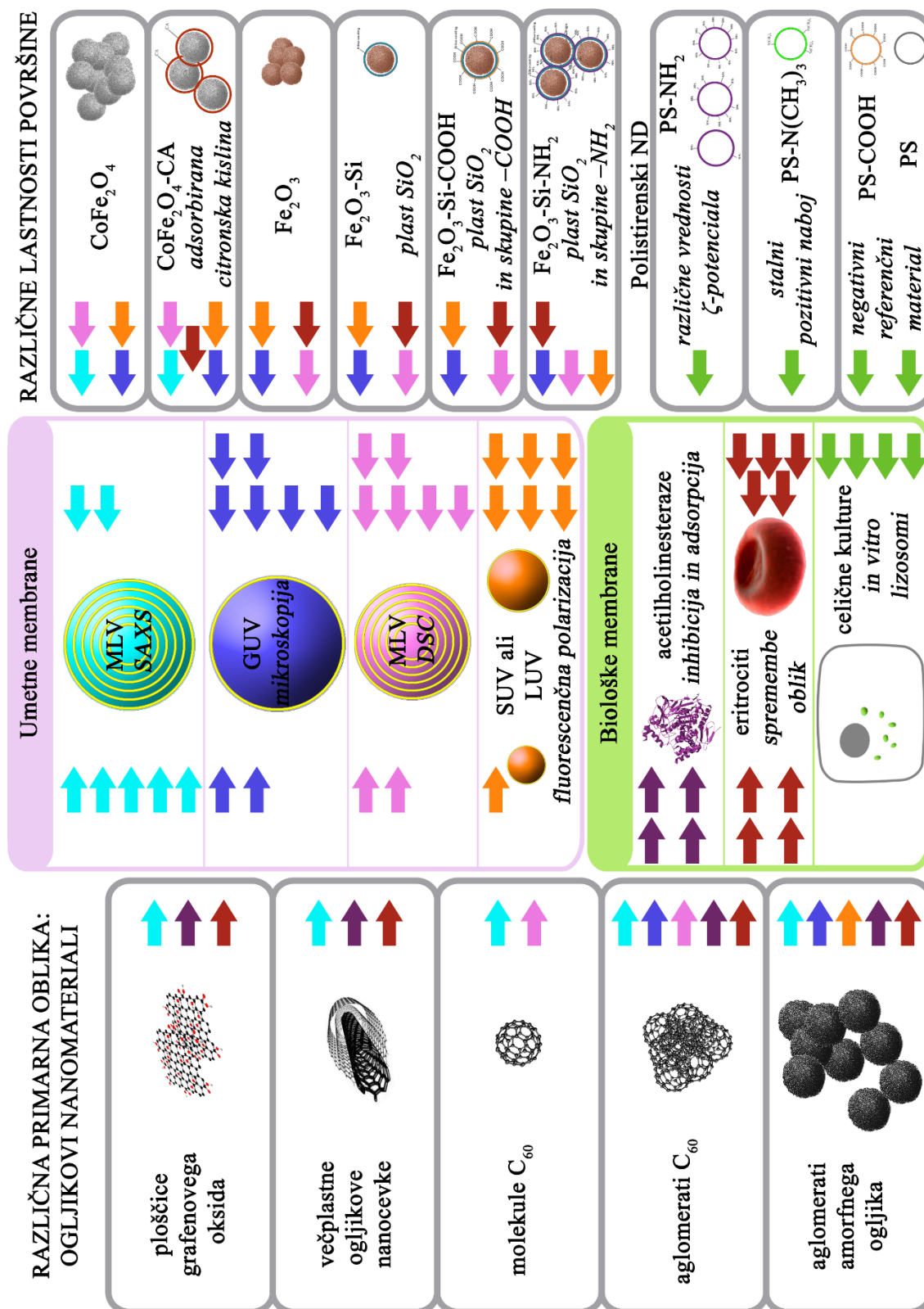
3 MATERIALI IN METODE

3.1 NANOMATERIALI, UPORABLJENI V ŠTUDIJI

V študiji smo uporabljali ogljikove NM: fullerene C_{60} in večplastne ogljikove nanocevke (MWCNT), amorfni ogljik (CB) in ploščice grafenovega oksida (GO); magnetne ND: površinsko neobdelane ND kobaltovega ferita ($CoFe_2O_4$) ali $CoFe_2O_4$ z adsorbirano citronsko kislino ($CoFe_2O_4-CA$), ND železovega oksida ($\gamma-Fe_2O_3$): površinsko neobdelane Fe_2O_3 , Fe_2O_3 s tanko plastjo silicijevega dioksida na površini (Fe_2O_3-Si), Fe_2O_3-Si z vezanimi molekulami s karboksilnimi skupinami ($Fe_2O_3-Si-COOH$) ali aminoskupinami ($Fe_2O_3-Si-NH_2$). V študijah na celičnih kulturah smo uporabili polistirenske (PS) ND: kationske PS ND z vezanimi molekulami z aminoskupinami ($PS-NH_2$; različna količina $-NH_2$) ali trimetilamonijevimi skupinami ($PS-N(CH_3)_3$) ter površinsko neobdelane PS ND in PS z vezanimi molekulami s karboksilnimi skupinami ($PS-COOH$) (negativni referenčni material). (Op.: Poreklo NM in karakterizacija: pril. A).

3.2 SHEMA IZVEDBE POSKUSOV

Splošna shema izvedbe poskusov na izbranih umetnih membranah (fosfolipidnih veziklih) in bioloških membranah (eritrocitih, acetilholinesterazah in celičnih kulturah *in vitro*) z izbranimi NM je prikazana na sliki 1.



Slika 1: Splošna sheme izvedbe poskusov testiranja vpliva izbranih nanomaterialov na umetne ali biološke modelne sisteme.

3.3 ANALIZE UMETNIH FOSFOLIPIDNIH MEMBRAN

3.3.1 Svetlobna fazno-kontrastna mikroskopija

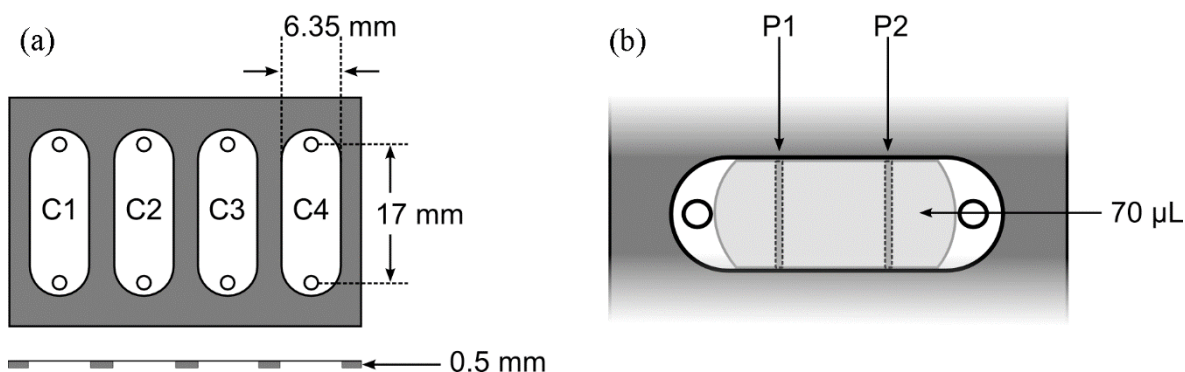
S fazno-kontrastno mikroskopijo smo spremljali vpliv dodatka NM na spremembe števila, premera in stopnje ekscentričnosti skupin GUV.

3.3.1.1 Priprava orjaških unilamelarnih veziklov

Orjaške unilamelarne vezikle smo pripravili z modificirano metodo elektroformacije (Angelova, 1986). Iz založnih suspenzij smo pripravili mešanico sintetičnih lipidov 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicerol-3 fosfatidilholina (POPC) in holesterola (v volumskem razmerju 4:1, v/v), nanесли na vsako (0,02 mL) izmed dveh platinastih elektrod (dolžina 4 cm, premer 1 mm) in elektrodi 2 uri sušili pri nizkem vakuumu, da je topilo izhlapelo. Elektrodi s posušenimi lipidi smo potopili v raztopino saharoze (0,3 M, pH 7,4; 2 mL mikrocentrifugirka z navojem) in izpostavili izmeničnemu električnemu polju (amplituda 5 V/mm, frekvenca 10 Hz; 2 h; 15-min intervali: 2,5 V/mm in 5 Hz; 2,5 V/mm in 2,5 Hz; 1 V/mm in 1 Hz). Z elektroformacijo nastale GUV (v 0,3 M saharozni raztopini) smo obdali z ekvimolarno raztopino glukoze (pH 7,4; 3:5, v/v). (Poreklo kemikalij in postopek priprave suspenzij NM: pril. A).

3.3.1.2 Priprava mikroskopskih preparatov ter zajem in analiza mikroskopskih videoposnetkov

Suspenzije GUV (0,07 mL) smo vnesli v eksperimentalne kamrice CoverWell™ Perfusion chambers PC4L-0,5 (Grace Bio-Labs, Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija); ena kamrica (sl. 2a) je predstavljala populacijo GUV, zajetih v dveh vzorcih, t. j. v dveh enodimenzionalnih videoposnetkih na dveh ločenih pasovih (P1 in P2, sl. 2b), posnetih pri 400-kratni povečavi (svetlobni fazno-kontrastni mikroskop Nikon Eclipse TE2000-S (Nikon, Tokio, Japonska), priključenim na videokamero CCD (op.: ang. *charge-coupled device*), model XC -77 CE (Sony, Tokio, Japonska)).



Slika 2: Prikaz eksperimentalnih kamric za pripravo mikroskopskih preparatov orjaških unilamelarnih veziklov.

(a) Silikonski model štirih komercialno dostopnih eksperimentalnih kamric (C1-C4) s prikazanimi dimenzijami. Stranski pogled na kamrice je podan spodaj; globina posameznih kamric je 0,5 mm. (b) Dva ločena pasova videoposnetkov (P1 in P2) znotraj posameznih eksperimentalnih kamric. Zajem slike na izbranih mestih P1 in P2 ustreza 3 % ocenjeni površine celotne kamrice.

Z algoritmi za procesiranje slik smo videoposnetke pretvorili v mozaike slik, nato avtomatsko (z ročnim pregledovanjem morebitnih odstopanj) segmentirali GUV iz posameznih mozaikov; izrazili smo kvantitativne podatke: število, povprečni premer in stopnjo ekscentričnosti⁶ GUV (Zupanc in sod. 2009, 2010a,b, 2011, 2012, 2014 *v tisku*; dodatna razlaga: pril. A). Pred izvedbo poskusov izpostavitve GUV različnim NM smo preverili variabilnost med kontrolnimi GUV znotraj istega poskusa in med tremi poskusi (K1, K2, K3) (opis: pril. A).

3.3.1.3 Izpostavitve veziklov suspenzijam nanomaterialov

Ustrezno razredčeno suspenzijo GUV (z 0,3 M glukozno raztopino, pH 7,4; sl. A2b, pril. A) smo izpostavili NM (v volumskem razmerju suspenzija GUV:testni medij = 9:1; v/v; v mikrocentrifugirkah), s končnimi koncentracijami NM 0,01; 0,05 ali 0,1 mg/mL. Kontrolnim skupinam smo dodali deionizirano vodo (dH₂O) ali 0,3 M raztopino glukoze. Sledil je postopek zajema videoposnetkov in analize (opis v podpoglavju: 3.2.1.2). Statistično smo podatke ovrednotili z uporabo testa Mann-Whitney (Origin Pro8, OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, ZDA), pri stopnji zaupanja $\alpha = 0,05$.

⁶ Stopnja ekscentričnosti je mera sferičnosti GUV (Zupanc in sod., 2009), izražena na linearnem intervalu od 0 do 1 (popolna sfera ustreza 0, stopnja ekscentričnosti ovalnega GUV se približa vrednosti 1); vrednotenje je zelo občutljivo, saj se že zelo majhni odkloni od oblike popolnega kroga odrazijo v velikih spremembah ekscentričnosti.

Testiranje vpliva C_{60} smo izvedli pred poskusi K1-K3, t.j. pred uvedbo eksperimentalnih kamric, zato se postopek izvedbe razlikuje: po elektroformaciji smo suspenzijo GUV (0,45 mL) nanесли na objektno stekelce, dodali C_{60} (v dH_2O ; končna koncentracija 0,1 mg/mL) in 15-krat na dveh ločenih pasovih. Uporabili smo pozitivno referenčno kemikalijo (50 mM $ZnCl_2$), ki je povzročila pokanje in spremembe oblik GUV; ločili smo sferične, hruškasto, cevasto oblikovane GUV in v obliki verižic (Zupanc in sod., 2011; opis postopka: pril. A).

3.3.2 Sipanje X-žarkov pod majhnim kotom

V sodelovanju s sinhrotronskim centrom Elettra (Bazovica pri Trstu, Italija) smo z žarkovno linijo sipanja X-žarkov pod majhnim kotom (SAXS) konvencionalnega ali sinhrotronskega izvora sevanja preverjali vpliv NM na strukturne lastnosti POPC MLV. Na osnovi elastičnega sipanja X-žarkov smo vrednotili debelino lipidnega dvosloja, razdaljo med lipidnimi dvosloji znotraj MLV in urejenost lipidnih dvoslojev v prisotnosti NM na konvencionalnem viru sevanja ali na sinhrotronski postaji; slednje le z ogljikovimi NM.

3.3.2.1 Priprava multilamelarnih veziklov in meritve SAXS na konvencionalnem viru sevanja

Lipide POPC (v prahu) smo z 10% masnim deležem POPC raztopili v 0,3 M raztopini glukoze (kontrola) ali v dH_2O (kontrola pri poskusu s C_{60}), ali v suspenzijah C_{60} , $CoFe_2O_4$ ali $CoFe_2O_4$ -CA (v dH_2O ; 0,1 mg/mL), inkubirali (1 h, 25 °C) in dobro premešali (10 min; Vortex, Vibromix 114, Tehnica, Slovenija). Izbrano skupino vzorcev smo dodatno izpostavili mehanski motnji (t.i. neposredna izpostavitve): 10 ciklov izmeničnega zamrzovanja (tekoči dušik) in taljenja (vodna kopel 60 °C; 5 min).

Meritve smo izvedli s kamero za detekcijo sipanja X-žarkov pod majhnim in večjim kotom, ki je opremljena s t.i. kolimacijo Kratky (Laggner in Mio, 1992; SWAXS, Hecus X-ray Systems GmbH, Gradec, Avstrija) in pritrjena na generator s sifonsko cevjo (Sealed-tube generator, Philips PW 1729, Philips, Holland), ki funkcionira pri 2 kW. Z volframovim selektorjem valovne dolžine svetlobe je bila izbrana bakrova radiacija valovne dolžine $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ (radiacija Cu- K_α). Linerani enodimenzionalni detektor (PSD 50-M, Hecus X-ray Systems GmbH, Gradec, Avstrija), občutljiv na lokacijo sipane svetlobe, obsega sipalni vektor q ($q = 4\pi \sin\theta/\lambda$; λ je valovna dolžina, 2θ je kot sipanja) od 0,02 do $0,6 \text{ \AA}^{-1}$. Kot difrakcijski standard za kalibracijo skale kotov izmerjene intenzitete smo uporabili srebrov behenat, to je srebrova sol s karboksilno kislino (CH_3 -

(CH₂)₂₀-COOAg), ki oblikuje lamelarne strukture popolnoma brez vmesne plasti vode (z vrednostjo $d = 58,38 \text{ \AA}$) (Huang in sod., 1993). Vzorce MLV smo merili v 1,0 mm stekleni kapilari (1 h, 25 °C). Od dobljenega signala SAXS smo odšteli sipanje svetlobe ozadja (sipanje vode in kapilare).

3.3.2.2 Priprava multilamelarnih veziklov in meritve SAXS na sinhrotronskem viru sevanja

Suspenziji POPC v CHCl₃ smo dodali NM, raztopljene v CHCl₃, v molskem razmerju 0,02 (C₆₀, GO, CB) ali 0,1 C₆₀ (v razmerju do POPC; prikazano kot 2 ali 10 mol. % C₆₀) in izpostavili vakuumu, dokler ni organsko topilo izparelo (12 h). Vzorce smo rehidrirali z dH₂O (0,1 mL; s končno koncentracijo POPC 1 mg/mL), premešali na vorteksu (5-krat po 2-3 min), pripravljene disperzije prepihali s tekočim dušikom in shranili do merjenja (v neprodušno zaprtih steklenicah; - 20 °C). Meritve SAXS v odvisnosti od temperature smo izvedli na avstrijski žarkovni liniji SAXS na sinhrotronskem centru Elettra, Bazovica, Italija (Amenitsch in sod., 1998; Bernstorff in sod., 1998), z uporabo valovne dolžine $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$, v tankostenski kvarčni kapilari s premerom 1 mm, v jekleni kiveti (Anton Paar, Gradec, Avstrija), vstavljeni v medeninast nosilec v obliki kocke. Pred meritvijo so bili vzorci vsaj 10 min izpostavili predhodno določeni temperaturi (od 15 °C do 65 °C, v korakih po 5 °C, z natančnostjo $\pm 0,1 \text{ °C}$ in časom merjenja 120 sekund), med meritvami pa stalnemu termičnemu stiku. Od dobljenih vzorcev smo odšteli signal ozadja (sipanje svetlobe iz vode in zraka) in analizirali v celotnem območju q , z uporabo modificirane teorije po Caillé (Pabst in sod., 2000, 2003; Rappolt in sod., 2008). Izrazili smo razdaljo med lipidnimi dvosloji (d), razdaljo med polarnimi glavami fosfolipidov (d_{HH}), debelino vmesnega sloja vode (dW) in fluktuacijsko ukrivljanje membrane oz. Cailléjev parameter (η) (postopek izvedbe meritev, analize krivulj sipanja in enačbe, uporabljene za izračune strukturnih parametrov membran: pril. A).

3.3.3 Fluorescenčna spektrofotometrija

Metoda temelji na merjenju fluidnosti unilamelarnih lipidnih veziklov (SUV ali LUV) na osnovi izmerjenih vrednosti polarizacije svetlobe s fluorescenčnih sond, nepolarnega 6-difenil-1,3,5-heksatriena (DPH) ali njegovega kationskega derivata trimetilamonij-6-fenil-1,3,5-heksatriena (TMA-DPH).

3.3.3.1 Priprava unilamelarnih veziklov in merjenje fluorescenčne polarizacije

Unilamelarne vezikle SUV ali LUV smo oblikovali iz POPC MLV, ki smo jih pripravili po metodi tankega filma (Lasic, 1993): želeno količino (4 mg) POPC (iz založne raztopine v kloroformu (CHCl_3); 10 mg/mL) smo odpipetirali v stekleno bučko, topilo izparili na rotavaporju pri nizkem tlaku 17 mbar (R-200, BÜCHI Labortechnik AG, Flawil, Švica) do nastanka lipidnega filma in rehidrirali s pufrom HEPES (10 mM; pH 7,0). Za pospešitev oblikovanja MLV smo suspenziji POPC (2 mg/mL, v pufru HEPES) dodali silanizirana steklena zrna (premer 2 mm), jo izpostavili izmeničnim ciklom (10 min) stresanja na mešalu (Vibromix, Tehnica Železniki, Slovenija) in gretja (vodna kopel 45–50 °C).

Izpostavitve CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ smo izvedli s titracijo LUV; pripravili smo jih iz predhodno pripravljenih MLV (2 mg/mL, 10 mM pufer HEPES, pH 7,0) z metodo izločitve preko filtra s premerom por 800 nm (20-krat), jih prepihali z dušikom in segrevali v vodni kopeli (50 °C; 30 min). V merilno kiveto smo odpipetirali 0,125 mL LUV (končna koncentracija POPC: 0,1 mg/mL) in 0,0025 mL nepolarne fluorescenčne sonde DPH (v topilu dimetilsulfoksid (DMSO); končna koncentracija: 0,5 μM). S titracijo (0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05 mL) smo dodajali suspenzije CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (1,5 mg/mL ali 0,15 mg/mL v 10 mM pufru HEPES, pH = 7,0). Meritve fluorescenčne polarizacije smo izvedli v 2,5 mL kvarčnih kivetah z optično dolžino 10 mm (FLR Cary, Varian, Avstralija) in fluorescenčnega spektrofotometra (Cary Eclipse, Varian Inc, Mulgrave, Avstralija) pri 25 °C.

Izpostavitve Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ smo izvedli z inkubacijo SUV v suspenzijah ND; pripravili smo jih iz predhodno pripravljenih POPC MLV (2mg/mL, 10 mM pufer HEPES, pH 7,0) s sonikacijo na paličnem sonikatorju s titanovo probo (Sonics VibraCell, Newtown, ZDA; 30 min, amplituda 40 %, s ciklom 10 s vklop/10 s izklop), jih prepihali z dušikom in do uporabe shranili na 4 °C. Vezikle smo izpostavili suspenzijam Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ (v 10 mM pufru HEPES, pH = 7,0; končna koncentracija 0,05 mg/mL, izražena na Fe_2O_3), po inkubaciji (50 min, 25 °C) odstranili večje skupke ND s centrifugiranjem (14.000 g, 10

min; Hettich Zentrifugen Rotanta 460R, Sigma-Aldrich Labware, Steinheim, Nemčija) in preverili koncentracijo POPC v vzorcih s testom *Phospholipids C* (Wako Phospholipids C Assay, Wako Pure Chemical Industries, Richmond, Japonska), ki temelji na encimatski razgradnji N-etil-N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dometoksanilina (DAOS) s holin-oksido. Centrifugiranim vzorcem (0,01 mL) POPC SUV smo po navodilih proizvajalca dodali dH₂O (0,1 mL), premešali na vorteksu in inkubirali (5 min, 37 °C) z barvnim reagentom (0,1 mL). Produkt reakcije, modro obarvani pigment, smo ovrednotili spektrofotometrično (600 nm in 700 nm; Hewlett Packard 8453E UV-VIS, Waldbronn, Nemčija). Na podlagi ovrednotene koncentracije fosfolipidov v vzorcu smo v kiveto odmerili ustrezno količino suspenzije POPC za izvedbo meritev na fluorimetru (končna koncentracija POPC: 0,1 mg/mL), dodali fluorescenčni sonde (0,01 mL; v DMSO) DPH (končna koncentracija: 0,5 µM) ali TMA-DPA v DMSO (končna koncentracija: 1,0 µM), inkubirali (15 min, 25 °C) in izvedli meritve z vzbujevalno valovno dolžino 358 nm in detekcijo pri 410 nm, v temperaturnem območju od 15 do 50 °C. Rezultate smo podali kot vrednosti polarizacije v odvisnosti od molarne razmerja ND in lipidov POPC ($n(\text{Fe}_2\text{O}_3)/n(\text{POPC})$) (opis postopka izvedbe meritev in analize podatkov ter preverjanje morebitnega navzkrižnega delovanja ND s signalom: pril. A). Učinkovitost centrifugiranja (14.000 g, 10 min) za odstranitev večjih skupkov ND (izbrali smo Fe₂O₃-Si-COOH) iz vzorcev smo preverili z metodo atomske absorpcijske spektrometrije (AAS; Perkin-Elmer AAnalyst 100, Waltham, Massachusetts, ZDA) in primerjali s to pri centrifugiranju z gelskim ločevanjem (Matrkis Sephadex G 50) na osnovi vsebnosti Fe-ionov (opis postopka: pril. A).

3.3.4 Diferenčna dinamična kalorimetrija

Z metodo DSC smo vrednotili časovno in temperaturno odvisne konformacijske spremembe in fazne prehode lipidov DPPC v prisotnosti NM.

3.3.4.1 Priprava multilamelarnih veziklov in izvedba meritev

Suspenziji DPPC MLV (1mg/mL; 10 mM pufer HEPES, pH = 7,0), oblikovani po metodi tankega filma (opis: 3.3.3.1), smo dodali suspenzije CB, CoFe₂O₄, CoFe₂O₄-CA, Fe₂O₃, Fe₂O₃-Si, Fe₂O₃-Si-NH₂ ali Fe₂O₃-Si-COOH (v pufru HEPES; v molarne razmerju DPPC in NM 1:1, n/n), s skupnim volumnom vzorca 1 mL in končno koncentracijo DPPC 0,5 mg/mL. V izogib mehurčkom zraka v eksperimentalni kamrici smo vzorce odzračili na magnetnem mešalu v podtlačni komori, priključeni na vakuumsko črpalko (Thermolyne Nuova Stirrer, Thermo Scientific, ZDA) in vstavili v vzorčno celico inštrumenta (N-DSC III, model CSC 6300; Calorimetry Sciences Corp., Utah, ZDA);

referenčno celico smo napolnili s pufrom HEPES. Vsak vzorec je bil zaporedno ogrevan in hlajen (od 10 do 70 °C, s hitrostjo 1 °C/min). Temperaturo faznih prehodov (fazni predprehod, T_p in glavni fazni prehod T_m) smo izrazili na osnovi izmerjene energije, potrebne za vzdrževanje enake temperature med referenčno in vzorčno kamrico. Termograme smo prikazali kot funkcijo presežne toplotne kapacitete $\langle C_p \rangle$ [kJ/molK] v odvisnosti od temperature [°C] (od 20 do 60 °C) (opis analize termogramov: pril. A).

Vpliv C₆₀ smo ovrednotili na dva načina: z inkubacijo DPPC MLV v vodni suspenziji C₆₀ in s pripravo MLV v raztopini C₆₀ v CHCl₃ (neposredna izpostavitve), obe izpostavitvi z molarim razmerjem POPC in C₆₀ 1:1 (n/n). V poskusu inkubacije smo DPPC MLV v pufru HEPES dodali suspenzijo C₆₀ v volumskem razmerju MLV:C₆₀ v dH₂O 1:1 (v/v) ali le dH₂O pri kontrolnem vzorcu.

3.4 ANALIZE BIOLOŠKIH MEMBRAN

3.4.1 Vrednotenje sprememb membran človeških eritrocitov

Izvedba poskusov na človeških objektih (rdeče krvne celice) je s pisnim soglasjem odobrila Komisija Republike Slovenije za Medicinsko etiko dne 23. 3. 2010, št. 117/02/10 (pril. C). Vzorce krvi smo vzeli na dan izvedbe poskusa odraslim zdravim prostovoljcem.

3.4.1.1 Izolacija eritrocitov

Kri smo zbrali z vakuumskim odvzemom venske krvi iz medialne kubitalne vene s siringo (dolžina 70 mm, notranji polmer 0,4 mm; Micro-lance, Becton Dickinson, New Jersey, ZDA) v predhodno segrete (37 °C) zbirne epruvete (2,7 mL, z vsebnostjo antikoagulantna trinatrijevega citrata 3,2 % (0,109 M); Vacutube, Laboratorijska tehnika Burnik d.o.o., Vodice, Slovenija). S centrifugiranjem krvi pri nizkih obratih (150 ali 300 g, 37 °C, 10 minut; Centric 400R centrifuga, Domel d.o.o., Železniki, Slovenija) smo ločili sediment eritrocitov, krvno plazmo (supernatant) ter tanek srednji sloj levkocitov in krvnih ploščic (ang. *buffy coat*), odstranili supernatant in *buffy coat* in eritrocite s postopnim centrifugiranjem (1550 g, 37 °C, 5 min; 3- do 5-krat) sprali z nadomeščanjem odstranjenega volumna s PSB-citratnim pufrom (pH 7,4), odstranili supernatant in eritrocite shranili do izvedbe poskusa (25 °C, do 1 h).

3.4.1.2 Priprava vzorcev eritrocitov za vrstično elektronsko mikroskopijo

Nerazredčene sprane eritrocite (0,15 mL) smo izpostavili suspenzijam NM (0,05 mL) v PBS-citratnem pufru (končne koncentracije: 1 mg/mL CoFe₂O₄ ali CoFe₂O₄-CA; 0,5

mg/mL $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ in 0,5 mg/mL C_{60} , CB, GO ali MWCNT) ali PBS-citratnemu pufru (pH = 7,4; kontrola) v 4 do 5 ponovitvah. Po izpostavitvi (1h, 37 °C; op.: čas izpostavitve smo določili na podlagi preliminarnih poskusov, ko smo zabeležili vsaj 80 % eritrocitov izvirne diskoidne oblike) smo vzorce fiksirali (modificirani fiksativ Karnovski; 0,2 mL, 2 h, 25 °C), skozi siringe nanesli na polikarbonatne membranske filtre (pore: 2,0 μm ; TSTP, Isopore Membrane Filters, Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija), sprali v 1M natrijevo-fosfatnem pufru (3 x 10 min), postfiksirali z 1 % OsO_4 (2 x 20 min) in THC (2 x 30 min), izsušili z dehidracijsko vrsto EtOH (30, 50, 70 in 90 % EtOH v dH_2O ; vsak korak 10 min) in HMDS (vsaj 2 h oz. dokler topilo ni izhlapelo). Filtre s fiksiranimi in posušenimi vzorci smo prilepili na aluminijeve nosilce in naprašili s plastjo zlata in paladija (30 nm; Precision Etching Coating System Gatan 682, Kalifornija, ZDA).

3.4.1.3 Vrstična elektronska mikroskopija

Z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM, JEOL JSM-6500F, Tokio, Japonska) smo pregledali 5 vzorcev vsake testne skupine pri od 200- do 30.000-kratnih povečavah ter pri napetosti od 5,0 do 15,0 kV in zajeli posnetke SEM pri 500-kratni povečavi na naključno izbranih mestih (vsaj treh, do 42 pri kontrolni skupini) na nosilcu. Na posnetkih smo v programu ImageJ v1.46r z razširitvenim modulom Cell_Counter, oblikovanim v programu Java (Sun Systems, CA, ZDA), ročno označili posamezne tipe eritrocitov (diskociti in eritrociti nediskoidnih oblik, t.j. ehinociti, stomatociti, sferociti). Statistično smo podatke ovrednotili z uporabo testa Mann-Whitney (Origin Pro8, OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, ZDA), pri stopnji zaupanja $\alpha = 0,05$.

Z metodo energijske disperzije X-žarkov (EDS; Oxford instruments, detektor INCA x-SIGHT LN2, s programsko opremo INCA ENERGY 450, Velika Britanija) smo izvedli kvantitativno kemijsko analizo morebitnih aglomeratov NM na površini eritrocitov.

3.4.1.4 Mikrovezikulacija eritrocitov v prisotnosti nanomaterialov

Pojav mikrovezikulacije membran človeških eritrocitov, t.j. zadnje faze procesa brstenja membrane, smo opisno ovrednotili s posnetkih SEM vzorcev, izpostavljenih NM.

3.5 ENCIMSKI TESTI: TESTIRANJE VPLIVA OGLJIKOVIH NANOMATERIALOV NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZ

Kot dodatno metodo za ugotavljanje, ali so interakcije med NM in biološkimi membranami usmerjene na membranske proteine, smo preverili delovanje izbranih ogljikovih NM na aktivnost modelnih encimov: ribjo acetilholinesterazo (AChE) iz električne jegulje (*Electrophorus electricus*), AChE iz človeških eritrocitov (*Homo sapiens*) ter rekombinantno žuželčjo AChE iz vinske mušice (*Drosophila melanogaster*).

3.5.1 Določanje inhibicije encima in adsorpcije acetilholinesteraze na nanomateriale

Inhibitorno aktivnost ogljikovih NM in adsorpcijo izbranih encimov na NM smo določali z modificirano metodo po Ellmanu (Ellman in sod., 1961), prilagojeno za izvedbo testov na mikrotitrskih ploščah (Mesarič in sod., 2013). Meritve smo izvedli z modificiranim testom za merjenje aktivnosti AChE z uporabo Ellmanovega reagenta (5,5' ditiobis-2-nitrobenzojska kislina, DTNB) kot kromogena, pri 20°C, v treh ponovitvah (poreklo kemikalij in encimov: pril. A).

Za merjenje inhibitorne aktivnosti encimov kot posledico prisotnosti NM smo raztopinam AChE (0,05 mL; 100 mM kalijevo-fosfatni pufer, pH = 8,0; končna koncentracije: 2,15 encimskih enot/mL) (AChE iz človeških eritrocitov), 0,06 encimskih enot/mL (ribja AChE) in 0,1 encimskih enot/mL (žuželčja AChE) v mikrocentrifugirkah dodali suspenzije ogljikovih NM (0,01 µL; v dH₂O; končne koncentracije NM: od 0 do 1 mg/mL). Po inkubaciji (10 min, 25 °C) smo dodali Ellmanov reagent (0,1 mL) in substrat AChCl (0,05 mL; 2 mM v 100 mM kalijevo-fosfatnem pufru, pH 8,0). Po naslednji inkubaciji (5 min, 25 °C; razvoj encimske reakcije) smo vzorce centrifugirali (12.000 g, 5 min, 25 °C; Eppendorf centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Nemčija), da je prišlo do ločitve kompleksov NM-AChE od prostega encima. Supernatante (0,21 mL) smo odpipetirali v mikrotitrsko ploščo in izmerili absorbanco pri 405 nm (Microplate Spectrophotometer, MRX, DYNEX Technologies Inc., Chantilly, Virginija, ZDA), 20 min po dodatku substrata in Ellmanovega reagenta; enako pri kontrolnih mešanicah (0,05mL 100 mM kalijevo-fosfatnega pufra namesto encima).

Za določanje stopnje adsorpcije AChE na NM smo mikrotitrski plošči pripravili na enak način kot za določanje inhibicije, z razliko v postopku: med inkubacijo (10 min, 25 °C) smo vzorce centrifugirali (12.000 g, 5 min, 25 °C) in na mikrotitrsko ploščo odpipetirali supernatante (0,06 mL), v katerih smo pričakovali prisotnost neadsorbiranega encima, dodali Ellmanovega reagent (0,1 mL) in substrat (2 mM AChCl v 100 mM kalijevo-

fosfatnem pufru, pH 8,0; 0,05 mL) ter izmerili absorbanco reakcijske mešanice (405 nm; 20 min po dodatku substrata in Ellmanovega reagenta).

3.6 CELIČNE METODE IN VITRO

3.6.1 Večparametrsko vrednotenje kvarnih učinkov nanodelcev PS-NH₂ in

PS-N(CH₃)₃ na celične kulture *in vitro*

Z metodo večparametrskega vrednotenja učinkov ND na celice (ang. *high content screening analysis*, HCA) smo vrednotili izbrane apoptotske markerje: število celic (smrtnost), spremembe oblik in velikosti jedra (skrčitev), aktivnost mitohondrijev, propustnost plazmaleme, znotrajcelično koncentracijo Ca²⁺, delovanje lizosomov (zakisanje lumna, nabrekanje, povečano število), po 24- ali 72-urni izpostavitvi suspenzijam PS-NH₂ in PS-N(CH₃)₃.

3.6.1.1 Gojenje celičnih kultur *in vitro*

Trajne celične linije človeških astrocit (1321n1), celic pljučnega epitelijskega alveolov (A549) in človeške jetrne celice (HepG2) smo gojili v gojišču za celične kulture *Dulbecco's modified Eagle's medium-glutaMAX* (DMEM) z dodanim fetalnim govejim serumom (ang. *fetal bovine serum*, FBS; 10 %, v/v; op.: za gojenje celic 1321n1 smo FBS toplotno inaktivirali v toplotni kopeli (30 min, 56 °C)) in mešanico antibiotikov penicilina in streptomicina (1 %, v/v), v nadzorovanih pogojih (37 °C, visoka zračna vlažnost, stalni dotok 5 % CO₂). Celice smo subkultivirali (pasaže 2–20) 3-krat tedensko v volumskem razmerju 1:5, tako da smo jih sprali s PBS (3-krat) in izpostavili mešanici tripsina in EDTA (3 min, 37 °C) (poreklo kemikalij in celičnih linij: pril. A).

3.6.1.2 Izpostavitve celic suspenzijam nanodelcev PS-NH₂ in PS-N(CH₃)₃ in analiza

V mikrotitrski plošči smo nasadili 5 · 10³ celic 1232n1, A549 ali HepG2 v 0,1 mL gojišča za celične kulture. Po 24 h smo pod sterilnimi pogoji pripravili sveže suspenzije ND v gojišču za celične kulture (3-kratna vrednost končne koncentracije), jih dodali (0,05 mL) v mikrotitrsko ploščo s celicami; pri kontrolnih skupinah pa dH₂O. Izpostavitvene koncentracije PS-NH₂ (oznake 1 do 9) in PS-N(CH₃)₃ (oznake 1 do 3) so bile 0,03; 0,06; 0,125; 250 in 1 mg/mL. Po inkubaciji (24 ali 72 h, 37 °C) smo 0,05 mL gojišča zamenjali z gojiščem s 3-kratno koncentracijo fluorescenčnih barvil, in sicer Hoechst 33342 (400 nM; identifikacija celičnega jedra), tetrametilrodamin metilester (TMRM, 20 nM; mitohondrijski membranski potencial), TOPRO-3 jodid (800 nM; propustnost plazmaleme) in Fluo-4 (1 μM; identifikacija znotrajcelične vsebnosti Ca²⁺) ali

Lysotracker green (200 nM; identifikacija zakisanosti in poškodb lizosomov (op.: eno ali drugo zaradi omejitve hkratno aktivnih kanalov na inštrumentu). Po inkubaciji v mešanici fluorescentnih barvil (1h, 37 °C) smo žive celice analizirali na inštrumentu HCA (Arrayscan VTI 740; Cellomics, Portland, ZDA). V vsakem vzorcu smo pregledali 10 vidnih polj, na vsakem od 300 do 500 celic. Po enakem postopku smo preverili vpliv supernatantov vseh suspenzij (po ultracentrifugaciji) (podrobnosti izvedbe metode in analize: pril. A).

3.6.1.3 Statistična analiza

Za vsak parameter smo izračunali vrednosti EC_{50}^7 (intenziteta signala iz jedra in lizosomov, znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} , propustnost plazmaleme) ali IC_{50}^8 (število celic, velikost jedra, mitohondrijska aktivnost) v statističnem programu GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, ZDA). Rezultati so prikazani kot povprečje ($\pm$ SD) vsakega polja za vsak parameter pri vseh izpostavitvah, ki smo jih ponovili v treh paralelkah. Morebitne povezave med izmerjenim ζ -potencialom nanodelcev PS v pufru PBS (pH 7,4) in opazovanimi parametri kvarnih učinkov smo ovrednotili s hierarhično klastersko analizo na podlagi evklidske razdalje in metode po Wardu (statistični program R; R Core Team, 2014). Povezave (relativne) med parametri smo grafično predstavili z dendrogramom.

⁷ EC_{50} ali polovična vrednost maksimalne efektivne koncentracije se nanaša na koncentracijo snovi, ki po določenem času izpostavitve sproži odgovor, ki na krivulji odziva za vrednoteni parameter ustreza polovični vrednosti med bazno linijo in maksimalnim odzivom (GraphPad Software, San Diego, ZDA).

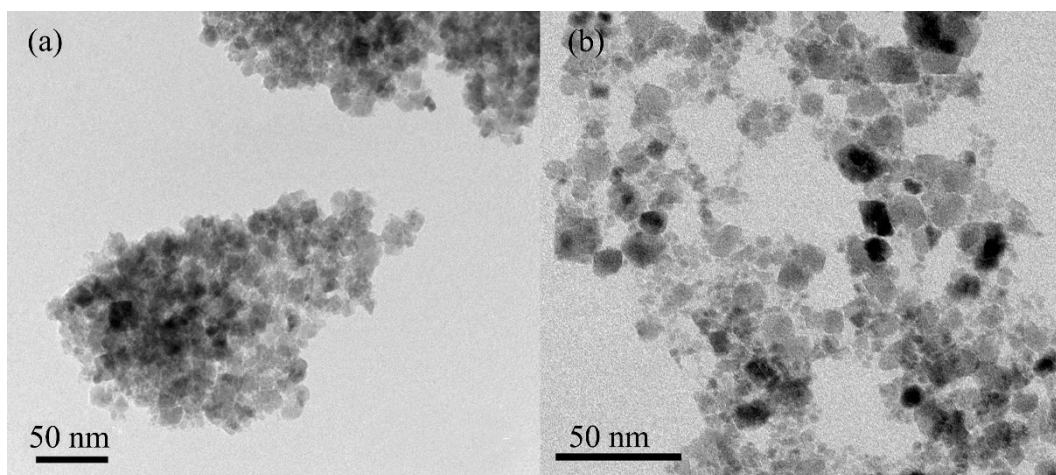
⁸ IC_{50} ali polovična vrednost maksimalne inhibitorne koncentracije je mera učinkovitosti snovi za inhibicijo vrednotenega biološkega odziva in ustreza koncentraciji snovi, ki povzroči 50 % inhibicijo *in vitro* (GraphPad Software, San Diego, ZDA).

4 REZULTATI

4.1 LASTNOSTI IZBRANIH NANOMATERIALOV

4.1.1 Suspenzije nanodelcev CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$

Primarni ND CoFe_2O_4 so imeli velikostni razpon od 5 do 15 nm, oblikovali so tudi večje aglomerate (sl. 3; ocenjeni povprečni premer: 12 ± 3 nm, op.: preračunano s posnetkov TEM, s programsko opremo DigitalMicrograph).



Slika 3: Posnetek TEM CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$.

Nanodelci (a) CoFe_2O_4 in (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$, v dH_2O (pH 7,0). Nanodelci CoFe_2O_4 so bili prisotni v obliki večjih aglomeratov, ki so se oblikovali že v suspenziji. Stabilno suspenzijo $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ smo pripravili z adsorpcijo CA na njihovo površino; manjše skupine posameznih ND in manjši aglomerati so se oblikovali ob sušenju na podporni mrežici TEM, vendar le v eni plasti. Posnetek in analiza: prof. dr. Darko Makovec, IJS, Ljubljana. Povzeto po: Drašler in sod., 2014.

Suspenzija CoFe_2O_4 v dH_2O je imela izoelektrično točko (IET) pri pH $\sim 6,5$ in negativno vrednost ζ -potenciala okoli -10 mV (pH 7,0), v pufru HEPES (10 mM, pH 7,3) okoli -7 mV, v raztopini glukoze (0,3 M, pH 7,0) je primerljiva vrednosti v dH_2O , v PBS-citratnem pufru (pH 7,0) pa kaže na bolj negativni ζ -potencial (-30 mV) (pregl. 1); slednje je najverjetneje posledica adsorpcije citrata iz PBS-citratnega pufra na CoFe_2O_4 . Adsorbiran citrat ustvari močan negativen površinski naboj ND in povzroči premik IET proti nižjim vrednostim pH.

Suspenzija $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ v dH_2O je imela IET pri pH 3 in močno negativno vrednost ζ -potenciala v nevtralnem pH (-38 mV), v 0,3 M raztopini glukoze (pH 7,0) -18 mV, v pufru HEPES (10 mM, pH 7,3) okoli -30 mV in v PBS-citratnem pufru (pH 7,4) -15 mV (pregl. 1).

Preglednica 1: Okvirne vrednosti ζ -potenciala suspenzij ND CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ v dH_2O , 10 mM pufru HEPES, 0,3 M raztopini glukoze in PBS-citratnem pufru

Vzorec ND	Vrednost ζ -potenciala suspenzij ND (mV)			
	dH_2O pH 7,0	10 mM pufer HEPES pH 7,3*	0,3 M raztopina glukoze pH 7,0	PBS-citratni pufer pH 7,4
CoFe_2O_4	-10	-7	-10	-30
$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$	-38	-30	-18	-15

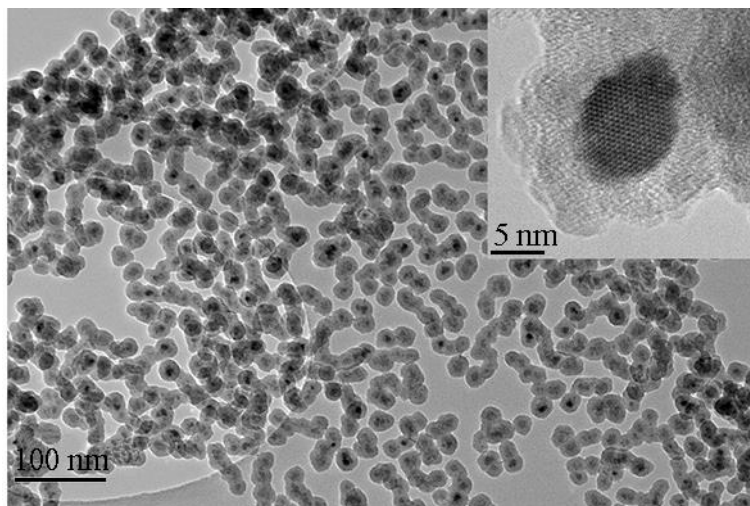
Op.: * vrednost pH 7,3 suspenzij ND v 10 mM pufru HEPES se razlikuje od osnovne izmerjene vrednosti pH 7,0, najverjetneje zaradi časovnega zamika izvedbe karakterizacije suspenzij ND. Pri rezultatih vpliva ND na testirane sisteme navajamo pH svežih suspenzij, uporabljenih v poskusih.

Nanodelci CoFe_2O_4 brez adsorbirane CA, suspendirani v glukozni raztopini, pufru HEPES ali PBS-citratnem pufru, močno aglomerirajo in se hitro posedajo, zato meritve hidrodinamskega premera z metodo DLS niso bile zanesljive; pokazale so prisotnost aglomeratov, večjih od 300 nm (vendar ta vrednost predstavlja le majhen delež aglomeratov, saj so se večji delci posedli iz suspenzije že pred začetkom merjenja).

Suspenzije $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ v vseh testiranih medijih so bile bolj stabilne (sl. B1, pril. B): hidrodinamski premer številske porazdelitve ND v PBS-citratnem pufru (0,1 mg/mL) je bil med 15 in 20 nm, kar sovpada z velikostjo primarnih ND (sl. 3b). V glukozni raztopini so oblikovali manjše aglomerate (na številske porazdelitvi: od 170 do 250 nm, z zelo majhnim deležem aglomeratov, večjih od 1 μm (sl. B1, pril. B), v pufru HEPES pa z večinsko velikostjo okoli 100 nm (številska porazdelitev, rezultati niso prikazani).

4.1.2 Suspenzije nanodelcev Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$

Uporabljeni ND imajo značilno spinelno kristalno strukturo in njihova sestava se sklada s $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Kralj in sod., 2010, 2011), s primarno velikostjo 12 ± 3 nm in 5 nm amorfno homogeno plastjo silicijevega dioksida na površini (sl. 4).



Slika 4: Posnetek TEM $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ s 5 nm debelo plastjo silicijevega dioksida na površini.

Nanodelci $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, suspendirani v dH_2O (pH 7,0). Posnetek in analiza: dr. Slavko Kralj, IJS, Ljubljana.

Izmerjene negativne vrednosti ζ -potenciala suspenzij Fe_2O_3 in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ (PBS-citratni pufer, pH 7,8) (pregl. 2), ki so sicer v vodi pri vrednosti pH 7,8 pozitivno nabiti, so najverjetneje posledica adsorpcije CA iz PBS-citratnega pufera, medtem ko pri izvorno negativno nabitih $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ prisotnost CA ni vplivala na izmerjene vrednosti ζ -potencialov (PBS-citratni pufer, pH 7,8) (pregl. 2).

Zaradi visoke stopnje aglomeracije in hitrega posedanja Fe_2O_3 (brez plasti SiO_2 in vezanih molekul s skupinami $-\text{COOH}$ ali $-\text{NH}_2$) v dH_2O in pufru HEPES nismo izvedli. Povprečne hidrodinamske velikosti $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ v dH_2O in pufru HEPES so v skladu s primarnimi velikostmi maghemitnih ND, kar nakazuje na majhno stopnjo aglomeracije v suspenziji, medtem ko so velikosti $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ v PBS-citratnem pufru višje. Najvišje vrednosti hidrodinamskih velikosti v vseh medijih smo izmerili pri $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ (številski porazdelitev med 100 in 1000 nm), kar nakazuje na slabšo koloidno stabilnost v primerjavi s $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ (med 25 in 40 nm) (pregl. 2).

Preglednica 2: Okvirne vrednosti ζ -potenciala suspenzij ND in hidrodinamskega polmera Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ v dH_2O , 10 mM pufru HEPES in PBS-citratnem pufru

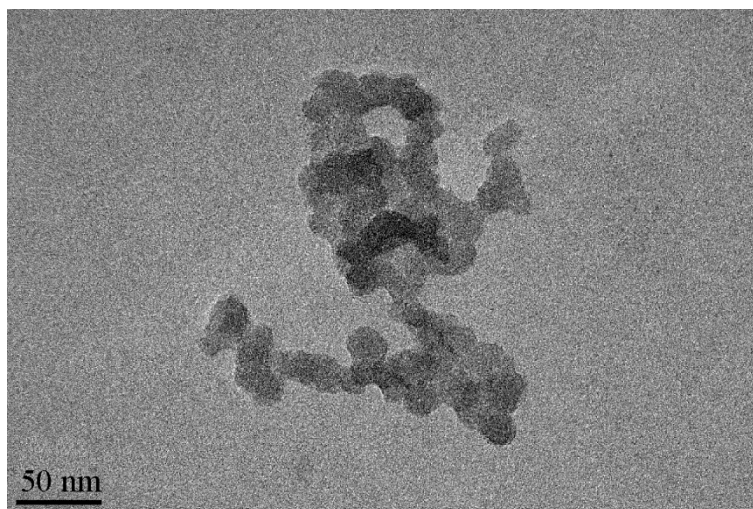
Vzorec ND	Vrednost ζ -potenciala suspenzij ND (mV)			Hidrodinamska velikost ND (nm)		
	dH_2O pH 7,0	10 mM pufer HEPES pH 7,0	PBS- citratni pufer pH 7,8*	dH_2O pH 7,0	10 mM pufer HEPES pH 7,0	PBS-citratni pufer pH 7,8*
Fe_2O_3	3	-5	-31	/	/	~ 203
$\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$	-30	-24	-20	~ 26	~ 30	~ 127
$\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$	-32	-18	-36	~ 38	~ 33	~ 64
$\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$	14	4	-23	~ 47	~ 173	~ 261

Opombe: Vrednosti ζ -potenciala so izmerjene pri ustrežajočih pH suspenzij: *vrednost pH = 7,8 suspenzij ND v PBS-citratnem pufru se razlikuje od vrednosti pufru (pH 7,4), najverjetneje zaradi časovnega zamika izvedbe karakterizacije suspenzij ND. Pri rezultatih vpliva ND na testirane sisteme navajamo pH svežih suspenzij, uporabljenih v poskusih. Oznaka (/) pomeni, da zanesljivih meritev zaradi hitrega posedanja ND v suspenziji ni bilo mogoče izvesti.

4.1.3 Ogljikovi nanomateriali

4.1.3.1 Suspenzije C_{60}

V suspenziji C_{60} v dH_2O (1 mg/mL) so se oblikovali skupki in aglomerati s porazdelitvijo velikosti od 15 do 50 nm (sl. 5). Porazdelitev hidrodinamskih polmerov po masi (0,1 mg/mL v dH_2O) je pokazala dva vrhova velikosti delcev, prvi pri 155 nm in drugi pri večjih aglomeratih (> 1000 nm) (sl. B2a, pril. B), številska porazdelitev pa večinsko prisotnost majhnih ND (~ 2 nm) (sl. B2b, pril. B), kar kaže na oblikovanje aglomeratov molekul C_{60} (premer molekule C_{60} je 0,706 nm, vendar zaradi premajhne velikosti prisotnosti posameznih molekul C_{60} v suspenziji s tehniko DLS ni bilo mogoče dokazati). Meritve ζ -potenciala so pokazale negativni površinski naboj C_{60} (pH 7,0; 0,1 mg/mL, dH_2O) z vrednostjo -26 mV (pregl. 3).



Slika 5: Posnetek TEM skupka C₆₀ v agregiranem stanju.

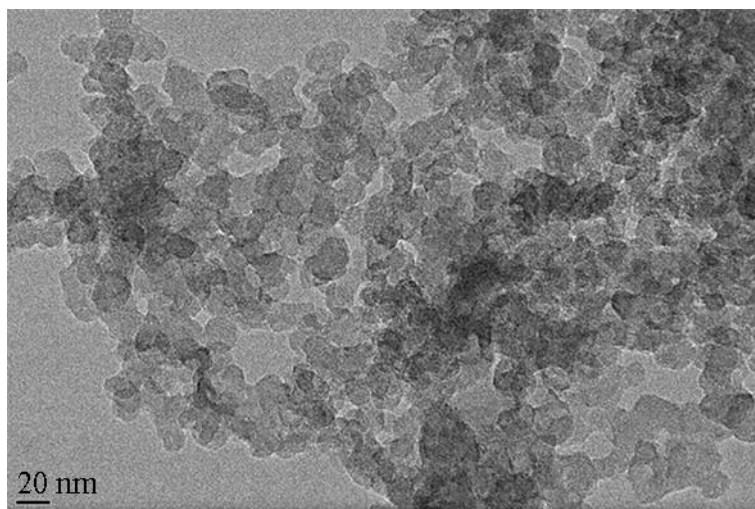
Nanodelci C₆₀ v dH₂O (pH 7,0). Posnetek: prof. dr. Darko Makovec, IJS, Ljubljana. Povzeto po: Zupanc in sod., 2012.

V suspenziji C₆₀ v PBS-citratnem pufru (pH 7,4; 0,5 mg/mL) so se oblikovali aglomerati, večji od 1 μ m (vidni s prostim očesom, v nekaj minutah po koncu mešanja so se posedli v suspenziji); vrednost ζ -potenciala pa smo izmerili -28 mV (PBS-citratni pufer, pH 7,4). Karakterizacije v pufru HEPES nismo izvedli. V suspenziji C₆₀ v H₂O (uporabljena pri encimskih testih; pH 7,1; 0,01 mg/mL) smo zabeležili večinsko prisotnost aglomeratov (premer 80 nm; zelo majhen delež večjih, od 100 do 600 nm) (sl. B3a) ter vrednost ζ -potenciala -36 mV (dH₂O, pH 7,0). V reakcijski mešanici za encime (pH 7,7; 0,01 mg/mL) je bila aglomeracija višja (velikost skupkov na številski porazdelitvi: od 250 nm do nekaj μ m) (sl. B3b, pril. B; pregl. 3).

4.1.3.2 Suspenzije amorfnega ogljika

Nanomaterial CB je amorfne kroglaste oblike s povprečnim premerom 20 nm (sl. 6). Izmerili smo enake vrednosti (-33 mV) ζ -potenciala suspenzij v dH₂O (pH 7,1; 0,01 mg/mL), v reakcijski mešanici za encimske teste (pH 7,7; 0,01 mg/mL) in v PBS-citratnem pufru (pH 7,4) (pregl. 3).

V dH₂O se se oblikovali aglomerati (hidrodinamski polmer od 60 (večinski delež) do 170 nm; sl. B4a, pril. B), v reakcijski mešanici je bila aglomeracija intenzivnejša (največji delež $\sim$ 110 nm, tudi μ m velikosti (sl. B4b, pril. B), v PBS-citratnem pufru pa okoli 100 nm (pregl. 3). V pufru HEPES in raztopini glukoze (0,5 mg/mL) so se skupki, vidni s prostim očesom, posedli v suspenziji; meritev DLS in ζ -potenciala nismo izvedli.



Slika 6: Posnetek TEM skupka CB.

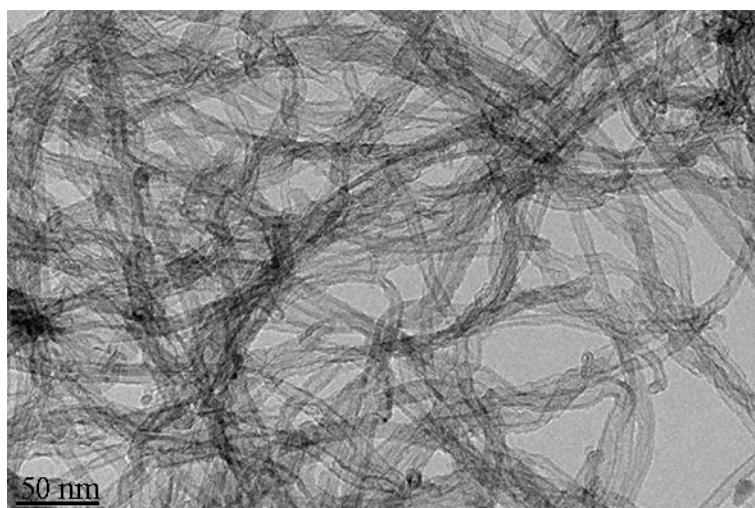
Nanomaterial CB v dH₂O (pH 7,0). Posnetek in analiza: prof. dr. Darko Makovec, IJS, Ljubljana.

4.1.4 Ploščice grafenovega oksida

Po navedbah proizvajalca GO sestavlja 79 % ogljika in 20 % kisika, velikost ploščic je med 0,5 in 5 μm in vsaj 80 % GO je enoplastnega. Meritev DLS ni bila izvedljiva zaradi anizotropne, dvodimenzionalne oblike GO (več μm široke in okoli 1 nm tanke plasti). Vrednosti ζ -potenciala v dH₂O (pH 7,3; 0,01 mg/mL) smo izmerili ~ -21 mV; v reakcijski mešanici za encime (pH 7,7; 0,01 mg/mL) -50 mV, v PBS-citratnem pufru (pH 7,1; 0,1 mg/mL) pa -27 mV (pregl. 3).

4.1.5 Večplastne ogljikove nanocevk

Premer MWCNT je bil s strani proizvajalca ocenjen na ~ 35 do 50 nm (sl. 7). Izmerili smo vrednosti ζ -potenciala v dH_2O (pH 7,3) -21 mV, v reakcijski mešanici za encimske teste (pH 7,7; $0,01$ mg/mL) -50 mV, v PBS-citratnem pufru (pH 7,1; $0,1$ mg/mL) pa -23 mV (pregl. 3).



Slika 7: Posnetek TEM večplastnih ogljikovih nanocevk.

Posnetek in analiza: prof. dr. Darko Makovec, IJS, Ljubljana.

Preglednica 3: Primerjava okvirne vrednosti ζ -potenciala in hidrodinamskih premerov ogljikovih NM C_{60} , CB, GO, MWCNT

Vzorec NM	Vrednost ζ -potenciala suspenzij NM (mV)			Hidrodinamski premer ND (nm)		
	dH_2O pH 7,0 ali 7,3	PBS- citratni pufer pH 7,1 do 7,4	Reakcijska mešanica za encime pH 7,7	dH_2O pH 7,0	PBS- citratni pufer pH 7,1 do 7,4	Reakcijska mešanica za encime pH 7,7
C_{60}	-26	-28	-20	155 in > $1 \mu\text{m}$	> $1 \mu\text{m}$	250 do > $1 \mu\text{m}$
CB	-33	-33	-33	večina 60, tudi do 170	~ 100	~ 110
GO	-21	-50	-27	/	/	/
MWCNT	-21	-23	-50	/	/	/

Opombe: Meritve DLS ploščic in cevk niso bile izvedljive (oznaka /) zaradi anizotropnih oblik GO in MWCNT. Ob interpretaciji je potrebno upoštevati izvorno vrednost vrednosti ζ -potenciala reakcijske mešanice brez dodanim NM (-17 mV).

4.1.6 Polistirenski nanodelci

Hidrodinamski premeri testiranih PS ND v 1 mM NaCl in pufru PBS so podani v pregl. 4. Podvojene vrednosti hidrodinamskega premera, npr. PS-NH₂-1 ali PS-NH₂-2 (v NaCl) ali PS-NH₂-1, PS-NH₂-2, PS-NH₂-5, PS-N(CH₃)₃-1 (v pufru PBS), so (najverjetneje) odraz aglomeracije ND v suspenziji.

Preglednica 4: Izmerjene velikosti TEM, okvirne vrednosti hidrodinamskega premera in ζ -potenciala suspenzij ND PS

Suspenzija ND	TEM velikost (nm)	Hidrodinamski premer (nm)		Vrednost ζ -potenciala (mV)		Relativna količina aminoskupin
		1mM NaCl pH 7,0	Pufru PBS pH 7,4	1mM NaCl pH 7,0	Pufru PBS pH 7,4	
PS-NH ₂ -Bang's	40	54	87	42	29	1
PS-NH ₂ -1	60	122	130	31	4	0,24
PS-NH ₂ -2	80	390	113	2	3	0,02
PS-NH ₂ -3	110	178	158	35	2	0,21
PS-NH ₂ -4	120	183	194	37	2	0,07
PS-NH ₂ -5	115	180	315	54	6	0,34
PS-NH ₂ -6	120	184	180	54	11	0,61
PS-NH ₂ -7	120	167	164	53	7	0,34
PS-NH ₂ -8	145	215	198	48	18	0,73
PS-NH ₂ -9	150	206	193	52	16	0,73
PS-N(CH ₃) ₃ -1	90	124	793	46	15	/
PS-N(CH ₃) ₃ -2	90	116	122	46	16	/
PS-N(CH ₃) ₃ -3	90	123	127	44	1	/
PS	40	53	57	-44	0	/
PS-COOH	40	61	63	-37	0	/

Okrajšave: PS, polistirenski ND brez vezanih molekul s funkcionalnimi skupinami; PS-COOH, PS ND z vezano karboksilno skupino; PS-NH₂-Bang's, komercialni ND PS z vezanimi aminoskupinami; PS-NH₂ 1–9, ND PS z različno količino vezanih aminoskupin; PS-N(CH₃)₃ 1–3 z vezanimi trimetilamonijevimi skupinami. Opombe: Oznaka (/) pomeni odsotnost aminoskupin na površini ND. Relativno količino aminoskupin na površini ND (povzeto po: Wang in sod., 2013) smo prikazali zaradi interpretacije povezave izmerjenega ζ -potenciala in kvarnega učinka ND. Količina aminoskupin je bila določena s kvantifikacijo fluorescamina, ki ob reakciji z aminoskupinami tvori fluorescenčni produkt. Rezultati so normalizirani na vrednost izmerjene fluorescence pri komercialnih ND PS-NH₂-Bang's (Povzeto po: Wang in sod., 2013). S statistično analizo linearne regresije neodvisnih in odvisnih spremenljivk smo ovrednotili pozitivno korelacijo med relativno količino aminoskupin na površini ND in izmerjenimi vrednostmi ζ -potenciala v NaCl (1 mM, pH 7,0) (vrednost 0,08609) in v pufru PBS (9,2•e⁻⁰⁶; oznaka: ***, p < 0,001).

Pozitivne absolutne vrednosti ζ -potenciala PS-NH₂ in PS-N(CH₃)₃ (v NaCl; pH 7,0; 0,1 mg/mL) so posledica prisotnosti aminoskupin ali trimetilamonijevih skupin na površini ND. Izmerjene vrednosti ζ -potenciala PS in PS-COOH v pufru PBS (pH 7,4; ~ 0 mV)

niso sovpadale z vrednostmi v NaCl (izrazito negativne vrednosti; pH 7,0,; pregl. 4); najverjetneje zaradi višje ionske jakosti pufru, kar lahko zasenči naboj na t.i. električni dvojni plasti ali dvosloju⁹ (ang. *electric double layer*).

4.2 VPLIV NANOMATERIALOV NA SPREMEMBE UMETNIH FOSFOLIPIDNIH MEMBRAN

4.2.1 Vpliv nanomaterialov na orjaške unilamelarne vezikle

4.2.1.1 Primerljivost kontrolnih izpostavitvev

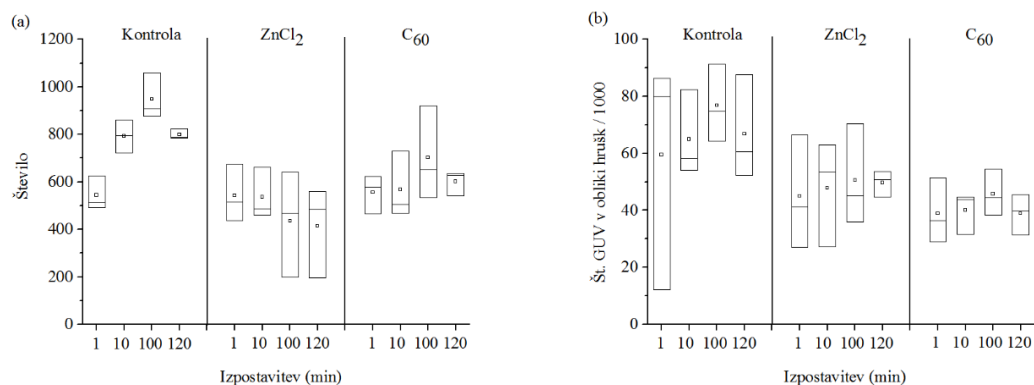
Po dodatku dH₂O ali raztopine glukoze (0,3 M; pH 7,4) smo zabeležili povečano število GUV (sl. B5, pril. B); največ v prvih 20 ali 30 min (pregl. B1, pril. B), najverjetneje zaradi gravitacijskega posedanja GUV. Z daljšim časom izpostavitve smo zabeležili manjšanje premera GUV (sl. B6, pril. B); večji, težji GUV so se hitreje zbirali na dnu eksperimentalne kamrice kot manjši, lažji in višjo stopnjo ekscentričnosti (odmik od popolne sfere) (sl. B7, pril. B). Dodatek različnih medijev, t.j. dH₂O ali raztopine glukoze, ni vplival na spremembe vrednotenih parametrov (sl. B8, pril. B).

4.2.1.2 Vpliv nanodelcev C₆₀

Poskus izpostavitve C₆₀ smo izvedli pred optimizacijo metode (izvedba poskusov K1-K3), zato se časi inkubacije, prikaz spremembe števila in oblike GUV (delež hruškasto oblikovanih GUV namesto stopnje ekscentričnosti) razlikuje v primerjavi z ostalimi poskusi, parametra spremembe velikosti GUV nismo vključili v analizo.

Povečano število GUV kontrolne skupine v prvih 10 min (in odsotnost spreminjanja pri daljših časih izpostavitve) kaže na posedanje GUV v prvih min izpostavitve. Dodatek referenčne kemikalije (50 mM ZnCl₂) ali suspenzije C₆₀ (dH₂O; končna koncentracija: 0,1 mg/mL) je povzročilo zmanjšanje števila GUV že v prvih 10 min (sl. 8a). Po 10 ali 100 min izpostavitve je pri kontroli število GUV v obliki hrušk (izraženo na 1000 vseh GUV) naraslo, v vzorcih C₆₀ ali 50 mM ZnCl₂ pa se je zmanjšalo (sl. 8b).

⁹ Električni dvosloj na površini koloidnih delcev je sestavljen iz nabite površine z lokaliziranim nabojem ter koinov (z istoznačnim nabojem kot površina) in protiionov (z nasprotnim nabojem), ki so porazdeljeni v okoliškem mediju (Kogej, 2010).

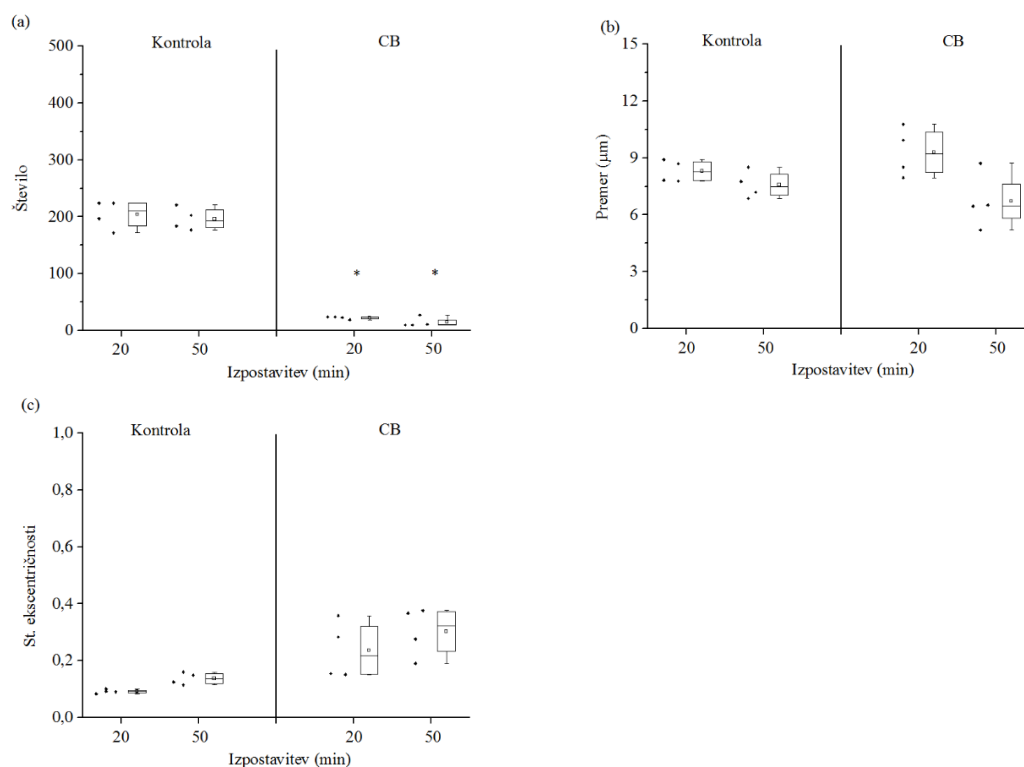


Slika 8: Število GUV vseh oblik ali v obliki hrušk po inkubaciji v dH₂O, ZnCl₂ ali suspenziji C₆₀.

Število (a) GUV vseh oblik, (b) GUV v obliki hrušk pred (1 min) in 10, 100, ali 120 min po dodatku dH₂O (kontrola), ZnCl₂ (50 mM) ali C₆₀ (0,1 mg/mL). Na navpični osi je podana vrednost povprečja števila (a) vseh GUV, zajetih v treh ločenih poskusih ali (b) GUV v obliki hrušk, izraženo na 1000 vseh GUV. Na vodoravni osi so opredeljeni časi izpostavitve (10, 100 in 120 min). V posameznih okvirjih so predstavljene povprečne vrednosti števila GUV na mestih vzorčenja (P1-P3), iz 3 poskusov. V vsakem okvirju je zajeta analiza od 1242 do 2843 GUV. Majhen kvadrat znotraj okvirja predstavlja srednjo vrednost števila GUV, centralna črta mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil. Analiza kontrolnih GUV in C₆₀ je pokazala, da je 94% (2973 od celokupno 3121) vseh zajetih GUV sferične oblike; ostalih 6% smo označili kot nesferične oblike GUV (večinski delež v obliki hrušk; tudi cevasto oblikovani GUV ali GUV v obliki verižic).

4.2.1.3 Vpliv amorfnega ogljika

Inkubacija v suspenziji CB (dH₂O; končna koncentracija 0,05 mg/mL; 20 in 50 min) je povzročila pokanje GUV (zmanjšano število GUV, $p < 0,05$; sl. 9a), medtem ko ni vplivala na statistično značilne spremembe velikosti ali oblike GUV v primerjavi s kontrolo (sl. 9b,c).



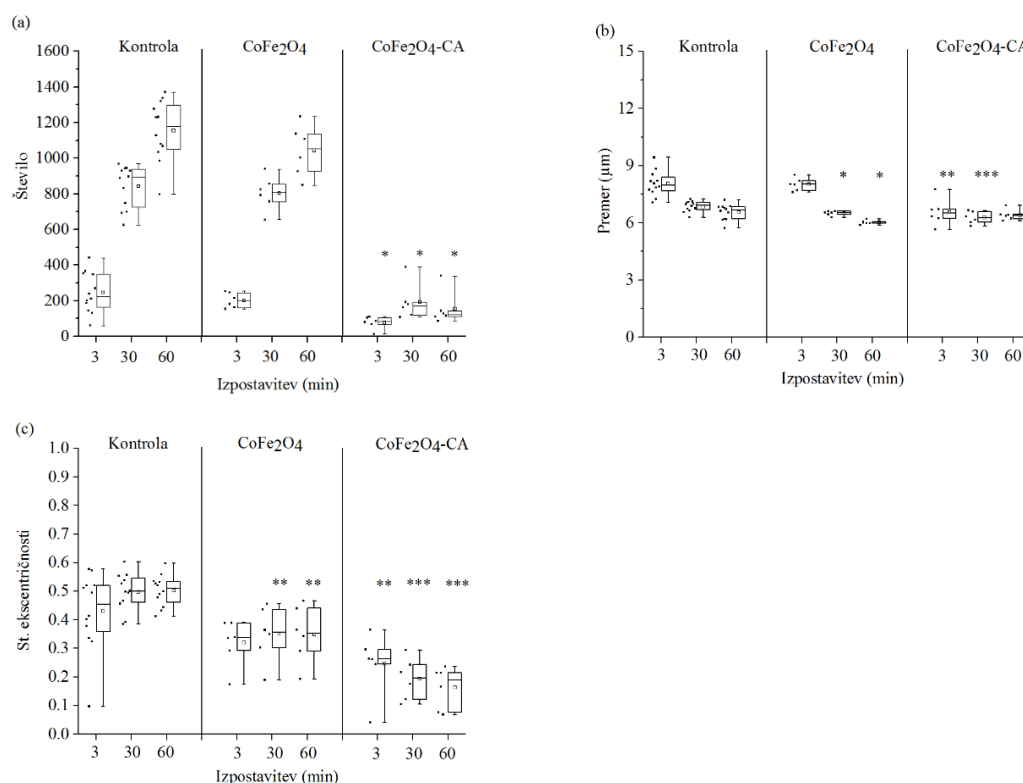
Slika 9: Vpliv inkubacije GUV v suspenziji CB na število, premer in obliko GUV.

(a) Število, (b) premer in (c) stopnja ekscentričnosti GUV po dodatku 0,3 M raztopine glukoze (kontrola), ali suspenzije CB (0,05 mg/mL). Na navpični osi so podane povprečne vrednosti parametrov GUV, zajetih v eni eksperimentalni kamrici, na dveh mestih vzorčenja (P1 in P2), na vodoravni osi pa časi izpostavitve (20 in 50 min). Povprečne vrednosti (a) števila, (b) premera ali (c) stopnje ekscentričnosti GUV v vsaki kamrici pri posameznih časih izpostavitve so ponazorjene s pikami ob levi strani okvirja z ročaji; najvišja in najnižja vrednost z ročaji, povprečje je predstavljeno kot manjši kvadrat v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil. Oznaka *: statistično značilne razlike ($p < 0,05$) v primerjavi s kontrolno skupino.

4.2.1.4 Vpliv CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$

V prisotnosti CoFe_2O_4 (v 0,3 M raztopini glukoze; končna koncentracija: 0,1 mg/mL; 3, 30 ali 60 min) nismo zabeležili od kontrole različnih sprememb števila, velikosti ali oblike GUV (sl. 10), medtem ko so $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ pri enakih pogojih vplivali na statistično značilno zmanjšanje veziklov ($p < 0,05$; sl. 10a; pregl. B2, pril. B) in večje število manjših (sl. 10b), a bolj okroglih (sl. 10c) GUV v primerjavi s kontrolnimi ali izpostavljenimi CoFe_2O_4 . Pri slednjih dveh skupinah je bilo več manjših GUV po 30 ali 60 min (najverjetneje posledica hitrejšega posedanja večjih GUV v ravnino zajema videoposnetkov), medtem ko je dodatek $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (najverjetneje) povzročil pokanje večjih GUV že v prvih 3 min, kar je povzročilo manjšo ovrednoteno stopnjo ekscentričnosti; razlagamo, da slednje ni zaradi vpliva ND, temveč posledica prisotnosti manjših, bolj okroglih GUV, saj so večji GUV bolj podvrženi spontani transformaciji oblike proti elipsoidni (stopnja ekscentričnosti blizu 1) in pokanju (zaradi večje globalne ukrivljenosti membrane).

Supernatant suspenzije $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (1 mg/mL; 0,3 M raztopina glukoze), pripravljen s kombinacijo ultracentrifugacije in izpostavitve zunanjemu magnetnemu polju, ni vplival na vrednotene parametre (sl. B9, pregl. B3, pril. B); potrdili smo, da zabeleženi vpliv $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ ni posledica morebitnih raztopljenih ionov Co ali Fe, ali prisotnosti CA v suspenziji.

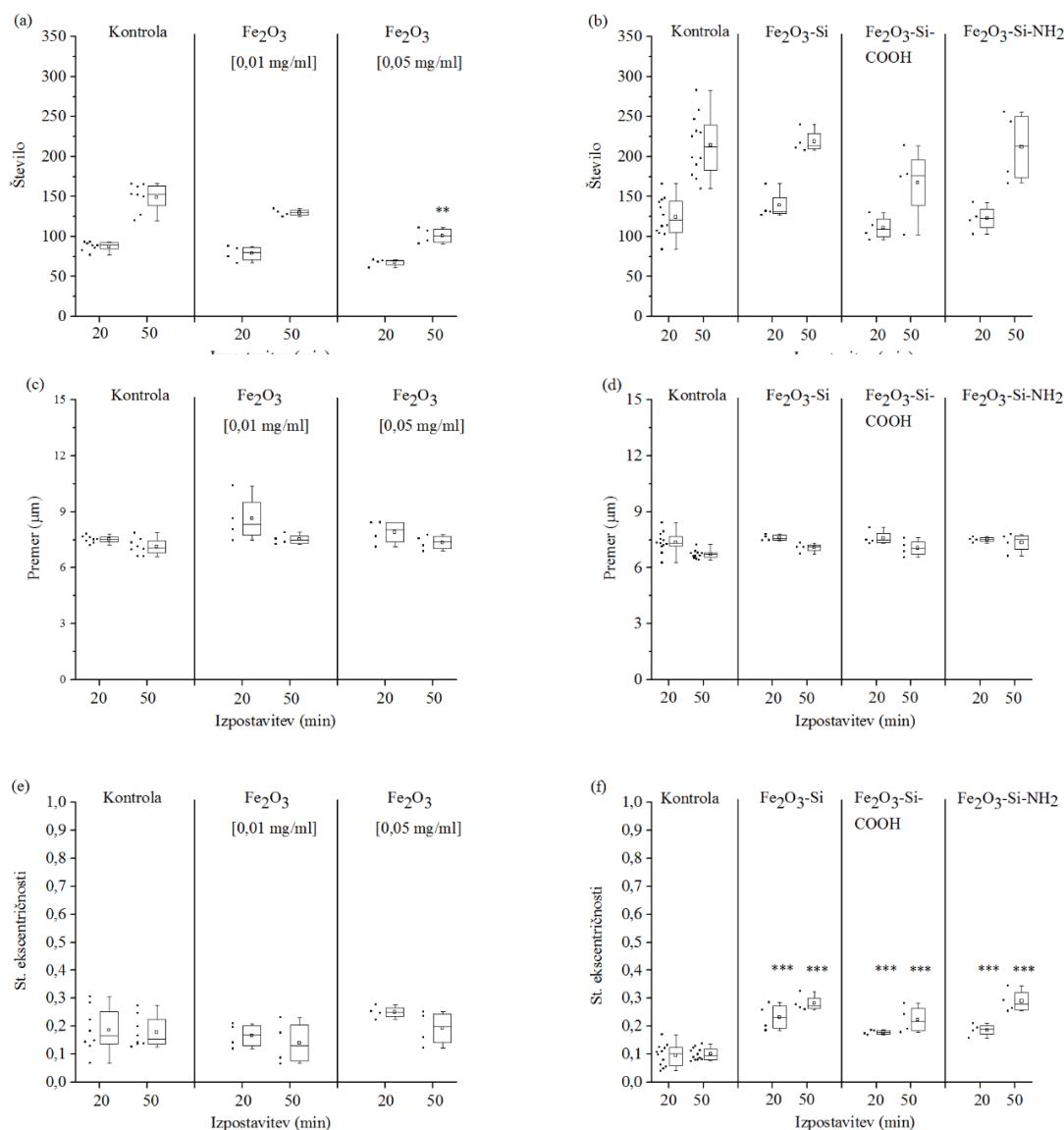


Slika 10: Vpliv inkubacije GUV v suspenziji CoFe₂O₄ ali CoFe₂O₄-CA na število, premer in obliko GUV.

(a) Število, (b) premer in (c) stopnja ekscentričnosti GUV po dodatku 0,3 M raztopine glukoze (kontrola), CoFe₂O₄ (v 0,3 M raztopini glukoze; 0,1 mg/mL) ali CoFe₂O₄-CA (v 0,3 M raztopini glukoze; 0,1 mg/mL). Na navpični osi so podane povprečne vrednosti vrednosti parametrov GUV, zajetih v eni eksperimentalni kamrici, na dveh mestih (P1 in P2), na vodoravni osi pa časi izpostavitve (3 in 30 min; 3, 30 in 60 min ali 20 in 50 min). Povprečne vrednosti (a) števila, (b) premera ali (c) stopnje ekscentričnosti GUV v vsaki kamrici pri posameznih časih izpostavitve so ponazorjene s pikami ob levi strani okvirja z ročaji; najvišja in najnižja vrednost z ročaji, povprečje je predstavljeno kot manjši kvadrat v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil. Oznake *, ** in ***: statistično značilne razlike ($p < 0,05$; $p < 0,01$ in $p < 0,001$) v primerjavi s kontrolno skupino.

4.2.1.5 Vpliv Fe₂O₃, Fe₂O₃-Si, Fe₂O₃-Si-COOH ali Fe₂O₃-Si-NH₂

Inkubacija GUV v suspenzijah Fe₂O₃ (končna koncentracija: 0,01 ali 0,05 mg/mL) ali Fe₂O₃-Si, Fe₂O₃-Si-COOH ali Fe₂O₃-Si-NH₂ (0,05 mg/mL) ni vplivala na število in velikost GUV (izjema manjšega števila pri Fe₂O₃; 0,05 mg/mL; sl. 11a). Bolj eliptično obliko GUV v primerjavi s kontrolo smo zabeležili po izpostavitvi Fe₂O₃-Si, Fe₂O₃-Si-COOH ali Fe₂O₃-Si-NH₂ (pregl. B4, pril. B).



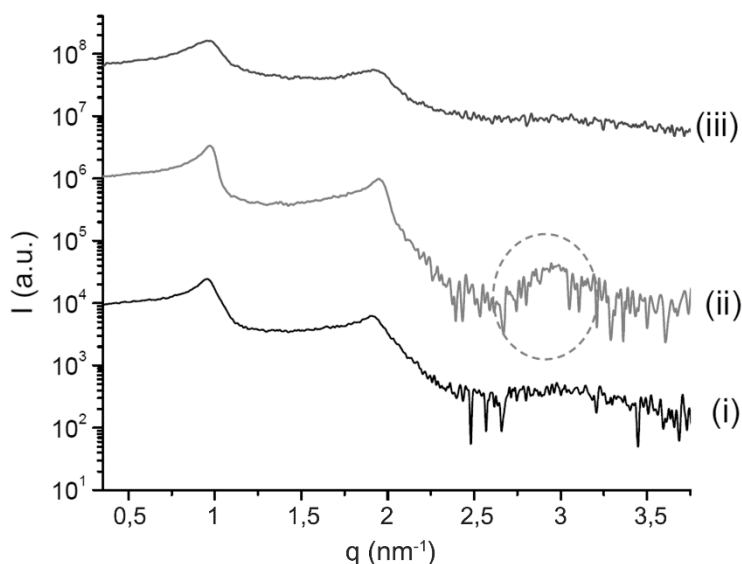
Slika 11: Vpliv inkubacije GUV v suspenziji Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ na število, premer in obliko GUV.

(a) Število, (b) premer in (c) stopnja ekscentričnosti GUV po dodatku 0,3 M raztopine glukoze (kontrola) ali suspenzije Fe_2O_3 (0,01 mg/mL; 0,05 mg/mL), in (d) število, (e) premer in (f) stopnja ekscentričnosti GUV po dodatku 0,3 M raztopine glukoze (kontrola), ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ (0,05 mg/mL). Na navpični osi so podane povprečne vrednosti parametrov GUV, zajetih v dveh eksperimentalnih kamricah, na dveh mestih vzorčenja (P1 in P2), na vodoravni osi pa časi izpostavitve (20 in 50 min). Povprečne vrednosti parametrov v vsaki kamrici pri posameznih časih izpostavitve so ponazorjene s pikami ob levi strani okvirja z ročaji; v vsaki točki je zajeto od 32 do 289 veziklov pri poskusu s Fe_2O_3 (a, b, c) ter od 84 do 258 pri poskusu s $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ (d, e, f). Najvišja in najnižja vrednost v vsaki skupini sta označeni z ročaji, povprečje kot manjši kvadrat v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil. Oznaki ** in ***: statistično značilne razlike (**, $p < 0,01$) ali (***, $p < 0,001$) v primerjavi s kontrolno skupino.

4.2.2 Vpliv nanomaterialov na multilamelarne vezikle

4.2.2.1 Vpliv C_{60} , ovrednoten na konvencionalnem viru SAXS

Inkubacija POPC MLV v suspenziji C_{60} (v dH_2O ; končna koncentracija: 0,1 mg/mL) je povzročila delno stabilizacijo MLV, kar se je odrazilo v večjem številu zaporednih lipidnih dvoslojev N (iz ~ 10 na 30) in pojavu tretjega zaporednega difrakcijskega vrha ($q \sim 3 \text{ nm}^{-1}$, sl. 12, ii, označen s krožnico), hkrati se je razdalja med lipidnimi dvosloji zmanjšala (d ; od 0,1 do 0,2 nm; pregl. B5, pril. B). Pri enako pripravljenem vzorcu, z razliko izpostavljenosti mehanski motnji (ciklom taljenja in zamrzovanja, neposredna izpostavitve), smo zabeležili nasprotno: razbitje MLV, večjo neurejenost dvoslojev ($N \sim 6$), četudi je razdalja med dvosloji – d ostala nespremenjena v primerjavi s kontrolnimi POPC MLV (sl.12 i, iii; razlaga in pregl. B5, pril. B).

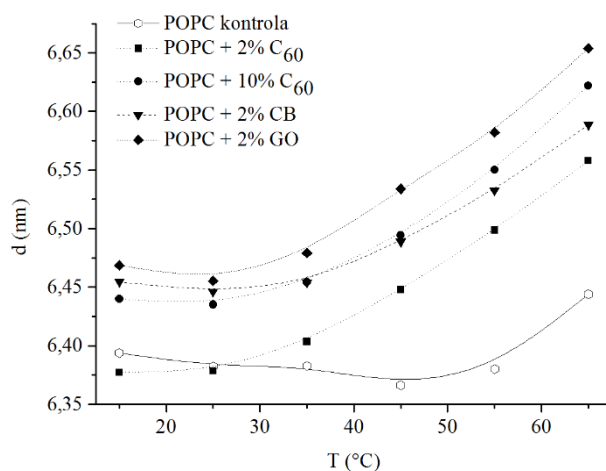


Slika 12: Vpliv C_{60} na vzorec sipanja svetlobe SAXS s POPC MLV.

Sipanje svetlobe s (i) kontrolnega vzorca (dH_2O), (ii) v prisotnosti C_{60} (v dH_2O ; 0,1 mg/mL) ali (iii) v prisotnosti C_{60} (v dH_2O ; 0,1 mg/mL) po 10 ciklih taljenja in zamrzovanja. Vzorec SAXS je prikazan po odštetju signala sipanja svetlobe ozadja (zaradi prisotnosti vode in materialov kapilare). Na navpični osi so podane vrednosti intenzitete (I) sipanja svetlobe v poljubno izbranih enotah (ang. *arbitrary units*, a.u.), na vodoravni osi pa vrednosti sipalnega vektorja q ($q = 2 \pi/d$; v enotah nm^{-1}).

4.2.2.2 Vpliv C_{60} , CB in GO, ovrednoten z metodo SAXS na sinhrotronskem viru sevanja

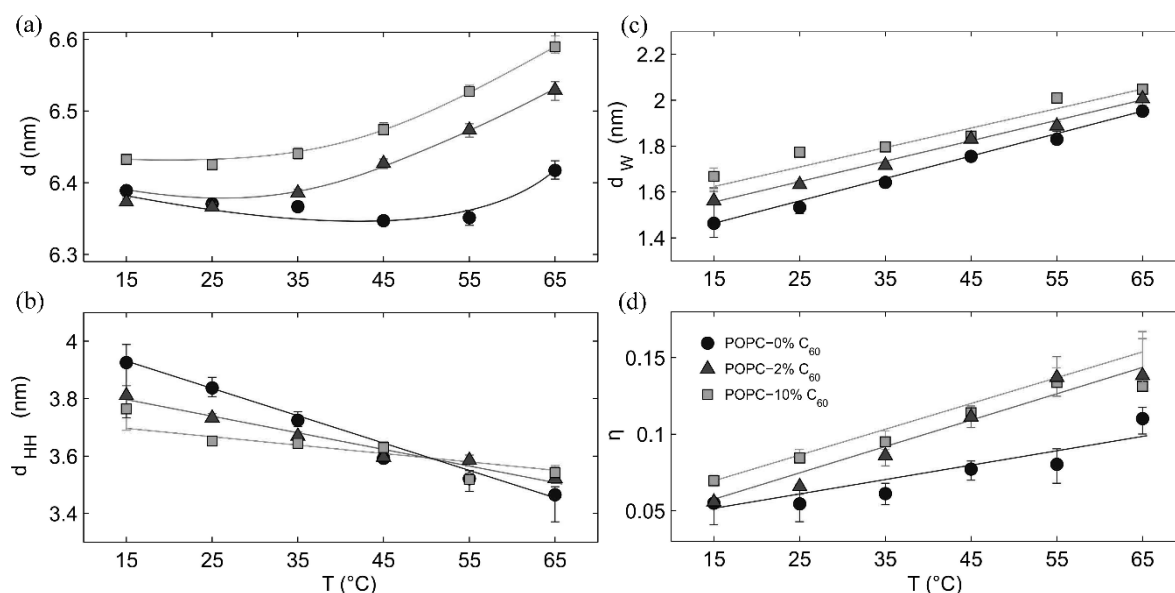
Neposredna izpostavitve POPC MLV C_{60} , CB in GO (NM in lipidi so bili raztopljeni v enakem topilu, $CHCl_3$) je povzročila nabrekanje vseh izpostavljenih vzorcev v primerjavi s kontrolnimi MLV; v temperaturnem obsegu od 15 do 65 °C smo zabeležili povečano razdaljo med lipidnimi dvosloji d , ki vključuje debelino lipidnega dvosloja in vmesne plasti vode; zabeležili smo izrazitejši vpliv višje koncentracije C_{60} , medtem ko je bil vpliv CB ali GO (2 mol. %) primerljiv s tem pri 10 mol. % C_{60} (sl. 13).



Slika 13: Temperaturno odvisni vpliv CB, GO ali C_{60} na razdaljo med lipidnimi dvosloji POPC MLV.

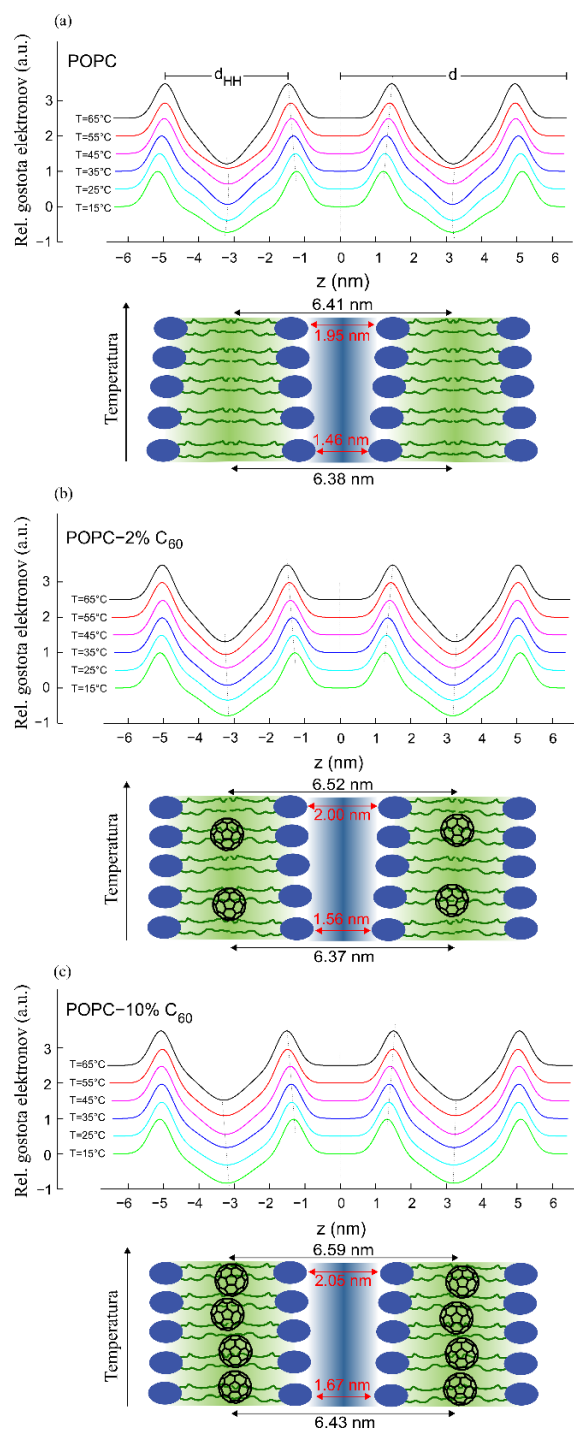
Vpliv CB, GO ali C_{60} na strukturne parametre POPC MLV. Diagram prikazuje razdaljo med lipidnimi dvosloji d POPC MLV v prisotnosti dH_2O (kontrola, $\circ$), C_{60} (2 mol. %, $\blacksquare$) in (10 mol. %, $\bullet$), CB (2 mol. %, $\blacktriangle$) in GO (2 mol. %, $\blacklozenge$), v odvisnosti od temperature (T , °C). Na navpični osi so prikazane vrednosti razdalje med lipidnimi dvosloji d (nm), ki vključuje debelino membrane in vmesnega sloja vode, na vodoravni pa T (°C).

Na podlagi osnovne analize rezultatov vpliva C_{60} , CB in GO in upoštevajoč manjšo velikost C_{60} v primerjavi s ploščicami GO in amorfnimi agregati CB smo nadaljnjo podrobnejšo analizo (modificirana teorija po Caillé; Pabst in sod., 2000, 2003; Rappolt in sod., 2008) interakcij med lipidi in NM izvedli le za C_{60} . Z naraščajočo temperaturo se je pri vseh vzorcih POPC MLV, kontrolnih ali izpostavljenih 2 ali 10 mol. % C_{60} , d_{HH} enakomerno zmanjšala (najverjetneje zaradi povečanih fluktuacij dvosloja ob povišani temperaturi), medtem ko so se vrednosti parametrov d , d_w in η povečale (sl. 14) (razlaga: pril. B). S profila elektronske gostote membran (sl. 15) je razvidno, da se molekule C_{60} lahko kopičijo v hidrofobnem delu dvoslojev, kar lahko vpliva na spremenjeno fluidnost fosfolipidnih membran.



Slika 14: Temperaturno odvisni vplivi C_{60} na strukturne parametre POPC MLV.

Vrednosti membranskih strukturnih parametrov v odvisnosti od temperature kontrolnih POPC MLV (—●—), in v prisotnosti 2 (—▲—) ali 10 mol. % C_{60} (—■—). Na vodoravni osi je podana temperatura T (od 15 °C do 65 °C). Na navpični osi so prikazani membranski parametri: (a) ponavljajoča se razdalja med lipidnimi dvosloji (d), (b) razdalja med polarnimi glavami fosfolipidov (d_{HH}), (c) debelina vmesnega sloja vode (d_w) in (d) fluktuacijski parameter (η).

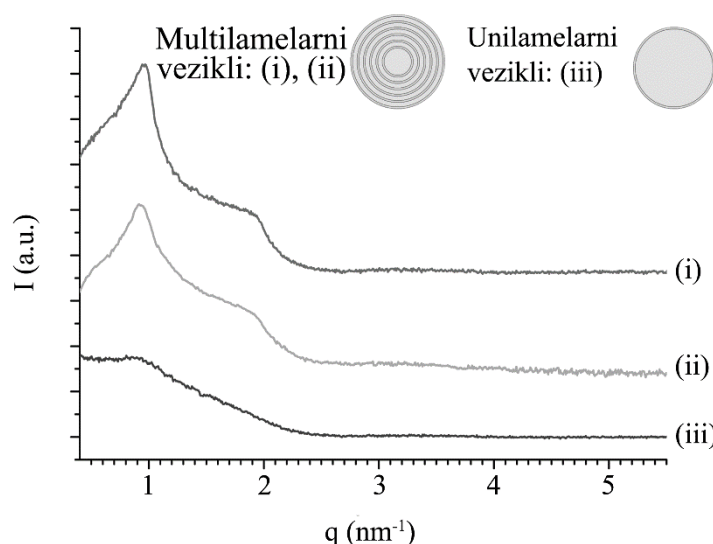


Slika 15: Profil elektronske gostote membran POPC MLV v prisotnosti dH₂O ali C₆₀.

(a) Kontrolni POPC MLV (v dH₂O) in v prisotnosti (b) 2 ali (c) 10 mol. % C₆₀ v temperaturnem območju od 15 °C do 65°C. Na navpični osi je podana relativna elektronska gostota elektronov v posameznih delih membrane (ang. *arbitrary units*, a.u.), na vodoravnih oseh pa razdalja med polarnimi glavami d_{HH} ali med posamezni fosfolipidnimi dvosloji d (v nm). Na ustrezajočih skicah je predstavljen lateralni profil membran z ustrezajočimi d in d_{HH} (a) kontrolnih MLV ali v prisotnosti (b) 2 ali (c) 10 mol. % C₆₀, v odvisnosti od temperature (na navpični osi).

4.2.2.3 Vpliv CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$, ovrednoten z metodo SAXS na konvencionalnem viru sevanja

Prisotnost CoFe_2O_4 (v 0,3 M raztopini glukoze; končna koncentracija: 0,1 mg/mL) v suspenziji POPC MLV, ki smo jo izpostavili mehanski motnji (ciklom taljenja in zamrzovanja), je povzročila dodatno stabilizacijo MLV, manjše povprečno število pozicijsko urejenih dvoslojev N (~ 6 na 5) in širši vrh prvega reda Δq_{exp} na vzorcu sipane svetlobe z MLV v primerjavi s kontrolnimi MLV (sl. 16: i, ii; pregl. B6, pril. B). Prisotnost suspenzije $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ pod enakimi pogoji pa je povzročila razbitje MLV in oblikovanje unilamelarnih veziklov ($N < 2$) in le šibak vrh prvega reda vzorca sipane svetlobe (sl. 16: iii; pregl. B6, pril. B).



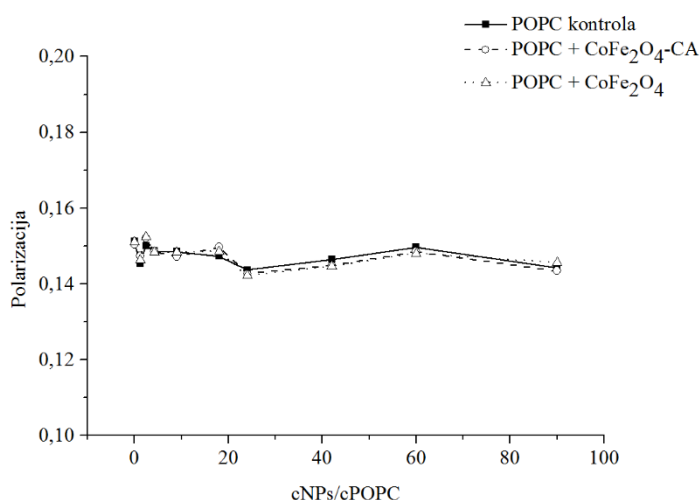
Slika 16: Vpliv CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ na vzorec sipanja svetlobe SAXS s POPC MLV.

(i) Kontrolni MLV (0,3 M raztopina glukoze), (ii) v prisotnosti CoFe_2O_4 (0,1 mg/mL) ali (iii) $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (0,1 mg/mL). Vzorec sipanja svetlobe je prikazan po odštetju signala sipanja svetlobe ozadja (zaradi prisotnosti vodne raztopine in materialov kapilare). Na navpični osi so podane vrednosti intenzitete (I) sipanja svetlobe v poljubno izbranih enotah (ang. *arbitrary units*, a.u.), na vodoravni osi pa vrednosti sipalnega vektorja q ($q = 2\pi/d$).

4.2.3 Vpliv nanomaterialov na fluidnost membran unilamelarnih veziklov

4.2.3.1 Vpliv CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$

Dodatek CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (s titracijo; 0,5 mg/mL ali 0,15 mg/mL v 10 mM pufru HEPES, pH 7,0) ni vplival na spremembe fluidnosti membrane LUV (0,1 mg POPC /mL; molarno razmerje $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{:POPC} = 1,2:1$ do $400:1$, n/n; 25 °C), vrednoteno s hidrofolbno fluorescenčno sondo DPH (1mM) (sl. 17).

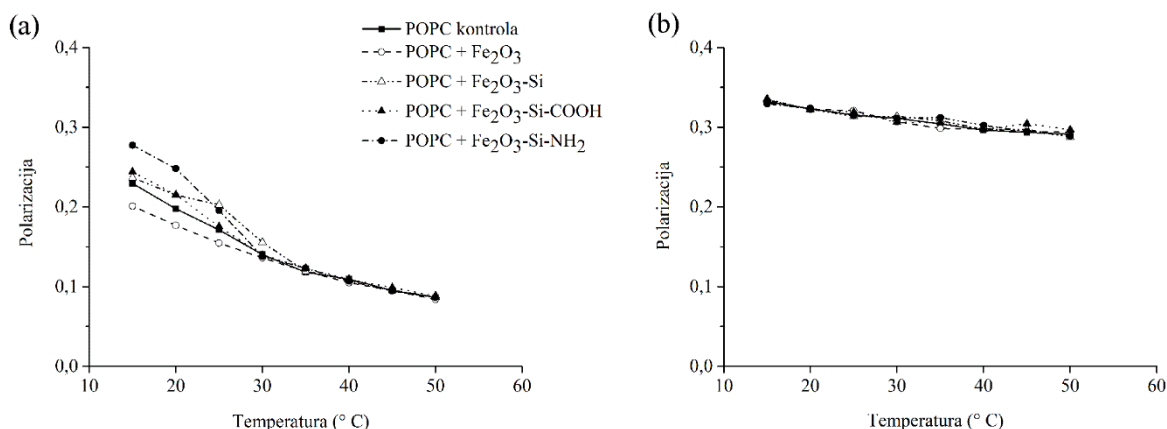


Slika 17: Spremembe fluidnosti membrane POPC LUV v prisotnosti CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$.

Polarizacija hidrofolbne fluorescenčne sonde DPH (1mM), vstavljene v POPC LUV kontrolne skupine (10 mM pufru HEPES, pH 7,0; $\blacksquare$), in LUV, izpostavljenim ND CoFe_2O_4 ($\circ$) ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (Δ). Titracija LUV s suspenzijama različnih koncentracij (0,5 mg/mL ali 0,15 mg/mL v pufru HEPES) je bila izpeljana v ločenih poskusih. Na navpični osi je podana polarizacija (razmerje med intenzitetama vzporednih in pravokotnih emisij), na vodoravni pa molarno razmerje med $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{:POPC}$, od $1,2:1$ do $400:1$; n/n).

4.2.3.2 Vpliv Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$

Dodatek Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ (10 mM pufer HEPES, pH 7,0; končna koncentracija: 0,05 mg/mL) ni vplival na spremembe fluidnosti membran SUV (0,1 mg POPC/mL; od 15 do 50 °C); z naraščajočo temperaturo smo pri vseh vzorcih zabeležili padec vrednosti polarizacije, ne glede na uporabljeni fluorescenčni sonde DPH (1mM; sl. 18a) TMA-DPH (2mM; sl. 18b), pri slednji je bil padec signala manjši. Iz rezultatov intenzitet fluorescence (pri 358 nm in 410 nm) suspenzij Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ sklepamo, da prisotnost testiranih ND ni vplivala na izmerjene vrednosti polarizacije svetlobe s fluorescenčnimi sondami (slednje je potrdila tudi odsotnost signala z obeh sond, inkubiranih v suspenzijah ND brez lipidov; razlaga: pril. B).



Slika 18: Spremembe fluidnosti membrane v prisotnosti Fe₂O₃, Fe₂O₃-Si, Fe₂O₃-Si-COOH ali Fe₂O₃-Si-NH₂.

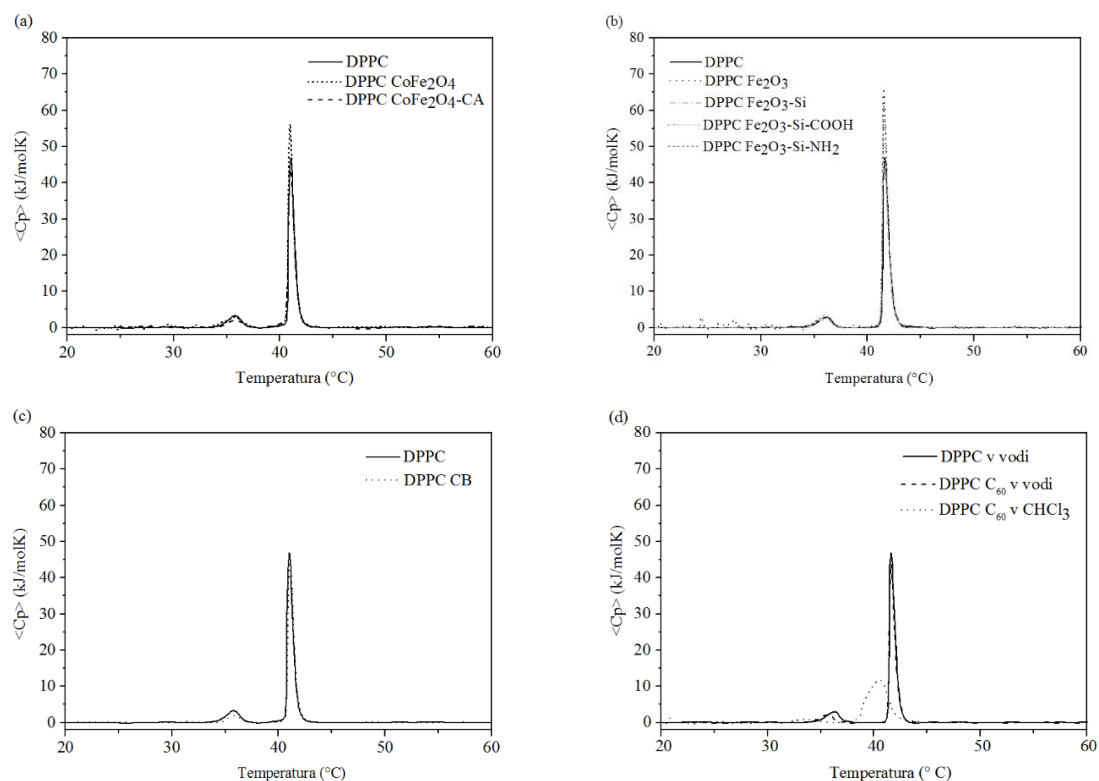
Polarizacija svetlobe s fluorescenčnih sond (a) nepolarne DPH (1mM) in (b) polarne TMA-DPH (2,5 mM) POPC SUV (0,1 mg/mL) ob inkubaciji v pufru HEPES (10 mM, pH 7,0; kontrola; ■) ali suspenzijah Fe₂O₃ (-○-), Fe₂O₃-Si (-△-), Fe₂O₃-Si-COOH (-▲-) ali Fe₂O₃-Si-NH₂ (-◆-), s končnimi koncentracijami: 0,05 mg Fe₂O₃/mL (v 10 mM pufru HEPES; pH 7,0), v odvisnosti od temperature. Na navpični osi je podana polarizacija (razmerje med intenzitetama vzporednih in pravokotnih emisij), na vodoravni osi vrednosti temperature (od 15 do 50 °C). V primerjavi s kontrolo smo zabeležili nižje začetne vrednosti polarizacije v vzorcih Fe₂O₃, ter višje pri ostalih testiranih ND (a); razlike so v okviru eksperimentalne napake, saj je pri nižjih temperaturah (15 do 30 °C) lahko kalibracijski čas inštrumenta daljši.

4.2.4 Vpliv nanomaterialov na toplotni profil multilamelarnih veziklov

Testirane suspenzije CoFe₂O₄, CoFe₂O₄-CA, Fe₂O₃, Fe₂O₃-Si, Fe₂O₃-Si-COOH, Fe₂O₃-Si-NH₂, CB in C₆₀ (v 10 mM pufru HEPES, pH 7,0; v molarjem razmerju DPPC in NM 1:1, n/n) niso povzročile sprememb toplotnih profilov kontrolnih DPPC MLV (10 mM pufer HEPES, pH 7,0; od 20 do 60 °C) (sl. 19). Izmerjene vrednosti temperatur faznega prehoda (T_p), glavnega prehoda (T_m) so bile, razen ob neposredni izpostavitvi C₆₀ (lipidi in C₆₀ raztopljeni v istem topilu, CHCl₃), v skladu s teoretičnimi vrednostmi za DPPC (T_p 35,7 ± 0,2 °C; T_m 41,5 ± 0,5 °C; Lichtenberg in sod., 1984; Boggs, 1987; Riske in sod., 2009; pregl. B7, pril. B).

4.2.4.1 Vpliv C_{60}

Neposredna izpostavitve C_{60} (DPPC in C_{60} raztopljeni v $CHCl_3$) je povzročila razširitev in znižanje vrha glavnega faznega prehoda, premik T_m (z $41,6^\circ C$ na $40,4^\circ C$) in T_p (s $36,2^\circ C$ na $34,0^\circ C$) ter skoraj popolno izginotje vrha faznega predprehoda (sl. 19d, oznaka $\cdots$; pregl. B7, pril. B).



Slika 19: Vpliv $CoFe_2O_4$, $CoFe_2O_4$ -CA, Fe_2O_3 , Fe_2O_3 -Si, Fe_2O_3 -Si-COOH, Fe_2O_3 -Si-NH₂, CB ali C_{60} na toplotni profil DPPC MLV.

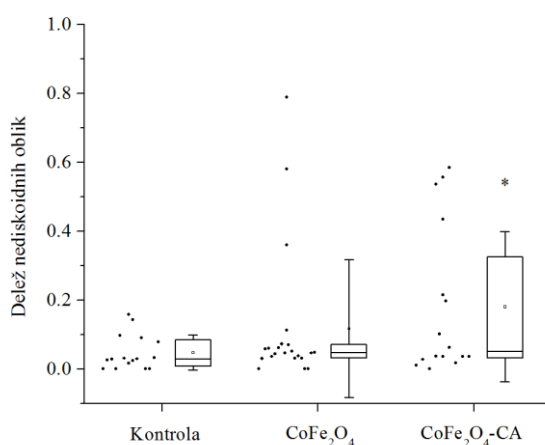
Toplotni profil (a) DPPC MLV v 10 mM pufru HEPES (pH 7,0; kontrola; *polna linija*), DPPC MLV v prisotnosti $CoFe_2O_4$ ($\cdots$) ali $CoFe_2O_4$ -CA ($---$), (b) kontrolni DPPC MLV (*polna linija*), DPPC MLV v prisotnosti Fe_2O_3 ($\cdots$), Fe_2O_3 -Si ($---$), Fe_2O_3 -Si-COOH ($\cdots$ z manjšimi presledki) ali Fe_2O_3 -Si-NH₂ ($---$ z manjšimi presledki), (c) kontrolni DPPC MLV (*polna linija*) ali DPPC MLV v prisotnosti CB ($\cdots$) in (d) kontrolni DPPC MLV (*polna linija*), DPPC MLV v prisotnosti suspenzije C_{60} v dH₂O ($---$), ali C_{60} v $CHCl_3$ ($\cdots$). Na navpični osi so podane izmerjene vrednosti presežne toplotne kapacitete $\langle C_p \rangle$ (kJ/molK), na vodoravni osi pa temperatura ($^\circ C$). Op.: Neenakomerna bazna linija toplotnih krivulj pri nižjih temperaturah je posledica posedanja ND v suspenziji med meritvami, povišan vrh T_m pa najverjetneje odraz adsorpcije NM na zunanji lipidni dvosloj MLV in posledične stabilizacije MLV (vzorci $CoFe_2O_4$, Fe_2O_3 in Fe_2O_3 -Si-NH₂). Vse suspenzije NM, razen C_{60} , so bile pripravljene v 10 mM pufru HEPES (pH 7,0).

4.3 VPLIV NANOMATERIALOV NA BIOLOŠKE MEMBRANE

4.3.1 Vpliv nanomaterialov na morfološke spremembe človeških eritrocitov

4.3.1.1 Vpliv CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$

Izpostavitve (1h, 37 °C) spranih eritrocitov suspenziji $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (v PBS-citratnem pufru, pH 7,4; končna koncentracija: 1 mg/mL) je povzročila večji delež nediskoidnih oblik eritrocitov v primerjavi s kontrolo (*, $p < 0,05$; sl. 20). Tudi inkubacija s CoFe_2O_4 (brez adsorbirane CA) pod enakimi pogoji je povzročila večji delež nediskoidnih oblik, vendar razlike s kontrolno skupino niso bile statistično značilne ($p > 0,05$; sl. 20).



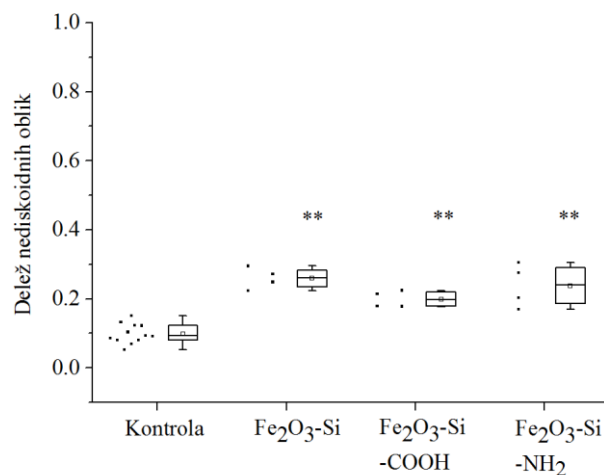
Slika 20: Vpliv CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ na morfološke spremembe eritrocitov (delež nediskoidnih oblik).

Delež nediskoidnih oblik eritrocitov po inkubaciji (1h, 37 °C) v PBS-citratnem pufru (pH 7,4; kontrola), suspenziji CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (v PBS-citratnem pufru, pH 7,4; končna koncentracija: 1 mg/mL). Na navpični osi je podano povprečje vrednosti deležev nediskoidnih oblik, zajetih na petih nosilcih SEM; analiza vsakega nosilca zajema eritrocite na treh do petih lokacijah, pri 500-kratni povečavi, na vodoravni osi pa izpostavljene skupine. Povprečna vrednost deleža nediskoidnih eritrocitov na posameznih lokacijah je ponazorjena s pikami ob levi strani okvirja z ročaji; pri kontroli je zajeta analiza 3390 celic, CoFe_2O_4 2737 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ 5520 celic. Najvišja in najnižja vrednost v skupini sta označeni z ročaji, povprečje kot manjši kvadrat v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil. Oznaka *: statistično značilne razlike ($p < 0,05$) v primerjavi s kontrolno skupino. Op.: Za prikaz rezultatov različnih oblik eritrocitov smo vse tipe nediskoidnih eritrocitov združili v isto skupino. Pri kontroli pojava ehinocit nismo zabeležili; pri $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ je bil delež ehinocit večji v primerjavi z vzorcem eritrocitov, izpostavljenih suspenziji CoFe_2O_4 .

S kvantitativno kemijsko analizo (EDS) izbranih mest na površini eritrocitov smo potrdili prisotnost materiala z vsebnostjo Co in Fe pri vzorcih, izpostavljenih CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$, vendar eritrociti niso bili na gosto prekrti z NM (pregl. B8-B10; sl. B10-B12, pril. B).

4.3.1.2 Vpliv $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$

Izpostavitev (1h, 37 °C) spranih eritrocitov suspenzijam $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ (v PBS-citratnem pufru, pH 7,4; končna koncentracija: 0,5 mg/mL) je povzročila večji delež nediskoidnih oblik eritrocitov v primerjavi s kontrolnimi vzorci, (*, $p < 0,05$; sl. 21), vendar razlik med različno ND z različnimi lastnostmi površine nismo zabeležili (sl. 21).

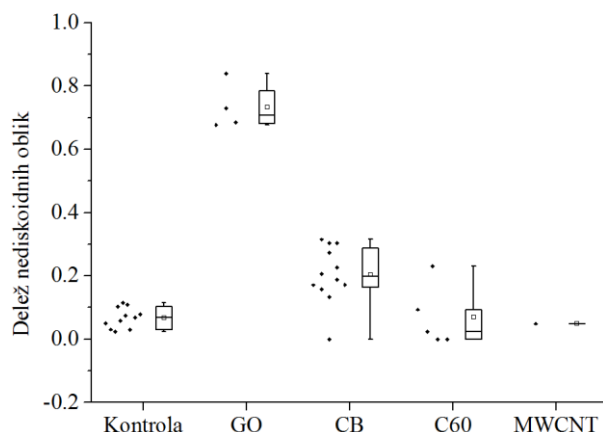


Slika 21: Vpliv $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ na morfološke spremembe eritrocitov (delež nediskoidnih oblik).

Delež nediskoidnih oblik eritrocitov po inkubaciji (1h, 37 °C) v PBS-citratnem pufru (pH 7,4; kontrola), suspenzijam $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ (v PBS-citratnem pufru, pH 7,4; končna koncentracija: 0,5 mg/mL). Na navpični osi je podano povprečje vrednosti deležev nediskoidnih oblik, zajetih na petih nosilcih SEM; analiza vsakega nosilca zajema eritrocite na treh do petih lokacijah, pri 500-kratni povečavi, na vodoravni osi pa izpostavljene skupine. Povprečna vrednost deleža nediskoidnih eritrocitov na posameznih lokacijah je ponazorjena s pikami ob levi strani okvirja z ročaji; pri kontroli je zajeta analiza 2830 celic, v skupini $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$ 1828, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ 1292 in 1506 pri $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$. Najvišja in najnižja vrednost v skupini sta označeni z ročaji, povprečje kot manjši kvadrat v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil. Oznaka **: statistično značilne razlike ($p < 0,01$) v primerjavi s kontrolno skupino. Op.: Za prikaz rezultatov različnih oblik eritrocitov smo vse tipe nediskoidnih eritrocitov združili v isto skupino.

4.3.1.3 Vpliv GO, CB, C₆₀ in MWCNT

Izpostavitev (1h, 37 °C) spranih eritrocitov suspenzijam C₆₀ ali MWCNT (v PBS-citratnem pufru, pH 7,4; končna koncentracija: 0,5 mg/mL) ni vplivala na spremembe oblike eritrocitov v primerjavi s kontrolno skupino ($p > 0,05$). Inkubacija eritrocitov v suspenziji GO ali CB je pod enakimi pogoji vplivala na večji delež nediskoidnih oblik eritrocitov (sl. 22).



Slika 22: Vpliv GO, CB, C₆₀ ali MWCNT na morfološke spremembe eritrocitov (delež nediskoidnih oblik).

Delež nediskoidnih oblik eritrocitov po inkubaciji (1h, 37 °C) v PBS-citratnem pufru (pH 7,4; kontrola), suspenzijam GO, CB, C₆₀ ali MWCNT (v PBS-citratnem pufru, pH 7,4; končna koncentracija: 0,5 mg/mL). Na navpični osi je podano povprečje vrednosti deležev nediskoidnih oblik, zajetih na petih nosilcih SEM; analiza vsakega nosilca zajema eritrocite na treh do petih lokacijah, pri 500-kratni povečavi, na vodoravni osi pa izpostavljene skupine. Povprečna vrednost deleža nediskoidnih eritrocitov na posameznih lokacijah je ponazorjena s pikami ob levi strani okvirja z ročaji; pri kontroli je zajeta analiza 1797 celic, v skupini GO 137, CB 549, C₆₀ 276 in MWCNT 814 celic. Najvišja in najnižja vrednost v skupini sta označeni z ročaji, povprečje kot manjši kvadrat v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil. Op.: Za prikaz rezultatov različnih oblik eritrocitov smo vse tipe nediskoidnih eritrocitov združili v isto skupino. Zaradi majhnega števila podatkov nismo izvedli statistične primerjave izpostavljenih skupin s kontrolno skupino.

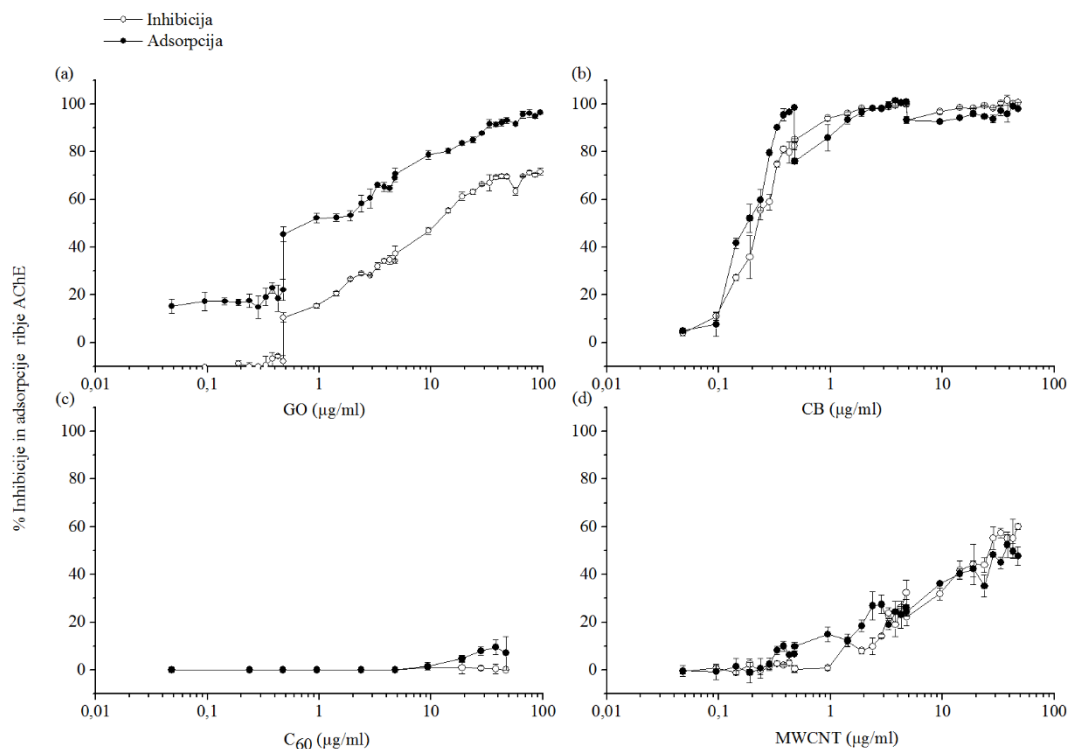
4.3.2 Mikrovezikulacija eritrocitnih membran

Na posnetkih SEM smo opazili pojav struktur okrogle oblike, ki so lahko posledica mikrovezikulacije eritrocitov. Prisotnosti membranskih veziklov nismo vrednotili z drugimi metodami, zato ne izključujemo, da so strukture preprosti celični fragmenti, nastali kot posledica morebitnega razpada celic med pripravo vzorcev. Strukture okrogle oblike smo opazili pri kontrolnih skupinah in v prisotnosti Fe₂O₃-Si, Fe₂O₃-Si-COOH ali GO (opis in posnetki SEM: sl. B12, pril. B).

4.4 VPLIV OGLJIKOVIH NANOMATERIALOV NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZ

4.4.1 Inhibicija in adsorpcija ribje acetilholinesteraze na NM

Zabeležili smo adsorpcijo ribje AChE na CB, GO, MWCNT in C₆₀, najmanj izrazita je bila pri C₆₀. Razen C₆₀ so vsi testirani NM povzročili tudi inhibicijo delovanja AChE (sl. 23). Pri GO je bila stopnja adsorpcije encima na NM izrazitejša od inhibicije delovanja AChE (sl. 23a) in podobno, a manj izrazito, tudi pri C₆₀ (sl. 23c). Nanomateriala CB in MWCNT (sl. 23b,d) sta povzročila približno enako stopnjo adsorpcije AChE na NM in inhibicije encima; inhibicijo smo zabeležili že pri nižjih koncentracijah CB (< 0,01 mg/mL). Rezultati kažejo, da ima izmed testiranih NM CB najvišjo afiniteto do ribje AChE (dodatni opis rezultatov: pril. B).

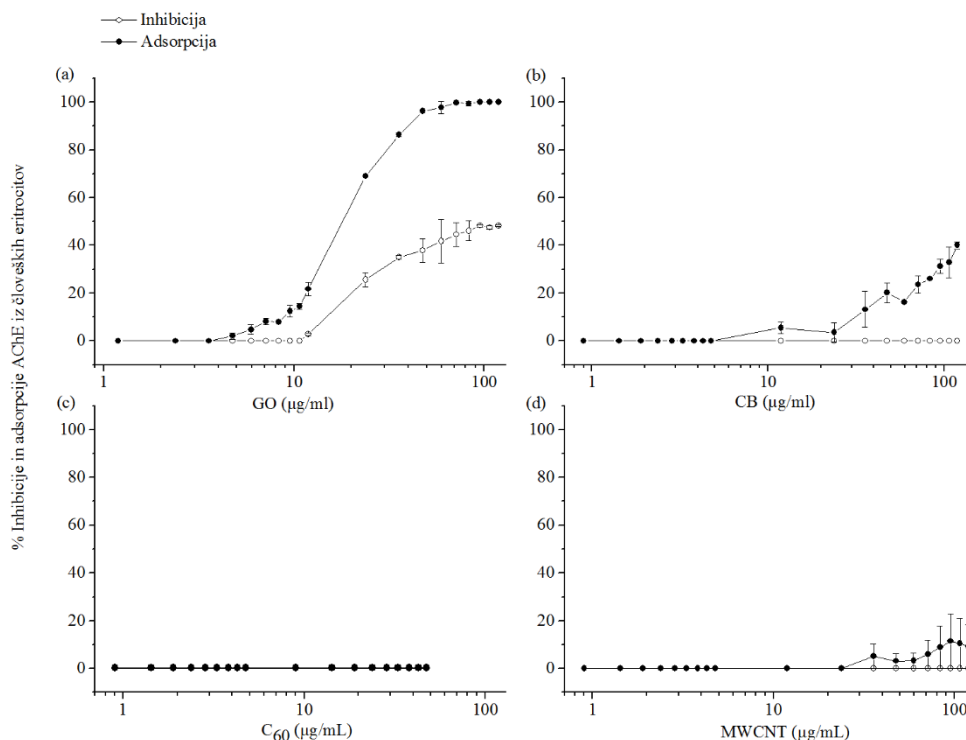


Slika 23: Inhibicija ribje AChE v prisotnosti ogljikovih NM GO, CB, C₆₀ ali MWCNT ter adsorpcija encima na NM.

Inhibicija delovanja AChE ali adsorpcija encima v prisotnosti NM (a) GO, (b) CB, (c) C₆₀ ali (d) MWCNT. Na vodoravni osi so prikazane izpostavitvene koncentracije NM (0,00048 do 0,0476 mg/mL; v logaritemski skali od 0,01 do 100 µg/mL), na navpični pa % inhibicije AChE (○-○) ali adsorpcije encima na NM (●-●), določeni s prilagojeno metodo po Ellmanu. Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost (± SD) treh neodvisnih poskusov.

4.4.2 Inhibicija in adsorpcija acetilholinesteraze iz človeških eritrocitov na NM

Zabeležili smo bistveno manj izrazit vpliv NM na AChE iz človeških eritrocitov (sl. 24) v primerjavi z vplivom na ribjo AChE pri enakih pogojih (sl. 23). Razen C₆₀ so vsi testirani NM povzročili višjo stopnjo adsorpcije AChE iz človeških eritrocitov na NM v primerjavi z inhibicijo encima (sl. 24); GO najvišji stopnji adsorpcije in inhibicije (sl. 24a); CB in MWCNT sta povzročila adsorpcijo AChE na NM v odsotnosti inhibicije encima (sl. 24b,d), po izpostavitvi C₆₀ pa vpliva na adsorpcijo encima na NM ali inhibicijo delovanja encima nismo zabeležili (sl. 24c) (dodatni opis rezultatov: pril. B).

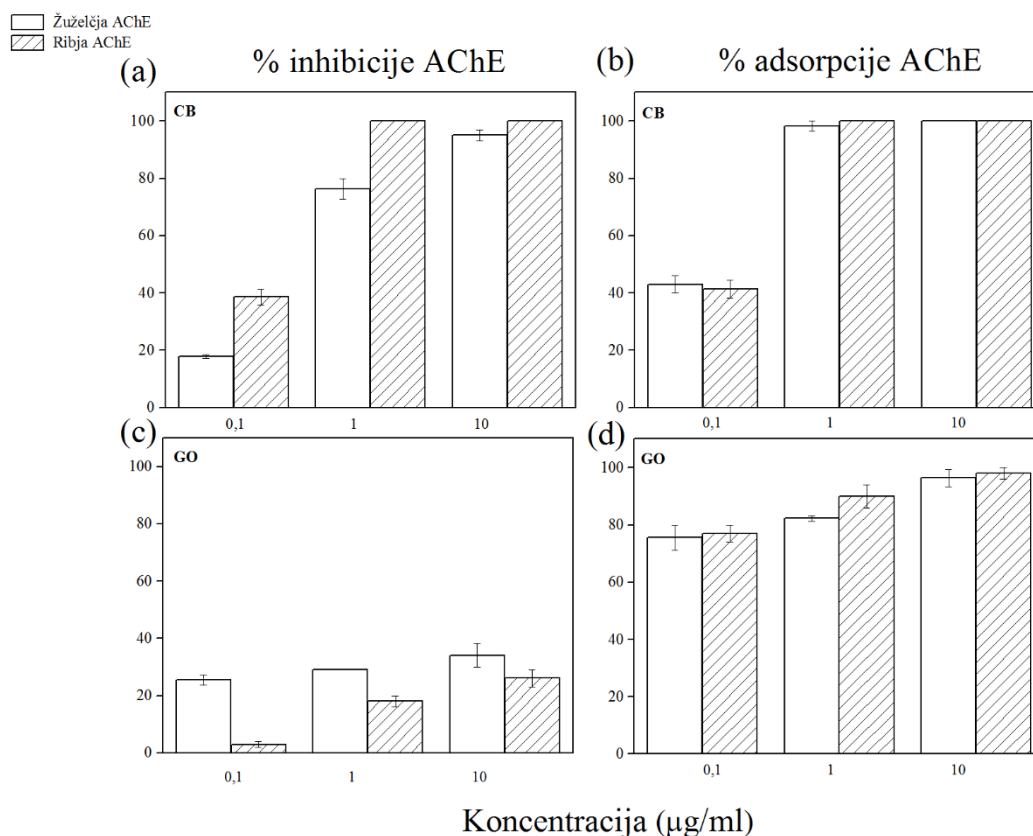


Slika 24: Inhibicija AChE iz človeških eritrocitov v prisotnosti ogljikovih NM GO, CB, C₆₀ ali MWCNT ter adsorpcija encima na NM.

Inhibicija ali adsorpcija encima v prisotnosti (a) GO, (b) CB, (c) C₆₀ ali (d) MWCNT. Na vodoravni osi so prikazane izpostavitvene koncentracije NM (0,0009 do 0,119 mg/mL; C₆₀: od 0,0009 do 0,04762 mg/mL; v logaritemski skali od 0,7 do 130), na navpični pa % inhibicije AChE (○-○) ali adsorpcije encima na NM (●-●), določeni s prilagojeno metodo po Ellmanu. Vsaka točka predstavlja srednjo vrednost ($\pm$ SD) treh neodvisnih poskusov.

4.4.3 Primerjava vpliva NM na vretenčarsko in nevretenčarsko acetilholinesterazo

Zabeležili smo podoben trend vpliva CB in GO na vretenčarski (*E. electricus*; ribja AChE) in nevretenčarski encim (*D. melanogaster*; žuželčja AChE). Zabeležili smo izrazitejši vpliv CB na inhibicijo ribje AChE in GO na inhibicijo žuželčje AChE (sl. 25; dodatni opis rezultatov: pril. B).



Slika 25: Primerjava vpliva CB in GO na nevretenčarski (žuželčja AChE) in vretenčarski (ribja AChE) encim.

Stopnja inhibicije (a) CB in (c) GO ter stopnja adsorpcije nevretenčarskega (*D. melanogaster*; žuželčja AChE) in vretenčarskega encima (*E. electricus*; ribja AChE) encima na NM (b) CB in (d) GO. Na vodoravni osi so prikazane koncentracije NM (0,0001; 0,001 in 0,01 mg/mL; označene v enotah µg/mL). Na navpični osi so podani % inhibicije AChE ali adsorpcije encima na NM, določeni s prilagojeno metodo po Ellmanu, po 10 min inkubaciji encima in NM. Povzeto po: Mesarič in sod., 2013.

4.5 KVARNI UČINKI POLISTIRENSKIH NANODELCEV NA CELIČNE KULTURE

Z metodo HCA smo vrednotili kvarne učinke polistirenskih ND na celične linije astrocit (1321n1), celic pljučnega epitelijskega (A549) ali hepatocit (HepG2) po 24 h (akutna toksičnost) ali 72 h (kronična toksičnost) izpostavitvi polistirenskih ND. Spremljali smo odziv populacije celic na več nivojih hkrati: število celic, morfologija in velikost jedra, mitohondrijski membranski potencial, propustnost plazmaleme ter znotrajcelično koncentracijo Ca^{2+} in odziv na nivoju lizosomov.

4.5.1 Kvarni učinki PS-NH₂ (z različno količino aminoskupin na površini)

Statistično značilne korelacije (hierarhična klasterijska analiza; Evklidske razdalje, metode po Wardu, sl. B14, pril. B) med izmerjenimi vrednostmi ζ -potenciala PS-NH₂ v pufru PBS (oz. relativno količino aminoskupin na površini ND) in katerimkoli vrednotenim parametrom nismo opazili, prav tako ne med posameznimi parametri (končne koncentracije ND: 0,03; 0,06; 0,125; 0,25 ali 1 mg/mL).

Izpostavitev celičnih linij (24 ali 72h; 37 °C) ND PS ali negativno nabitim PS-COOH (negativni referenčni material; ζ -potencial v pufru PBS, pH 7,4; okoli 0 mV, okvirna hidrodinamska velikost 50 ali 63 nm) ni povzročila odziva celic, različnega od kontrolnih skupin (dodatek dH₂O). Prav tako nismo opazili kvarnega učinka (po 24 ali 72 h) supernatantov vseh suspenzij ND, pridobljenih z ultracentrifugacijo, pri enakih izpostavitvenih koncentracijah kot ND. Pozitivni referenčni material (PS-NH₂-Bang's; 30 mV, 87 nm) je povzročil izrazito apoptozo vseh treh celičnih linij (že pri koncentraciji 0,05 mg/mL; po 24 ali 72 h).

Zabeležili smo razlike v odzivu celic, izpostavljenih suspenzijam PS-NH₂ z naraščajočimi izmerjenimi vrednostmi ζ -potenciala (pufer PBS, pH 7,4), vendar odsotnost povezave med parametri. Najbolj občutljiva parametra sta bila znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} in signal iz lizosomov pri večini testiranih ND. Pri PS-NH₂-6 (ζ -potencial v pufru PBS, pH 7,4: 11,4 mV; hidrodinamski premer: 180 nm) pa smo po 24 h, in še bolj izrazito po 72 h, zabeležili spremembe vseh parametrov, razen pri lizosomih in znotrajcelični koncentraciji Ca^{2+} . Na podlagi izračunanih vrednosti EC₅₀ ali I₅₀ (pregl. B11, B12, pril. B) smo zaključili, da so astroцитi najbolj občutljive izmed testiranih celičnih linij, sledijo pljučne celice in nazadnje jetrne celice (opis: pril. B).

4.5.2 Kvarni učinki PS-N(CH₃)₃ (s stalnim pozitivnim površinskim nabojem)

Zabeležili smo povišan signal iz lizosomov astrocit po izpostavitvi (24h, 37 °C) PS-N(CH₃)₃-1 (ζ -potencial v pufru PBS, pH 7,4: 15 mV; hidrodinamski premer aglomeratov: 793 nm) ali PS-N(CH₃)₃-2 (16 mV, 122 nm) in povišano znotrajcelično koncentracijo Ca²⁺, v odsotnosti sočasne skrčitve jedra ali izrazito zmanjšanega števila celic (pregl. B11, pril. B), kar je najverjetneje odraz podvojene količine DNA v jedru brez posledične celične delitve; do celične smrti je prišlo le pri višjih koncentracijah (0,1 mg/mL). Po daljši izpostavitvi (72h, 37 °C) smo zabeležili podoben, a izrazitejši trend celičnega odgovora, le signal iz lizosomov je ostal nespremenjen (pregl. B12, pril. B).

Vpliva PS-N(CH₃)₃-3 (~ 1mV, 127 nm) na vse testirane celične linije (po 24 ali 72 h, 37 °C) nismo zabeležili (pregl. B11, B12, pril. B).

Povzetek rezultatov kvarnega učinka polistirenskih ND na izbrane celične linije je podan v pregl. 5, vpliv ostalih NM pa je povzet v pregl.6.

Preglednica 5: Povzetek vpliva testiranih polistirenskih nanodelcev na izbrane celične linije: astrocite, celice pljučnega epitelijskega in hepatocite

Testni sistem Celične linije in vitro: <i>astrociti, celice pljučnega epitelijskega, hepatociti</i>	Vrednoteni parametri: <i>število celic,</i> <i>morfologija jedra, velikost jedra ,</i> <i>lizosomi, znotrajcelična koncentracija Ca²⁺,</i> <i>permeabilizacija plazmaleme</i>
Nanodelci	
Polistirenski ND: <i>različen ζ-potencial (mV; PBS, pH 7,4)</i> PS (brez vezanih molekul s funkcionalnimi skupinami; ~ 0 mV) PS-COOH (negativni referenčni material; ~ 0 mV) PS-NH₂ (1-9) (različna količina skupin – NH ₂ ; ~ 2 – 30 mV) PS-N(CH₃)₃ (1-3) (stalni pozitivni naboj (~ 14 mV; oznaki -2 in -3) PS-NH₂-Bang's (pozitivni referenčni material; ~ 30 mV)	PS in PS-COOH: odsotnost vpliva PS-NH₂ (1-9): odsotnost povezave ζ -potenciala in kvarnega vpliva ND na vse testirane parametre PS-N(CH₃)₃ (1-3): vpliv na lizosome in spremenjeno morfologijo jedra (astrociti)

Preglednica 6: Povzetek vpliva izbranih NM na umetne membrane (POPC SUV, LUV ali GUV, POPC ali DPPC MLV), encime (ribja AChE in AChE iz človeških eritrocitov) in membrane človeških eritrocitov

Testni sistemi	POPC GUV: <i>pokanje/velikost/ premer</i>	POPC MLV: <i>struktura membrane</i>	encimski testi: <i>ribja AChE/ AChE iz človeških eritrocitov</i>	človeški eritrociti: <i>spr. oblike/ mikrovezikulacija</i>
Nanomateriali	POPC LUV ali SUV: <i>fluidnost</i>	DPPC MLV: <i>inkubacija/ neposredna izpost.</i>		
Ogljkovi NM <i>različnih oblik:</i> C ₆₀ (molekule, delci, aglomerati), MWCNT (večplastne nanocevice), CB (amorfni aglomerati), GO (mikrometrске ploščice nanodebeline)	C ₆₀ : + / n.p. / + CB: + / - / - MWCNT in GO: n.p.	CB, GO, C ₆₀ : + (2 mol. %: CB, GO > C ₆₀)	GO in CB > MWCNT: +; C ₆₀ : - / C ₆₀ > CB > MWCNT: +; C ₆₀ : -	CB: - / - C ₆₀ : - / - GO: + / - MWCNT: + / -
CoFe₂O₄ <i>z različno površino:</i> CoFe ₂ O ₄ (brez adsorbcije CA, veliki aglomerati), CoFe ₂ O ₄ -CA (adsorbirana citronska kislina, manjši aglomerati)	CoFe ₂ O ₄ : - / - / - CoFe ₂ O ₄ -CA: + / + / +	CoFe ₂ O ₄ : - CoFe ₂ O ₄ -CA: +	n.p. / n.p.	CoFe ₂ O ₄ : - / n.p. CoFe ₂ O ₄ -CA: + / +
Fe₂O₃ <i>z različno površino (ζ-potencial; mV; dH₂O, pH 7,0):</i> Fe ₂ O ₃ (brez SiO ₂ in vezanih molekul s skupinami -COOH ali -NH ₂ , veliki aglomerati; ~ 0 mV), Fe ₂ O ₃ -Si (plast SiO ₂ ; neg. naboj), Fe ₂ O ₃ -Si-COOH (plast SiO ₂ , vezane skupine -COOH; neg. naboj), Fe ₂ O ₃ -Si-NH ₂ (plast SiO ₂ , vezane skupine -NH ₂ ; poz. naboj)	Fe ₂ O ₃ : - / - / - Fe ₂ O ₃ -Si, Fe ₂ O ₃ -Si- COOH, Fe ₂ O ₃ - Si-NH ₂ : - / - / +	n.p.	n.p. / n.p.	Fe ₂ O ₃ : n.p. Fe ₂ O ₃ -Si: + / + Fe ₂ O ₃ -Si- COOH: + / + Fe ₂ O ₃ -Si-NH ₂ : + / -
	Fe ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃ -Si, Fe ₂ O ₃ -Si- COOH, Fe ₂ O ₃ - Si-NH ₂ : -	Fe ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃ -Si, Fe ₂ O ₃ -Si- COOH, Fe ₂ O ₃ - Si-NH ₂ : - / n.p.		

Opombe: oznaka (+) pomeni zabeležen vpliv NM, oznaka (-) odsotnost vpliva, z oznako (>) smo primerjali vpliv NM iste skupine glede na ovrednoteno intenziteto vpliva na testnem sistemu. Okrajšava n.p. (ni prikaza) pomeni, da vpliva NM na tem testnem sistemu nismo vrednotili. Lastnosti različnih Fe₂O₃ smo primerjali glede na izmerjene vrednosti ζ-potenciala v dH₂O (pH 7,0).

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Namen doktorskega dela je bil testiranje vpliva različnih NM na izoliranih modelnih sistemih umetnih fosfolipidnih membran in preveriti učinke na bioloških celičnih sistemih: na plazmalemi eritrocitov, modelnih membranskih proteinih (encimih acetilholinesteraze) in na znotrajceličnem membranskem sistemu (membrani lizosomov).

Učinek NM smo analizirali glede na njihovo primarno obliko in različne lastnosti površin; glede na to smo v nadaljevanju razpravo razdelili na dva dela. V prvem delu smo primerjali vpliv različnih oblik ogljikovih NM na umetne fosfolipidne membrane ter biološke membrane eritrocitov in na modelne membranske proteine (encime acetilholinesteraze). V drugem delu smo primerjali vpliv NM z različnimi lastnostmi površine: magnetnih ND kobaltovega ferita ali železovega oksida na umetne membrane in biološke membrane eritrocitov. Za zaključek raziskav na višjem, celičnem nivoju smo izbrali biološko inertne polistirenske ND z enako kemijsko sestavo in z različno površino (vezane molekule z različno količino funkcionalnih aminoskupin ali s trimetilamonijevimi skupinami) in preverili vpliv kationskih ND na celične kulture *in vitro*, s poudarkom analize vpliva na lizosomalno membrano.

5.1.1 Vpliv nanomaterialov različnih primarnih oblik

Za primerjavo vpliva različnih strukturnih oblik ogljika nismo našli enostavnega pristopa, s katerim bi lahko verodostojno ovrednotili vpliv različnih primarnih oblik ogljikovih NM na izbrane testne sisteme. Računalniške simulacijske študije (Leroueil, 2008; Monticelli in sod., 2009; Yang in Ma, 2010) in redkejši eksperimentalni dokazi poročajo o vplivu različnih oblik NM (okroglih ND, paličasto ali cevasto oblikovanih NM, NM v obliki ploščic, ipd.) na umetne ali biološke membrane, vendar menimo, da je definicijo oblike NM težko opredeliti. Testirani NM se ne razlikujejo le v primarni obliki, temveč smo obravnavali NM, ki so kemijsko med seboj zelo različni, četudi so v osnovi vsi sestavljeni iz ogljika. Največje razlike med ogljikovimi NM različnih oblik smo pričakovali v lastnostih površine: ploščice GO imajo značilno amifilno naravo zaradi prisotnosti epoksidnih in hidroksidnih skupin na robovih in površini. Vendar je eden od možnih pristopov vrednotenja različnih oblik NM, ki smo ga uporabili pri interpretaciji rezultatov, na podlagi različne ukrivljenosti NM različnih oblik (Monticelli in sod., 2009): GO v obliki ravnih ploščic ima stopnjo ukrivljenosti blizu 0, MWCNT imajo na lokalnih območjih veliko stopnjo ukrivljenosti in podobno tudi aglomerati amorfnega CB. Najvišjo stopnjo ukrivljenosti imajo manjši skupki oz. nanostrukturirani aglomerati C₆₀.

Površinska ukrivljenost in s tem dostopnost vezavnih mest za interakcijo je ena izmed glavnih fizikalno-kemijskih lastnosti NM, ki vplivajo na adsorpcijski potencial in posledično interakcijo NM z biološkimi komponentami (Xia in sod., 2011).

5.1.1.1 Vpliv na umetne fosfolipidne membrane

Da bi izločili vpliv sekundarnih značilnosti NM, ki se oblikujejo v eksperimentalnem ali biološkem mediju, smo pri enem od pristopov na modelnem sistemu umetnih membran fosfolipidne vezikle neposredno izpostavili NM, tako da smo NM in lipide raztopili v istem topilu. Največji obseg eksperimentalnega dela smo izvedli na unilamelarnih veziklih (GUV), ki na podlagi velikosti kot modelni sistem najbolj ustrezajo dimenzijam bioloških membran. Vendar se je izkazalo, da je odzivnost tega sistema manjša v primerjavi z vrednotenjem neposrednega vpliva na strukturne parametre (z metodo SAXS), zato smo vpliv nekaterih izbranih NM na umetne fosfolipidne membrane ovrednotili in medsebojno primerjali z vsemi uporabljenimi pristopi, vpliv nekaterih NM pa smo preverili le z izbranimi metodami (delno tudi zaradi tehničnih omejitev pri izvedbi).

5.1.1.1.1 Neposredna izpostavitve POPC MLV

Neposredna izpostavitve POPC MLV ogljikovim NM različnih oblik (t.j. molekulam C_{60} , ploščicam GO ali amorfnim aglomeratom CB, raztopljenim v istem topilu kot lipidi POPC) je v prisotnosti vseh NM povzročila temperaturno pogojene strukturne spremembe fosfolipidnih membran: nabrekanje veziklov, povečano razdaljo med lipidnimi dvosloji in povečano debelino membrane. Enake izpostavitvene koncentracije NM (2 mol. %) so povzročile najizrazitejše strukturne spremembe MLV v prisotnosti CB, sledil je vpliv GO in C_{60} . Pri MLV, oblikovanih iz suspenzije lipidov POPC in C_{60} (v topilu $CHCl_3$), smo zabeležili povečanje razdalje med lipidnimi dvosloji (d) v prisotnosti C_{60} .

Kot neposredno izpostavitve smo obravnavali tudi vzorec POPC MLV v prisotnosti suspenzije C_{60} v dH_2O , ki smo ga izpostavili mehanski motnji, t.j. 10 zaporednim ciklom taljenja in zamrzovanja, kar je povzročilo razbitje MLV in večjo neurejenost dvoslojev znotraj MLV, vendar je razdalja med dvosloji – d ostala nespremenjena.

Zaradi več eksperimentalnih podatkov in dostopnejše literature podrobnejšo analizo in interpretacijo mehanizmov delovanja podajamo le za izbrane NM (C_{60}). Izgubo urejenosti lipidnih dvoslojev znotraj MLV C_{60} razlagamo kot posledico delovanja treh mehanizmov:

- i) Posamezne molekule C_{60} so se inkorporirale v fosfolipidni dvosloj, kar je vplivalo na razdaljo med dvosloji – d .
- ii) Večji aglomerati C_{60} (okoli 100 nm), prisotni pri inkubaciji POPC MLV v vodni suspenziji C_{60} , so sterično onemogočili združevanje membran znotraj MLV po izpostavitvi ciklom taljenja in zamrzovanja.
- iii) Posamezne molekule ali manjši aglomerati C_{60} so se lahko adsorbirali na hidrofobni del fosfolipidnih molekul, kar je povzročilo močnejše undulacije dvoslojev, t.j. povečan odbojne sile med sosednjimi fosfolipidnimi dvosloji (Pabst in sod., 2003).

Mehanizem pod točko ii) lahko nastopi tudi pri pogojih inkubacije POPC MLV v suspenziji C_{60} (opisano v podpoglavju 5.1.1.1.2).

Predpostavljeni mehanizem pod točko i) smo podrobneje razložili na osnovi dodatne analize podatkov, pridobljenih na sinhrotronskem viru sevanja z metodo SAXS, z dodatno analizo (modificirana teorija po Caillé; Caillé, 1972; Pabst in sod., 2000, 2003; Rappolt in sod., 2008). Z naraščajočo temperaturo se je razdalja med polarnimi glavami fosfolipidov enakomerno znižala pri kontrolnih in MLV, izpostavljenih C_{60} , debelina vmesne plasti vode pa se je povečala. Razdaljo med lipidnimi dvosloji – d smo razdelili v hidrofobni, t.j. razdaljo med polarnimi glavami fosfolipidov (d_{HH}), in hidrofilni del, t.j. debelina vmesnega sloja vode (d_w) (Caillé, 1972; Pabst in sod., 2000). Predpostavili smo, da raztezek regije polarnih glav ustreza 1 nm (McIntosh in Simon, 1986).

Pred razlago mehanizma vpliva molekul C_{60} želimo poudariti, da je že samo zvišanje temperature, ki smo ga usmerjeno inducirali med eksperimentalnim postopkom (tudi pri kontrolnih vzorcih, torej v odsotnosti C_{60}), povzročilo povečanje razmerja med rotamerami *gauche* in *trans* acilnih verig maščobnih kislin, kar se odraža v skrajšanju fosfolipidnih verig (Seelig in Seelig, 1976). Hkrati se z naraščajočo temperaturo membrane zrahljajo, to vodi v povečane undulacije membran, kar povzroči dodatno odbijanje sosednjih fosfolipidnih dvoslojev znotraj MLV (Pabst in sod., 2003).

Predpostavljamo, da posamezne molekule C_{60} lahko na membrano vplivajo na 3 načine, preko:

- a) spremembe fluidnosti membrane,
- b) steričnih motenj membranskih proteinov, posebej tistih, vsidranih v hidrofobni del membrane, in/ali

c) vpliva na pričakovane spremembe v lateralnem tlačnem profilu¹⁰ (ang. lateral pressure profile) membran (Cantor, 1999, 2002).

Spremembo fluidnosti membrane a) lahko razlagamo na dva načina:

Prvič, v prisotnosti C₆₀ se razdalja med polarnimi glavami fosfolipidov (d_{HH}) v testiranem temperaturnem območju ni bistveno spremenila (spremembe d_{HH} so v območju od -0,16 do +0,08 nm; tudi Jeng in sod., 2005), opazili pa smo spremembo dinamike fluidnosti fosfolipidov, t.j. pod vplivom C₆₀ se je zmanjšala pogostost induciranih sprememb konformacij *trans* v *gauche*. Pred prehodom so acilne verige v fosfolipidnih repih bolj stisnjene skupaj (zavzemajo konformacijo *trans*, membrane so v fazi gel), in bolj tekoče, dinamične in permeabilne v tekoči kristalinični fazi (večina verig zavzema konformero *gauche*). Sprememba fluidnosti membran nakazuje, da ni prišlo do razbitja liposomov, ampak so ti prešli fazni prehod.

Drugič, zabeležili smo tudi povečanje notranje razdalje med membranama (vmesni sloj vode – d_w). Razlog za to je najverjetneje višja fluktuacija fosfolipidov v prisotnosti C₆₀, vgrajenih med fosfolipidni dvosloj. Interakcija NM s fosfolipidi lahko preko lipidnega dvosloja vpliva na delovanje membranskih proteinov, vendar je proces vpliva zelo kompleksen (Gruner, 1985; Cantor, 1999, 2002; Grebowski in sod., 2013).

Predpostavljena mehanizma pod točkama b) in c) razlagamo skupaj, na tri načine:

Prvič, v regiji polarnih glav so prisotni odboji med molekulami fosfolipidov zaradi delovanja elektrostatskih interakcij in entropije. Na stiku polarnih in nepolarnih delov hidrofobne interakcije povzročajo močan lateralni privlak, medsebojni odboj maščobnih verig pa določa lateralni tlačni profil v hidrofobnem delu membran.

Drugič, sidranje molekule C₆₀ v fosfolipidne membrane spremeni lateralni tlačni profil v jedru membran, kar pomeni, da povečanje van der Waalsovih interakcij med molekulami C₆₀ in fosfolipidi vodi k zmanjšanemu pritisku v regiji lipidnih repov.

Tretjič, fosfolipidi lahko na membranske proteine vplivajo tudi s spremembo ukrivljenosti membrane (vrednoteno s parametrom togosti membranske ukrivljenosti – K_C). Zabeležili smo padec K_C (rezultati v doktorski nalogi niso prikazani) v prisotnosti

¹⁰ Izraz 'lateralni tlačni profil membrane' (ang. *lateral pressure profile*) opisuje vsoto vseh sil, ki delujejo na membrano (v isti ravnini); pritiski se znotraj membrane porazdelijo t.i. globinsko (pravokotno na delujoče sile) (Cantor in sod., 1999, 2002).

višje koncentracije C₆₀ (10 mol. %), kar lahko vodi v zmanjšanje proste energije v bližini zasidranih membranskih proteinov (Lundbaek in sod., 2010). V okviru doktorske naloge nismo izvedli simulacijskih študij molekulske dinamike lipidnih dvoslojev POPC brez ali v prisotnosti C₆₀, ki bi omogočile podrobnejši vpogled v vpliv lipidnega dvosloja na vsidrane membranske proteine.

5.1.1.1.2 Posredna izpostavitev: inkubacija POPC MLV ali GUV v suspenziji C₆₀

Inkubacija POPC MLV v suspenziji C₆₀ je povzročila dodatno stabilizacijo veziklov in ni vplivala na strukturne spremembe fosfolipidov. Inkubacija POPC GUV v vodni suspenziji C₆₀ pa je povzročila pokanje veziklov in/ali transformacijo preostalih veziklov v hruškasto oblikovane GUV.

Predpostavljamo, da so aglomerati C₆₀ zaradi adsorpcije na zunanjo površino dipolarnih fosfolipidov POPC povzročili spremembo:

- a) globalne ukrivljenosti membrane (Wang in sod., 2008), ki je lahko vodila v razbitje POPC liposomov okrogle oblike.
- b) lokalne ukrivljenosti membrane. Transformacija veziklov blizu obliki popolne sfere (limitna oblika) lahko vodi do neugodne spontane ukrivljenosti membrane (ko prilagajanje oblike ni več mogoče) in posledičnega razbitja veziklov (Babnik in sod., 2003; Mavčič in sod., 2004; Zupanc in sod., 2012; Drašler in sod., 2014).

5.1.1.1.3 Primerjava vpliva ogljikovih nanomaterialov na nenasičene in nasičene fosfolipide

Interakcijo ogljikovih NM z nenasičenimi (POPC) smo primerjali z nasičenimi fosfolipidi 1,2-dimiristoil-*sn*-glicerol-3-fosfoholin (DMPC). Eksperimentalni postopek na sinhrotronskem viru sevanja z metodo SAXS smo izpeljali pod enakimi pogoji kot pri POPC MLV (t.i. neposredna izpostavitev lipidov in NM z raztapljanjem v istem topilu), vendar analiza vpliva NM na DMPC ni vključena v doktorsko nalogo.

Vpliva, ki ga je imel C₆₀ na MLV POPC, nismo zabeležili na nasičenih fosfolipidih (DMPC); prisotnost C₆₀ ni vplivala na spremembo strukture in faznih prehodov DMPC MLV. Predpostavljamo, da je vzrok bolj tesno pakiranje nasičenih fosfolipidov v primerjavi z nenasičenimi; pri slednjih so membrane bolj fluidne in omogočajo lažji prehod molekulam C₆₀ med fosfolipidne repe.

V prisotnosti CB in GO smo zabeležili oblikovanje unilamelarnih veziklov iz DMPC MLV, kar pomeni onemogočeno oblikovanje MLV v prisotnosti CB ali GO. Sklepamo, da je vzrok višji adsorpcijski potencial aglomeratov CB ali ploščic GO (Xia in sod., 2011). Poleg tega je že samo lepljenje materiala CB na stekleno kapilaro delno oviralo izvedbo poskusov.

5.1.1.1.4 Zaključki vpliva na umetne fosfolipidne membrane

Rezultati metode SAXS nakazujejo, da je vpliv ogljikovih NM na izoliran sistem umetnih fosfolipidnih membran lahko odvisen od njihove primarne oblike, vendar v okviru doktorske disertacije nismo izvedli dovolj podrobne analize vpliva CB in GO, da bi to z gotovostjo trdili. Izpostavljamo tudi, da na adsorpcijo fosfolipidov na NM in/ali prekrivanje NM s fosfolipidi vpliva kombinacija lastnosti NM, med katerimi izpostavljamo tudi nanostrukturiranost površine NM. Roiter in sodelavci (2008) poročajo, da je prekrivanje NM s fosfolipidi izrazitejše na gladkih površinah (npr. ploščice GO v primerjavi z aglomerati C₆₀ ali CB). Zaključujemo, da primarna oblika in velikost NM narekujeta ostale lastnosti NM, npr. ukrivljenost površine, ki so skupaj s površinskimi lastnostmi testiranih NM, npr. amfifilna narava GO (prisotnost epoksidnih in hidroksidnih skupin na robovih in površini; hidrofobnost NM) glavno vodilo pri interakcijah s fosfolipidnimi membranami.

5.1.1.2 Vpliv na aktivnost acetilholinesteraz

Skladno z rezultati vpliva ogljikovih NM različnih oblik na strukturne parametre umetnih fosfolipidnih membran smo zabeležili razlike v vplivu NM na izolirane beljakovinske sisteme. Visoka sposobnost lepljenja (adsorpcije) ogljikovih NM na biološke površine (Xia in sod., 2011; Ruh in sod., 2012) je bila pri rezultatih vpliva NM na beljakovinski modelni sistem izrazitejša v primerjavi z vplivom na umetne fosfolipidne membrane.

Zabeležili smo koncentracijsko odvisni stopnji inhibicije encima in adsorpcije ribje AChE (*E. electricus*) na vse izbrane ogljikove NM, iz česar sklepamo, da je inhibicija katalizne aktivnosti encima vsaj delno posledica adsorpcije encima na NM. Pri enakih izpostavitvenih koncentracijah NM smo najmanjši vpliv zabeležili v prisotnosti C₆₀, najvišji stopnji adsorpcije in inhibicije pa pri GO in CB; pri CB sta bili stopnji adsorpcije encima na NM in inhibicije delovanja encima podobni, medtem ko je bila adsorpcija ribje AChE na GO višja od inhibicije delovanja encima.

Podoben vzorec vpliva ogljikovih NM smo zabeležili tudi na AChE iz človeških eritrocitov, vendar je GO bolj vplival na delovanje encima v primerjavi s CB, pri vseh NM pa smo zabeležili vpliv pri bistveno višjih izpostavitvenih koncentracijah NM (najnižja inhibitorna koncentracija je bila v povprečju za velikosti razred 100 višja pri AChE iz človeških eritrocitov v primerjavi s koncentracijo NM pri ribjem encimu). Zabeležili smo tudi podoben vpliv testiranih NM na žuželčji encim (*D. melanogaster*), pri slednjem je bil inhibitorni vpliv CB bolj izrazit kot na ribjo AChE.

5.1.1.2.1 Predpostavljeni mehanizem vpliva nanomaterialov na testirani acetilholinesterazi

Ogljikovi NM se v vodni suspenziji ne raztapljajo (op.: značilna odsotnost disolucije ionov), zato razlagamo, da je popolna inhibicija delovanja encima nastopila zaradi adsorpcije AChE na CB ali MWCNT, kar je v skladu z našo predhodno študijo na žuželčjem (*D. melanogaster*) in vretenčarskem (*E. electricus*) encimu (Mesarič in sod., 2013). Wang in sodelavci (2009) so podoben vzorec opazili pri vrednotenju vpliva kovinskih NM na vretenčarsko AChE (*E. electricus*), vendar je pri kovinskih NM zaradi raztapljanja NM inhibicija encima lahko posledica: i) raztopljenih kovinskih ionov, ki blokirajo aktivni center AChE in ii) le delno kot posledica adsorpcije AChE na NM.

Sklepamo, da je inhibicija AChE posledica vezave encima na CB na mestu aktivnega centra encimov, ali pa nespecifična vezava povzroči tako obsežno konformacijsko spremembo, da encim ni več aktiven. Nasprotno, obe testirani AChE, adsorbirani na GO, sta ohranili izvirno konformacijo encima in razmeroma visoko aktivnost, zato sklepamo, da se encim veže na GO s površino, ki je daleč od njegovega aktivnega centra (opisano v predhodni študiji Mesarič in sod., 2013).

Vpliv NM na delovanje AChE razlagamo skladno z adsorpcijskim potencialom NM; slednji je odraz realnega aglomeracijskega stanja v suspenziji in ne primarne velikosti NM v očiščenih oblikah (Xia in sod., 2011). Reaktivna površina delca je odvisna od velikosti delca; manjši delci imajo glede na velikost večjo površino, vendar je hkrati absolutna površina, ki je na voljo za interakcijo, večja pri večjih delcih. V predhodni študiji (Mesarič in sod., 2013) smo upoštevali velikost aglomeratov NM, ki se oblikujejo v suspenziji, in z uporabo simulacijskih študij molekulske dinamike (iskanje najugodnejšega energetskega stanja) pokazali, da domnevno mesto vezave testiranih NM na AChE ne sovпада z aktivnim centrom encima. Mesto interakcije večjih aglomeratov C₆₀ z različnimi proteini se razlikuje od tega pri aglomeratih amorfnega CB ali ploščic GO (z nizko površinsko ukrivljenostjo), saj zaradi večje površinske ukrivljenosti

aglomerati C₆₀ oblikujejo manjše število vezavnih mest (posledično manjša izmerjena adsorpcija) v primerjavi s ploščicami GO (z nizko površinsko ukrivljenostjo) ali amorfnim CB (Mesarič in sod., 2013). Poleg razlike v ukrivljenosti površine NM je pri interpretaciji rezultatov potrebno upoštevati hidrofobnost NM. Izpostavljamo amifilno naravo GO, ki zaradi prisotnosti epoksidnih in hidroksilnih skupin na površini in robovih ploščic pričakovano vpliva na interakcije NM v polarnem (biološkem) okolju v primerjavi z NM z bolj hidrofobno površino (CB, C₆₀).

Povezave med izmerjenimi vrednostmi ζ -potenciala (v reakcijski mešanici za encime) in ovrednotenim vplivom NM na testirani AchE nismo opazili, iz česar sklepamo, da razlike v reaktivnosti ogljikovih NM lahko vsaj delno pripišemo tudi njihovi obliki in strukturi (Zuo in sod., 2011), skupaj s površinskimi lastnostmi (adsorpcijski potencial NM oz. hidrofobnost, možnost tvorbe hidrofobnih ali elektrostatskih interakcij) ter končno velikostjo in številom delcev v suspenziji (Xia in sod., 2011).

5.1.1.2.2 Zaključki vpliva na acetilholinesteraze

Vpliv NM različnih oblik na testirani AChE smo razložili na podlagi visokega adsorpcijskega potenciala ogljikovih NM in lastnosti površine NM, kar je vsaj delno lahko odvisno tudi od oblike NM. Zaključujemo tudi, da bi bilo ob interpretaciji rezultatov potrebno upoštevati stopnjo aglomeracije oz. število in velikost delcev na voljo za interakcijo.

Poleg razlik v obliki in površini izpostavljamo tudi, da je pomembno upoštevati način priprave testiranih NM in s tem morebitni vpliv ostankov različnih topil ali katalizatorjev na biološki sistem; pri čemer izpostavljamo prisotnost močnih nepolarnih topil, vključenih v postopek priprave NM, pri čemer izpostavljamo pripravo ploščic grafena (in GO) z razplastitvijo plasti grafita (Park in Rouff, 2009).

5.1.1.3 Vpliv na biološke membrane

5.1.1.3.1 Sprememba morfologije eritrocitov v prisotnosti ogljikovih nanomaterialov

Različno od zabeleženega vpliva NM na AChE smo zabeležili vpliv NM na spremembo morfologije eritrocitov skladno z izmerjenimi vrednostmi ζ -potenciala v PBS-citratnem pufru: GO z najbolj negativno absolutno vrednostjo (-50 mV) so povzročili največji delež nediskoidnih oblik eritrocitov, izpostavitvev CB (-33 mV) pa nekoliko manjšo transformacijo oblike celic. Prisotnost C₆₀ (-28 mV) ali MWCNT (-23 mV) ni značilno vplivala na spremembo morfologije eritrocitov.

Transformacijo oblik eritrocitov v prisotnosti ogljikovih NM lahko, podobno kot pri vplivu na beljakovine, razložimo na podlagi visokega adsorpcijskega potenciala ogljikovih NM (Xia in sod., 2011); znano je, da adsorpcija NM na površino eritrocitov vpliva na spremembo oblike eritrocitov (Asharani in sod., 2010; Han in sod., 2012). Zhang in sodelavci (2013b) na podlagi sprememb mehanskih lastnosti (prožnost membrane) predpostavljajo možnost infiltracije C₆₀ v membrano eritrocitov, vendar tega v naši študiji direktno nismo vrednotili.

Bolj kot primarno obliko NM tudi avtorji Meng in sodelavci (2012) razlagajo odvisnost poškodb eritrocitov od velikosti in lastnosti površin MWCNT. Na primer daljše cevke so povzročile skrčitev celic, izkrivljanje oblike in medsebojno zlepljanje, krajše pa zmanjšano integriteto membran. Predpostavljeni mehanizem vpliva NM na oblike eritrocitov je podrobno razložen v podpoglavju razprave o vplivu različnih lastnosti površin NM na eritrocite (5.1.2.2).

5.1.1.3.2 Zaključki vpliva na biološke membrane eritrocitov

Kljub razlikam v deležu nediskoidnih oblik eritrocitov v prisotnosti ogljikovih NM različnih oblik, iz rezultatov ne moremo neposredno sklepati o vplivu primarne oblike NM na biološke membrane. Sklepamo, da je zabeležen vpliv bolj kot od primarne oblike odvisen od naboja na električni dvojni plasti NM (izmerjene vrednosti ζ -potenciala v pufru), adsorpcijskega potenciala NM in njihove hidrofobnosti, torej od lastnosti površin NM.

5.1.1.4 Primerjava eksperimentalnih pristopov vrednotenja vpliva na biološke sisteme

Preverjanje vpliva NM na lipidne ali beljakovinske modelne sisteme je poenostavljen pristop za preverjanje interakcij med NM in biološkimi membranami. Prednost redukcionističnega pristopa pred kompleksnimi sistemi je možnost preverjanja interakcij NM s posameznimi komponentami bioloških sistemov, neodvisno od npr. adsorpcije biomolekul, prisotnih v biološkem okolju, npr. oblikovanja proteinske korone na površini NM (Cedervall in sod., 2007; Dawson in sod., 2009; Monopoli in sod., 2011, 2012); izolirani lipidni ali beljakovinski sistemi tako vsaj delno omogočajo vrednotenje vpliva primarnih lastnosti NM.

Četudi smo zabeležili razlike v vplivu NM različnih oblik na izolirane umetne membrane, encimsko delovanje in biološke membrane eritrocitov, je primerjava neposredne

(raztapljanje v istem topilu ali izpostavitve mehanski motnji) in posredne izpostavitve (inkubacija veziklov v vodni suspenziji NM) pokazala, da je interakcija enakih fosfolipidov s C_{60} odvisna od tipa izpostavitve (neposredna izpostavitve vs. inkubacija) in od eksperimentalnega medija. Poudarjamo, da kljub npr. eksperimentalno dokazani povečani elastičnosti fosfolipidnega dvosloja v prisotnosti C_{60} ne moremo direktno sklepati, ali je to razlog za kvarni učinek na biološke sisteme; rezultati poskusov, izvedenih na izoliranem beljakovinskem sistemu ali na bioloških membranah eritrocitov, niso potrdili učinka C_{60} .

5.1.1.5 Problem aglomeracije nanomaterialov v suspenziji ali biološkem okolju

Predpostavljamo, da je za ugotavljanje neposrednega vpliva primarne oblike NM na umetne fosfolipidne membrane raztapljanje v topilu (npr. raztopina molekul C_{60} v kloroformu; Ruoff in sod., 1993) ustrežnejši pristop v primerjavi s testiranjem vodnih suspenzij, kjer površinsko nemodificirane molekule C_{60} močno aglomerirajo. Vendar pri vrednotenju biološkega potenciala NM tak pristop ni primeren; v biološkem okolju (v fizioloških pogojih) molekule C_{60} niso raztopljene v kloroformu ali podobnih nepolarnih topilih, ampak v polarnih (vodnih) medijih oblikujejo večje skupke.

Predvidevamo, da je površina skupkov C_{60} nanometrskih velikosti zelo podobna aglomeratom CB in da se razlikujejo le v notranji strukturi. Hkrati je pri vrednotenju biološkega potenciala pomembna (nano)strukturiranost aglomeratov NM; manjši ali večji osnovni delci in/ali delci različnih primarnih oblik vplivajo na končno obliko aglomeratov (Walter in sod., 2013). Zaradi različne stopnje aglomeracije NM v eksperimentalnih medijih ugotavljamo tudi, da primerjava masnih koncentracij NM ni najboljša mera pri vrednotenju vpliva različnih NM na biološke sisteme.

5.1.1.6 Specifičnost interakcij med nanomateriali in biološkimi sistemi

Pri vplivu na vse testirane sisteme gre najverjetneje za specifične interakcije, kjer je tudi pomembno, kateri del encima, fosfolipida ali del biološke membrane se adsorbira na NM oz. pride v stik z NM. Kot primer navajamo amfifilno naravo GO z nizko ukrivljenostjo in visokim adsorpcijskim potencialom, ki imajo na površini hidroksilne skupine in skupine $-COOH$ na robovih (Dreyer in sod., 2010). Podobno kot so ploščice grafena obdelane s kisikom, predvidevamo, da smo s 3-dnevnim soniciranjem vodne suspenzije C_{60} povzročili oksidacijo ogljikov, ustvarili negativni površinski (oblikovanje skupin $-OH$) in material je izgubil lastnost hidrofobnosti. Sklepamo, da prisotnost funkcionalnih skupin na GO in MWCNT omogoča oblikovanje vodikovih vezi in elektrostatskih

interakcij med proteinom in fosfolipidi, medtem ko so interakcije med aglomerati C₆₀ in CB najverjetneje hidrofobne ali van der Waalsove; hidrofobne interakcije so pogosto odgovorne za konformacijske spremembe proteinov (Chakraborti in sod., 2012).

5.1.1.7 Skupni zaključki prve hipoteze: vpliv primarnih oblik

Na podlagi dobljenih rezultatov zaključujemo, da primarna oblika NM delno lahko vpliva, vendar ni najpomembnejši dejavnik, ki vodi interakcije med NM in membranami. Treba je upoštevati sekundarne značilnosti NM v suspenziji: predvsem lastnosti površine NM (površinski naboj NM, hidrofobnost, idr.), število, velikost delcev ali aglomeratov in celotno površino delca, ki je na voljo za interakcijo (npr. večji ND imajo manjšo površinsko ukrivljenost in s tem večji vpliv na spreminjanje strukture proteinov in fosfolipidov). Skladno z nedavno predstavljenim trenutnim mnenjem o razvrščanju biološke aktivnosti NM glede na njihove fizikalno-kemijske lastnosti zaključujemo, da je primarna oblika le ena od lastnosti NM, ki poleg lastnosti površin NM in osnovne kemijske zgradbe NM vplivajo na interakcije NM z biološkimi sistemi in njihov potencial za kvarni učinek; poleg oblike in lastnosti površin NM so pomembne lastnosti NM tudi poroznost, strukturna konfiguracija in t.i. prepovedan prehod (ang. *bandgap*) (Lynch in sod., 2014).

Potrujemo tretjo hipotezo, da obstaja povezava med ovrednotenim vplivom NM na umetne membrane in biološke membrane eritrocitov ter modelne membranske proteine: zabeležili smo višji vpliv GO in CB na strukturne lastnosti MLV, inhibicijo delovanja AChE in adsorpcijo na encim ter spremembe oblik eritrocitov v primerjavi z MWCNT ali C₆₀ primerljivih koncentracij. Vendar poudarjamo, da iz rezultatov, dobljenih na posameznih testnih sistemih, ne moremo direktno sklepati ali predvidevati učinka, pridobljenega na drugih sistemih. Sklepamo, da je zabeležen učinek na vseh sistemih odvisen od površinskih lastnosti in/ali lastnosti NM, ki se oblikujejo v eksperimentalnem mediju.

5.1.2 Vpliv površinskih lastnosti nanomaterialov

V drugi hipotezi smo predpostavili, da je biološka aktivnost NM enake oblike odvisna od površinskih lastnosti NM (vezane ali adsorbirane molekule z različnimi kemijskimi/funkcionalnimi skupinami in posledični površinski naboj NM v suspenziji). Pri razlagi vpliva lastnosti površin NM na membrane smo upoštevali, da v interakciji med NM in biološkim sistemom sodeluje naboj na električni dvojni plasti NM, in ne izvorni površinski naboj NM. Potencial na električnem dvosloju NM, pomemben za interakcijo

z membrano, smo ovrednotili z meritvami ζ -potenciala; slednji je odvisen od osnovnega naboja delcev (t.j. izvirnega površinskega naboja NM) in od ionske jakosti medija (t.j. ionov v okoliškem mediju).

Primer različnih lastnosti površin NM je adsorbirana citronska kislina, ki poveča izvorni naboj NM, ki pa je v mediju zaradi visoke ionske jakosti delno zasenčen; posledično ima površina električne dvojne plasti relativno majhen naboj (tanjši sloj okoli delca se odrazi v nižji izmerjeni vrednosti ζ -potenciala; razlaga v pril. B). Adsorbirana citronska kislina na ND se je odrazila v bolj hidrofilni površini in večji polarnosti $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ v primerjavi s površinsko neobdelanimi CoFe_2O_4 in v koloidni stabilnosti suspenzij oz. aglomeraciji NM ter posledičnem številu oz. koncentraciji delcev na voljo za interakcijo; slednja je bila za faktor 10^9 nižja pri CoFe_2O_4 v primerjavi z bolj suspendiranimi delci $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$.

5.1.2.1 Vpliv na umetne fosfolipidne membrane

Zabeležili smo močnejšo interakcijo suspenzije manjših aglomeratov ND z adsorbirano citrsko kislino ($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$) z umetnimi fosfolipidnimi membranami (pokanje in oblika POPC GUV in razbitje POPC MLV) v primerjavi z večjimi aglomerati CoFe_2O_4 , pri katerih smo zabeležili le blago stabilizacijo fosfolipidnih dvoslojev MLV.

Razlike med različnimi ND Fe_2O_3 so bile skoraj zanemarljive; prisotnost $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ je, za razliko od večjih aglomeratov neobdelanih Fe_2O_3 , povzročila bolj eliptično obliko GUV, Fe_2O_3 pa so pri višji koncentraciji vplivali na manjše število veziklov. Razlik med ND z različno površino ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$) nismo zabeležili. Rezultati so pokazali odsotnost vpliva vseh testiranih ND Fe_2O_3 na fluidnost membran POPC in toplotni profil lipidov DPPC.

Na podlagi rezultatov različnega vpliva NM z vezanimi molekulami z različnimi skupinami, predpostavljamo, da:

- a) Nanomateriali z nabito električno dvojno plastjo na površini se hitreje adsorbirajo na fosfolipide in lahko vplivajo na orientacijo polarnih molekul v fosfolipidnem dvosloju, kar lahko povzroči spremembe globalne ukrivljenosti membran in posledično razbitje veziklov GUV; interakcija je odvisna od predznaka naboja in vrednosti naboja (Michel in Gradzielski, 2012; Schulz, 2012; Zupanc in sod., 2012). Zabeležili smo, da je prisotnost $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ preprečila oblikovanje POPC MLV, najverjetneje zaradi interakcije s polarnim delom fosfolipidnih glav (adsorpcije na

fosfolipide), podoben vpliv so povzročili tudi ND zlata (Paasonen in sod., 2010). (Op.: polarna glava fosfolipidov POPC (trimetilamonijeva skupina) je pri eksperimentalnih pogojih (v raztopini glukoze, pH 7,4) pozitivno nabita (Velikonja in sod., 2013)).

- b) Spremembe oblike liposomov nakazujejo na spremembo lokalne ukrivljenosti membrane zaradi adsorpcije NM (CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$) na fosfolipidne membrane; temu lahko sledi enkapsulacija in/ali internalizacija NM v vezikle in posledično zmanjšanje integritete membrane in/ali oblikovanje lukenj ali por (Fošnarič in sod., 2009; Michel in Gradzielski, 2012; da Rocha in sod., 2013).
- c) Večji aglomerati NM se lahko ovijejo s fosfolipidi iz membrane veziklov (ang. *membrane wrapping*; gre tudi za spremembo globalne ukrivljenosti) tudi brez posledične internalizacije NM (t.i. mehanizem kraje lipidov; Deserno in sod., 2002; Michel in Gradzielski, 2012; Ruiz-Herrero in sod., 2012; Zhang in sod., 2012). Mehanizem je v skladu s študijo Zhang in sodelavcev (2012), ki so zabeležili ovijanje fosfolipidov okoli večjih aglomeratov ND (182 nm), kar je vodilo v pokanje oz. razbitje GUV, medtem ko so manjši ND (pod 18 nm) povzročili oblikovanje por (Zhang in sod., 2012).

V doktorski nalogi nismo neposredno vrednotili pojavov adsorpcije, enkapsulacije ali internalizacije NM v liposome. Predvidevamo, da bi nastanek por v membranah lahko opazili kot prebledenje GUV; sklepamo, da so med izvedbo poskusa nastajali GUV s porami, vendar niso bili dovolj dolgo stabilni (in jih tako z mikroskopskim zajemom videoposnetkov nismo vključili v analizo).

Na osnovi dobljenih rezultatov predlagamo izvedbo dodatnih študij na umetnih fosfolipidnih membranah:

- a) Vpliv različnih površinskih lastnosti NM na umetne membrane bi lahko testirali z variiranjem sestave fosfolipidnih veziklov, npr. negativno nabitih lipidov (serin ali kardiolipin) ter površinskega naboja NM (z vezavo molekul z različnimi kemijskimi skupinami).
- b) Poleg meritev ζ -potenciala suspenzij NM predlagamo izvedbo meritev ζ -potenciala suspenzij GUV, kontrolnih GUV in v prisotnosti testiranih NM, kar bi omogočilo vpogled v bolj direktne interakcije med NM in fosfolipidi.

- c) Opazovanje GUV pod fazno-kontrastnim mikroskopom pri večjih povečavah (> 400-krat) bi omogočilo sledenje oblikovanja endoveziklov (manjših veziklov v notranjosti obstoječega), rast tub v notranjost ali oblikovanje verižic iz kroglastih veziklov, podobno kot poročata Yu in Granick (2009).
- d) S fluorescenčno označenimi ND in/ali fosfolipidi bi lahko direktno dokazali ovijanje fosfolipidov okoli ND ali aglomeratov.

5.1.2.2 Vpliv na biološke membrane

Poskusi na bioloških membranah eritrocitov so v veliki meri potrditi izsledke raziskav na umetnih liposomih. Prisotnost suspenzije $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ je povzročila transformacijo oblik eritrocitov. Zaradi močne aglomeracije površinsko neobdelanih Fe_2O_3 v PBS-citratnem pufri vpliva teh ND na eritrocite nismo vrednotili.

Suspenzija $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ je povzročila najvišji delež nediskoidnih oblik eritrocitov v primerjavi s kontrolno skupino, vendar smo spremembo oblike zabeležili tudi v prisotnosti $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ in delno tudi pri CoFe_2O_4 , v skladu s študijami o vplivu različnih NM na eritrocite (Thomassen in sod., 2011; Asharani in sod., 2012; Han in sod., 2012; in v naši predhodni študiji Šimundić in sod., 2013).

Nastanka mikroveziklov iz membrane eritrocitov nismo vključili v razpravo, saj smo prisotnost membranskih struktur okrogle oblike opazili le pri nekaterih vzorcih ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$), a v enakem obsegu kot pri kontrolni skupini. Sklepamo, da so posledice morebitne mikrovezikulacije odrazile v spremembah oblike eritrocitov, saj oblikovanje membranskih veziklov lahko vpliva na izgubo lipidov iz zunanjega ali notranjega membranskega sloja (Almizraq in sod., 2013). Prisotnosti pojava mikrovezikulacije nismo vrednotili z drugimi metodami, zato ne izključujemo, da so strukture, ki smo jih opazili na posnetkih SEM, preprosti celični fragmenti, nastali kot posledica morebitnega razpada celic med pripravo vzorcev, ali delci, vneseni med pripravo vzorca.

Predpostavljamo, da je glavni vzrok za spremembe oblike eritrocitov adsorpcija NM na membrano (Asharani in sod., 2012), in sicer na fosfolipidni in/ali proteinski del (Betz in sod., 2007; Grebowski in sod., 2013).

Mehanizem vpliva NM na i) fosfolipide in ii) membranske proteine lahko razložimo s t.i. konceptom sklopljenega dvosloja (ang. *bilayer couple concept*, BCC; Sheetz in Singer,

1974): vsak faktor, ki povzroči raztezanje zunanjega ali notranjega membranskega monosloja, vodi do ehinocitoze (oblikovanje trnastih izrastkov na površini celice) ali stomatocitoze (nabrekanja celic) (Iglič, 1997; Rudenko, 2010).

- i) Sprememba strukture ali konformacije fosfolipidov (ki je lahko posledica adsorpcije NM na fosfolipide) lahko preko spremenjenega tlačnega profila membrane vpliva na delovanje membranskih proteinov (Cantor, 1999, 2002; op.: razlaga mehanizma v podpoglavju: 5.1.1.1.1).
- ii) Vezava NM na membranski proteinski kompleks *Band-3* vpliva na spremembe oblike celic kot posledica delovanja membranskega citoskeleta (proteina spektrin in aktin), ki je s kompleksom *Band-3* povezan preko proteina ankirin (Grebowski in sod., 2013).

Vpliv na obliko eritrocitov je mogoče razložiti tudi s spremembo pH ali osmolarnosti okoliškega medija (Lim in sod., 2002; Rudenko, 2009, 2010). Osmolarnost suspenzij testiranih ND v PBS-citratnem pufru se ni bistveno razlikovala od izmerjenih vrednosti pufra, prav tako je pH suspenzij ND ostal primerljiv, zato teh dveh komponent nismo vključili v razlago vpliva NM na obliko eritrocitov.

Adsorpcija NM na membrane lahko vodi v zmanjšanje integritete membrane eritrocitov in je lahko posledica:

- (a) enkapsulacije in/ali internalizacije NM v eritrocite, ali
- (b) kraje lipidov iz membrane (t.i. pojav ovijanja fosfolipidov na NM, ang. *membrane wrapping*).

Pojav pod točko a) lahko pojasnimo z večjim številom ježasto oblikovanih eritrocitov (ehinocit) v vzorcu (zabeleženo pri $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$), in sicer kot i) vzrok ali ii) posledico enkapsulacije NM v eritrocite.

- i) Vzrok: Zunanja površina ehinocitov je večja v primerjavi s to pri diskocitih in se lahko porabi za enkapsulacijo delca, iz česar sklepamo na večjo verjetnost enkapsulacije NM v tiste eritrocite, pri katerih je adsorpcija NM preko spremembe ukrivljenosti membrane povzročila spremembo oblike v ehinocite, ali so ježasto oblikovani eritrociti nastali zaradi drugih dejavnikov (visoka slanost, visok znotrajcelični pH, tudi npr. prisotnosti kationskih amfifilnih liposomov) (Lim in sod., 2002; Hägerstrand, 1999b; Rudenko, 2009, 2010).

(ii.) Posledica: V intaktnih membranah so fosfolipidne glave upognjene pod kotom okvirno 70° (Velikonja in sod., 2013). Elektrostatske interakcije približajo negativno nabiti delec (ali aglomerat NM) in zunanji fosfolipidni sloj (njegov kationski del, t.j. trimetilamonijeve skupine), zato se glave fosfolipidov na zunanji površini postavijo bolj pokonci. To privede do lokalno zmanjšane zunanje površine membrane na posamezno molekulo, kar olajša enkapsulacijo ND ali aglomerata. Ob enkapsulaciji odcepljeni vezikel odnese več notranje površine kot zunanje, kar povzroči povečanje razmerja med zunanjo in notranjo površino membrane (skladno s konceptom BCC; Sheetz in Singer, 1974) in nastanek ehinocitnih oblik.

Ob transformaciji eritrocitov v sferocite se ob kontinuirani izpostavitvi eksogenim snovem (npr. NM v okoliškem mediju) membrana kroglasto oblikovanih celic ne more več nadalje raztezati, kar lahko vodi v pokanje oz. raztrganje membrane. Ob invaginaciji membrane in posledični enkapsulaciji delcev lahko ostanejo v membrani t.i. prehodne pore (ang. *transition pore*; Fošnarič in sod., 2003; Alexeev in sod., 2008), ko se vrat pri enkapsulacijski pori ne zlije nazaj in ostane pretrgan. Nastanek pore iz ravne membrane je sicer energetsko zahteven proces, četudi je končno stanje z oblikovanimi porami energijsko bolj ugodno (Fošnarič in sod., 2003).

Predpostavljamo, da enkapsulacija in oblikovanje por ni običajno prisoten mehanizem ali prvi korak interakcije NM z membrano, ampak se lahko pojavi v določenih pogojih (ki jih še ne znamo opredeliti). Mogoče je, da prisotnost NM v okoliškem mediju destabilizira membrano, saj je membrana z zmanjšano integriteto bolj dovzetna tudi za internalizacijo NM.

Pojav kraje lipidov b) lahko razložimo s predpostavko, da do ovijanja fosfolipidov okoli NM oz. do vezave fosfolipidnega dvosloja na površino NM lahko pride tudi v odsotnosti internalizacije NM, ko je npr. velikost aglomerata prevelika (ali ob drugih dejavnikih, ki jih z obstoječim znanjem še ne znamo razložiti). Razlagamo, da se NM adsorbira na lipidni ali proteinski del membrane, se delno ali popolnoma obda z dvoslojem fosfolipidov; to se lahko tudi odrazi v stanjšanju membrane in večji propustnosti. Poudarjamo, da je predpostavljeni mehanizem špekulativen in ni dokazan z rezultati doktorske naloge.

5.1.2.2.1 Zaključek vpliva na biološke membrane

Iz rezultatov zaključujemo, da imajo NM z adsorbirano CA ($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$) po kontroliranem postopku (t.j. med pripravo suspenzij) višji potencial za spremembe oblike eritrocitov od površinsko neobdelanih CoFe_2O_4 . Prisotnost anionskih ali kationskih skupin na površini NM lahko vpliva na manjšo aglomeracijo NM v suspenziji (in s tem večjim številom delcev na voljo za interakcijo), lahko pa je vzrok za neposredne (elektrostatske) interakcije med NM in lipidnimi ali beljakovinskimi komponentami eritrocitnih membran. Pri interpretaciji rezultatov bi radi izpostavili, da sta bili obe suspenziji ND pripravljene v PBS-citratnem pufru (ki vsebuje citrat, torej CA). Pri $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ je bila CA adsorbirana na površino ND med postopkom priprave (na t.i. kontroliran način na več manjših ND), medtem ko so se ND CoFe_2O_4 v vodni suspenziji najprej združili v večje aglomerate ND, na katere se je CA iz PBS-citratnega pufra kasneje adsorbirala (vzpostavljeno termodinamsko ravnotežje CA na površini ND in v mediju). Poudarjamo, da je bila površina ND v suspenzijah CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ zelo podobna, t.j. nasičena s CA. Testirani ND kobaltovega ferita so se razlikovali v velikosti aglomeratov (manjši aglomerati $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ v primerjavi s temi v suspenziji CoFe_2O_4).

Zaključujemo, da gre pri spremembi oblike eritrocitov najverjetneje za sinergijski vpliv fosfolipidov in proteinov (Graham in Kozlov, 2010; Grebowski in sod., 2013). Če bi predpostavili, da je celotna regulacija oblike eritrocitov vezana na membranske proteine, se pojavi vprašanje, ali mehanska sprememba oblike proteinov zadostuje za spremembo oblike cele celice. Skladno z dejstvom, da umetni fosfolipidni vezikli lahko zavzamejo obliko diskocit, stomatocit, hruškasto oblikovanih veziklov in veziklov s posameznim, ampak nikoli z več kot enim trnom (Kralj-Iglič in sod., 1996), sklepamo, da je membranski citoskelet eritrocitov odgovoren za stabilnost ehinocit (Iglič, 1997) in da zgolj pasivno stabilizira obliko eritrocitov (Hägerstrand in sod., 2000).

V povezavi z vrednotenjem biokompatibilnosti NM za medicinske aplikacije izpostavljamo, da hidrofilni delci dlje časa ostanejo v krvnem obtoku, medtem ko se hidrofobni delci ob stiku z biološkim medijem oplaščijo s plazemskimi proteini in se z vključitvijo komplementarnega sistema (npr. opsonizacija¹¹) izločijo iz sistema (Berry in Curtis, 2009). V okviru doktorske naloge nismo uporabljali močno hidrofobnih NM (tudi ogljikovi NM so imeli v eksperimentalnih medijih naboj na dvosloju); vsi oksidni NM so električno nabiti, razen v izoelektrični točki, ko je vsota površinskih nabojev enaka nič, ali ob vezavi molekul s kemijskimi skupinami, ki ustvarijo hidrofobno površino NM.

¹¹ Opsonizacija je fagocitozni proces odstranjevanja tujkov iz telesa z vezavo opsonina (antigena) na površino ("opsonization." Encyclopædia Britannica Online, 2014).

5.1.2.3 Skupni zaključek vpliva na umetne in biološke membrane

Zaključujemo, da obstaja povezava med vplivom NM z različno površino na umetne membrane in biološke membrane eritrocitov; zabeležili smo večji vpliv ND z adsorbirano citronsko kislino ($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$) na GUV (pokanje, tudi spremembe velikosti in oblike), na strukturne spremembe MLV in na spremenjeno morfologijo eritrocitov, v primerjavi z ND CoFe_2O_4 . Nanodelci Fe_2O_3 z različnimi površinskimi lastnostmi so povzročili skoraj neizrazit, medsebojno primerljiv vpliv na GUV ali na eritrocite. Predpostavljamo, da površinske lastnosti NM narekujejo lastnosti NM in aglomeratov, ki se oblikujejo v mediju (velikost, število aglomeratov), kar ključno vpliva na interakcije med suspenzijami NM in testiranimi sistemi. Skladno s pričakovanim smo zabeležili večji vpliv NM z bolj hidrofilno površino, saj so v vodnem mediju bolj dispergirani. Izpostavljamo, da je lahko višja hidrofobnost površine NM vzrok za manjši ovrednoten vpliv NM na umetne ali biološke membrane (Lynch in sod., 2014); bolj hidrofobna površina NM lahko onemogoča stik s testnim sistemom v primerjavi z v polarnih topilih dobro dispergiranimi hidrofilnimi NM.

Poudarjamo, da smo v primerjavo vključili ND s kemijsko različnim jedrom (CoFe_2O_4 ali Fe_2O_3) in da ob interpretaciji različnih površinskih lastnosti NM ne smemo zanemariti vpliva jedra NM in lastnosti eksperimentalnih medijev, uporabljenih v primerjanih študijah. V doktorski nalogi tudi nismo direktno primerjali enako velikih ND (ali aglomeratov) z različnimi površinskimi lastnostmi, zato le na podlagi naših rezultatov ne moremo neposredno potrditi ali zavrnila druge hipoteze. Zgolj predpostavimo lahko, da vezava plasti silicijevega dioksida na ND in/ali molekul, ki vsebujejo karboksilne skupine ali aminoskupine, ustvari biološko bolj inertne ND v primerjavi z adsorpcijo CA na površino ND.

5.1.3 Kvarni učinki kationskih nanodelcev na celične kulture *in vitro*

5.1.3.1 Vpliv PS-NH₂ (z različno količino aminoskupin na površini)

Z večparametrskim vrednotenjem kvarnih učinkov ND na celice (ang. *high content screening analysis*, HCA) smo zabeležili odsotnost povezave med vrednostmi ζ -potenciala polistirenskih ND z vezanimi molekulami z različno količino kationskih funkcionalnih skupin (aminoskupin) in apoptoskim odzivom celic na več nivojih hkrati. Izhajali smo iz predpostavke, da PS-NH₂ niso citotoksični, vendar različna količina aminoskupin ustvari različne stopnje pozitivnega naboja. Kationski ND v odsotnosti kompleksnega biološkega okolja (npr. serumskih proteinov) povzročajo kvarne učinke na plazmalemo in ostale kazalce apoptoze (Wang in sod., 2013a,b), kot so viabilnost celic

(zmanjšanje števila celic, skrčenje jedra, zmanjšana aktivnost mitohondrijev, aktivnost celic na osnovi povišane permeabilizacije plazmaleme), spremembe v znotrajcelični vsebnosti Ca^{2+} in spremembe v delovanju lizosomov. V okviru doktorske naloge smo vpliv različnih površinskih lastnosti ND primerjali v kompleksnem biološkem okolju (v mediju za gojenje celičnih kultur *in vitro*).

Potrdili smo odsotnost apoptotskega odgovora pri polistirenskih ND (brez vezanih molekul) ali anionskih PS-COOH, medtem ko so kationski ND z različno količino funkcionalnih aminoskupin na površini sprožili odgovor, neodvisen od izmerjenih vrednosti ζ -potenciala. Razlog za sporadičen odgovor je lahko tudi neenakomerna stopnja aglomeracije ND, ki smo jo ovrednotili kot neodvisno od izmerjenih vrednosti ζ -potenciala.

Izmed testiranih kvarnih učinkov ND PS-NH₂ so se spremembe delovanja lizosomov izkazale kot prve v odgovoru celice (pred sprožitvijo apoptoze). V skladu s predpostavkami študij (Fröhlich in sod., 2012; Wang in sod., 2013a) mehanizem zakisanja lizosomov lahko razložimo kot posledico delovanja prisotnih funkcionalnih aminoskupin na površini kationskih ND na protonske črpalke (V-ATP-aze), odgovorne za transport protonov preko lizosomalne membrane v lumen organela.

5.1.3.2 Vpliv PS-N(CH₃)₃ (s stalnim pozitivnim nabojem)

S konfokalno fluorescenčno mikroskopijo (pril. B) smo opazili nabrekanje lizosomov po izpostavitvi ND PS z vezanimi trimetilamonijevimi skupinami (PS-N(CH₃)₃), vendar na drugačen način kot pri komercialno dostopnih polistirenskih ND z vezanimi molekulami s funkcionalnimi aminoskupinami (PS-NH₂-Bangs), ki so služili kot pozitivni referenčni NM pri vrednotenju vpliva testiranih ND na vse vrednotene parametre kvarnega učinka na celice; že po 24-urni izpostavitvi (akutna izpostavitve) smo zabeležili porast signala iz lizosomov v celicah pljučnega epitelija (A549), kar razlagamo kot posledico nabrekanja lizosomov zaradi akumulacije ND v organelih (Wang in sod., 2013b). Po 72 urah (kronična izpostavitve) smo skladno z interpretacijo ostalih parametrov kvarnega učinka na celice zabeležili močan vpliv referenčnega materiala (PS-NH₂-Bangs) na viabilnost celic in razpad lizosomov (odraženo v padcu intenzitete signala). Izpostavitve PS-N(CH₃)₃ je po 72 urah povzročila povišanje signala iz lizosomov in nabrekanje, manj izrazito kot pri PS-NH₂-Bangs in bolj kot pri kontrolni izpostavitvi (sl. B17-B19, pril. B) ali negativnem referenčnem materialu (PS-COOH) (Wang in sod., 2013b, *Supplementary material, Figure S5*).

5.1.3.3 Zaključek vpliva kationskih nanodelcev

Največje razlike med vplivom PS-NH₂ in PS-N(CH₃)₃ smo zabeležili pri signalu iz lizosomov. Za razliko od PS-NH₂, PS-N(CH₃)₃ zaradi stalnega pozitivnega naboja na površini (odsotnost protonacije in deprotonacije) ne vplivajo na t.i. efekt protonskih črpalk. Natančnega mehanizma vpliva kationskih ND s stalnim pozitivnim nabojem na lizosome z obstoječimi rezultati in obstoječim znanjem ne znamo podati.

Predpostavljamo,

- i) da rezultati HCA nakazujejo na določeno stopnjo vpliva PS-N(CH₃)₃ na lizosome v odsotnosti zabeležene celične smrti, kar potrjuje, da se odgovor celic na nivoju lizosomov pojavi zelo zgodaj v kaskadi celičnega odziva na NM.
- ii) da PS-N(CH₃)₃ vplivajo na zaustavitev celičnega cikla, kar je v skladu s študijama na kationskih ND PS-NH₂ (Kim in sod., 2013; Loos in sod., 2014). Povišana količina DNK, ki smo jo zabeležili v odsotnosti celične delitve, nakazuje na podvojitev DNK (faza celičnega cikla S; Kim in sod., 2012) v odsotnosti nadaljnjega koraka celične delitve v dve hčerinski celici. Vpliva PS-N(CH₃)₃ na celično smrt nismo zabeležili, vendar sklepamo, da indukcija zaustavitve celičnega cikla lahko ob dolgotrajni izpostavitvi vodi v škodljive posledice za celice, tudi smrtnost (Kim in sod., 2012, 2013).

Zaključujemo, da testirane ND PS-N(CH₃)₃ lahko obravnavamo kot potencialni pozitivni referenčni NM pri nanotoksikoloških študijah in da so ND PS-N(CH₃)₃ primerni za nadaljnje testiranje potencialne uporabe pri zdravljenju malignih tvorbo (tumorjev).

5.1.4 Vpliv nanomaterialov na lipidni metabolizem

Rezultati kvarnih učinkov kationskih ND na celične kulture *in vitro* so nakazali smer najizrazitejšega vpliva kationskih ND na lizosome. Znano je, da se nepravilnosti v delovanju lizosomov lahko odrazijo v akumulaciji celičnih lipidov (pojav fosfolipidoze) v znotrajceličnih lamelarnih telescih (Reasor, 1989; Anderson in Borlak, 2006). Stanje fosfolipidoze se pogosto pojavi ob izpostavljenosti celic kationskim ksenobiotikom, ki imajo amfifilni značaj (ang. *cationic amphiphilic drugs*, CAD) (Anderson in Borlak, 2006; Natalie in sod., 2009; Kuroda in Saito, 2010).

Na podlagi rezultatov vzporednih študij, trenutnega stališča in smernic raziskovanja naše raziskovalne skupine ter skladno z novjšimi raziskavami (Fröhlich in sod., 2012;

Mrakovcic in sod., 2013; Wang in Petersen, 2013) predpostavljamo možnost tvorbe znotrajceličnih lamelarnih teles po določenem času izpostavitve NM kot posledico kopičenja nekatereh NM v lizosomih. Hkrati nekateri avtorji predpostavljajo možnost interakcije NM z lipidnim metabolizmom, npr. CoFe_2O_4 pri dovolj visokih koncentracijah (Marmorato in sod., 2011). Predpostavljamo, da z akumulacijo fosfolipidov v lamelarnih telesih lahko celica iz citoplazme odstrani NM, vezane na fosfolipide, in tako zmanjša količino aktivnih NM, kar lahko zmanjša morebitne kvarne učinke NM (Natalie in sod., 2009).

Sklepamo, da je motnja lipidnega metabolizma eden najzgodnejših in pogosto spregledanih odzivov celice na NM in da je nastanek lamelarnih teles lahko del prilagoditvenega mehanizma celic na stres (Anderson in Borlak, 2006).

Kot predlog nadaljnjih raziskav v smeri vpliva NM na lipidni metabolizem izpostavljamo nedavno raziskavo Loosa in sodelavcev (2014), ki poročajo o vplivu kationskih ND PS- NH_2 na lizosomalno membrano preko t.i. efekta protonskih črpalk. Zabeležili so vpliv PS- NH_2 na signalno kinazno pot rakavih celic z aktivacijo t.i. tarče za rapamicin pri sesalcih (ang. *mammalian target of rapamycin*, mTOR). Ta signalna pot se aktivira pri ugodnih pogojih v okolju (pogoj je normalno delovanje v-ATP-aznih črpalk in nizek pH v lumnu lizosomov) in je odgovorna za proliferacijo celic. Povišanje lizosomalnega pH zaradi delovanja PS- NH_2 , kar smo opazili tudi v naši študiji, je najverjetneje posledica vpliva NM na mTOR signalno pot, kar lahko vodi v razbitje lizosomov, povečano količino RKZ in apoptotsko smrt (Loos in sod., 2014). Avtorji predlagajo možnost uporabe kationskih NM (PS- NH_2) pri zdravljenju kot komplementarno snov kemoterapevtikom (Loos in sod., 2014).

Poleg tega ravno obraten odziv celic na anionske PS-COOH, ki so signalno pot mTOR dodatno aktivirali, zmanjša avtofagijo celic, zato avtorji (Loos in sod., 2014) predlagajo možnost uporabe anionskih NM pri zdravljenju bolezenskih stanj, povezanih z okvarjenim delovanjem lizosomov (Alzheimerjeva, Parkinsonova, Huntingtonova in nekatere avtoimune bolezni) (Bove in sod. 2011; Stern in sod., 2012; Loos in sod., 2014). Disfunkcija lizosomalne razgradnje se odraža tudi v kopičenju nepravilno zviti ali aglomeriranih netopnih proteinov na zunanosti celic, kar je tudi glavna komponenta staranja (Loos in sod., 2014). Kot eno glavnih smernic prihodnjih nanotoksikoloških raziskav predlagamo obravnavo motenj v delovanju celičnih fosfolipidov zaradi vpliva NM na biološke sisteme.

5.1.5 Skupni predpostavljeni mehanizem vpliva nanomaterialov na membrane

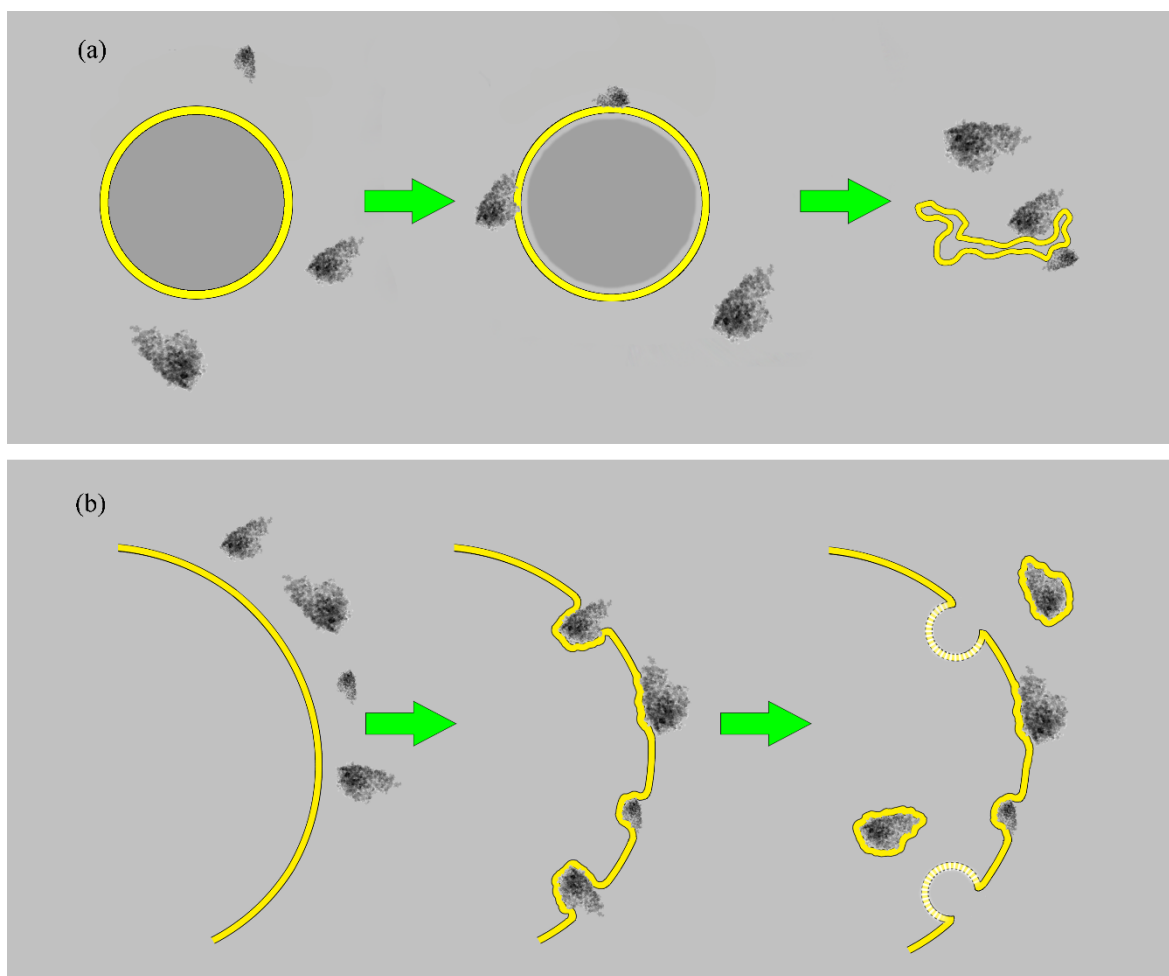
Na podlagi rezultatov doktorske naloge o vplivu NM različnih primarnih oblik in NM z različno površino zaključujemo, da sta najpomembnejši lastnosti NM, ki vplivata na biološko reaktivnost, agregacija NM v biološko relevantnih medijih in sposobnost adsorpcije biomolekul na površino NM. Bolj kot primarna oblika NM so pomembne površinske lastnosti NM, s čimer potrjujemo drugo hipotezo doktorske naloge, medtem ko na podlagi obstoječih rezultatov prve hipoteze o vplivu oblik NM ne moremo z gotovostjo ne potrditi, ne ovreči.

Med izdelavo doktorske disertacije se je izkazalo, da je pri vrednotenju interakcij NM z biološkimi sistemi treba upoštevati vzajemni vpliv oz. kombinacijo lastnosti NM in ne posameznih lastnosti (npr. primarna oblika in/ali površinske lastnosti).

Skladno s podatki iz literature smo predpostavili možne mehanizme interakcije med NM in umetnimi ali biološkimi membranami (sl. 26, Drašler in sod., 2014):

- a) Sprememba globalne ukrivljenosti membrane lahko vodi v razbitje veziklov zaradi spremenjenih fizikalno-kemijskih pogojev v eksperimentalnem mediju, prilepljanja ali vsidranja molekul iz medija (npr. proteinov ali koloidnih delcev oz. ND v lipidni dvosloj ali zaradi ovijanja NM z lipidnim dvoslojem (ang. membrane wrapping).
- b) Sprememba lokalne ukrivljenosti membrane lahko vodi v nastanek vdolbin v membrani zaradi adsorpcije NM, in posledično enkapsulacijo oz. internalizacijo ND ali aglomeratov v vezikle. Predpostavljamo, da močno polarni ND lahko povzročijo pojav t.i. kraje lipidov iz membrane in da vsi predlagani mehanizmi delovanja NM lahko vodijo v zmanjšanje integritete membrane in/ali oblikovanje lukenj ali por.

Spremembe lokalne ali globalne ukrivljenosti membrane zaradi delovanja NM na fosfolipide lahko poleg neposrednega vpliva NM na membranske proteine na aktivnost membranskih proteinov vplivajo tudi preko lateralnega pritiska v membrani.



Slika 26: Predpostavljeni mehanizmi vpliva nanomaterialov in njihovih aglomeratov na umetne ali biološke membrane.

Adsorpcija NM in/ali njihovih aglomeratov na membrane lahko vodi v (a) pokanje veziklov zaradi spremenjene globalne ukrivljenosti membrane, ali (b) ugreznitev oz. vsidranje NM in/ali aglomeratov NM v membrane; slednjemu lahko sledi enkapsulacija (internalizacija) ali ovitje NM in/ali aglomeratov s fosfolipidnim dvoslojem. Povzeto po: Drašler in sod., 2014, *International Journal of Nanomedicine*, 9:1559-1581.

5.2 SKLEPI

1. Primarna oblika NM je pomembna pri redukcionističnem vrednotenju vpliva na izolirane sisteme (npr. pri neposredni izpostavitvi NM in lipidov v istem topilu ali pri simulacijskih študijah molekulske dinamike).
2. Biološka aktivnost NM je odvisna od njihovih sekundarnih značilnosti, ki se oblikujejo v suspenziji (hidrodinamska velikost NM in aglomeratov, oblika končnih aglomeratov NM, naboj električne dvojne plasti na površini NM v biološkem mediju).
3. Sekundarne značilnosti so posledica primarnih značilnosti NM (kemijska sestava, primarna velikost, površinske lastnosti oz. primarni površinski naboj delca ali hidrofobnost površine) in eksperimentalnega medija; pomembna je natančna karakterizacija in interpretacija lastnosti NM v biološko relevantnih medijih. Pri vrednotenju vpliva NM bi bilo namesto primerjave masnih izpostavitvenih koncentracij NM bolj smiselno primerjati število NM ali aglomeratov NM, ki se oblikujejo v suspenziji, in dostopno površino NM za interakcijo s testnim sistemom.
4. Pri vrednotenju interakcij NM z biološkimi sistemi je treba upoštevati vzajemni vpliv oz. kombinacijo lastnosti NM, in ne le posameznih lastnosti (npr. primarna oblika in/ali površinske lastnosti).
5. Rezultati študij na bioloških membranah izoliranih eritrocitov in modelnih membranskih proteinih so v skladu z rezultati vpliva NM na umetne fosfolipidne membrane; obstaja povezava med učinki NM na umetne membrane in realne biološke sisteme.
6. Dovolj majhni NM (npr. molekule C₆₀ in majhni aglomerati) se lahko vgradijo v lipidni dvosloj, kar vodi do različnih subtilnih (komaj opaznih) strukturnih sprememb in hkrati do bolj izrazitih mehanskih sprememb urejenosti fosfolipidnih dvoslojev. Hkrati imajo tudi večji aglomerati NM močan potencial za interakcije z biološkimi sistemi, kar je treba upoštevati pri obravnavanju NM za varno uporabo v medicini.
7. Spremembe membranske elastičnosti (odvisno tudi od sestave fosfolipidov) in/ali ukrivljenosti membrane lahko vplivajo na aktivnost membranskih proteinov in s tem delovanje membrane, tudi v odsotnosti izrazitega zmanjšanja integritete membrane (npr. razbitja veziklov).
8. Izmerjene vrednosti ζ -potenciala kationskih ND PS-NH₂ v fiziološkem pufru PBS, ki imajo različno količino vezanih molekul s funkcionalnimi aminoskupinami, niso v neposredni povezavi z ovrednotenimi kvarnimi učinki ND na celice. Pri vrednotenju vpliva bi bilo treba upoštevati tudi druge lastnosti NM, ki se oblikujejo v biološko relevantnih suspenzijah (npr. oblikovanje proteinske korone, stopnja aglomeracije, koncentracija dostopnih delcev idr.).

9. Četudi so delci v celici zamaskirani s proteini in s tem ne vplivajo na membrane, lahko NM in/ali njihove aglomerate ovrednotimo kot biološko inertne šele v odsotnosti interakcije z lipidnimi komponentami celičnih membran.
10. Eden izmed prvih odzivov celic na prisotnost NM je odgovor na nivoju lizosomov (nabrekanje, spremembe zakisanosti), kar lahko vpliva na moteno razgradnjo fosfolipidov in posledično akumulacijo fosfolipidov v obliki znotrajceličnih lamelarnih telesc.

6 POVZETEK (SUMMARY)

6.1 POVZETEK

Produkti nanotehnologije se v zadnjem desetletju že uporabljajo v predmetih za vsakdanjo rabo, športnih pripomočkih, prehrabni in tekstilni industriji, polprevodnikih, energetiki ter kot diagnostični in terapevtski medicinski agensi. Zaradi uporabe predvsem za zdravljenje tumorskih obolenj in tarčno dostavo učinkovin se zastavlja vprašanje potencialnih kvarnih učinkov na membrane krvnih celic, tarčnih in netarčnih tkiv, ki pridejo v stik z nanomateriali (NM) ob intravenozni administraciji.

Biološka reaktivnost NM je odvisna od njihovih primarnih lastnosti (oblika, velikost, površinski naboj osnovnega delca) ter od lastnosti, ki se oblikujejo v stiku z biološkim medijem. Predpostavili smo, da je interakcija površinsko nemodificiranih NM odvisna od njihove primarne oblike; ločili smo sferične nanodelce (ND), nanocevice in nanoploščice. Reaktivnost NM enake oblike, npr. sferičnih ND, pa je odvisna od njihovih površinskih lastnosti. Od slednjih so tudi odvisne sekundarne lastnosti NM, ki se oblikujejo v suspenziji, saj vezava molekul z različnimi kemijskimi skupinami lahko ključno vpliva na stopnjo aglomeracije in oblikovanje proteinske korone na površini NM.

Prve interakcije NM z biološkimi sistemi potekajo na celičnih membranah. V študiji smo uporabili umetne fosfolipidne membrane v obliki uni- ali multilamelarnih liposomov različnih velikosti, ki so primeren modelni sistem za študije strukturnih in funkcionalnih lastnosti membrane, kot so urejenost fosfolipidnih dvoslojev, stabilnost, fluidnost, fazni prehod fosfolipidov in spreminjanje oblike veziklov kot posledica delovanja eksogenih snovi, tudi NM. Za preverjanje vpliva NM na biološke membrane smo uporabili človeške eritrocite, ki so zaradi kombinacije lastnosti široko uporabljani predvsem za študije spremembe oblike celic pri preiskovanih pogojih.

Komplementarno študijam vpliva NM na lipidne komponente celičnih membran smo z biosenzorskimi encimskimi testi ovrednotili vpliv NM na inhibicijo acetilholinesteraz in adsorpcijo encimov na NM, kar je predstavljalo modelni sistem za membranske beljakovine. Vpliv izbranih lastnosti NM (vezava molekul s kationskimi funkcionalnimi skupinami) smo preverili na celičnih kulturah *in vitro*. Z večparametrsko analizo kvarnih učinkov na celice smo preverjali vpliv polistirenskih nanodelcev na več izbranih apoptotskih parametrov; osredotočili smo se na vpliv različnih površinskih lastnosti kationskih nanodelcev na delovanje lizosomov.

Potrdili smo hipotezo o vplivu primarne oblike NM na biološke sisteme, vendar zaključili, da ni najpomembnejši dejavnik, ki vodi interakcije med NM in membranami. Vpliv primarne oblike je bolj prišel do izraza na izoliranih sistemih liposomov, ko smo zagotovili neposreden stik med NM in fosfolipidi. Najizrazitejše strukturne spremembe multilamelarnih veziklov smo zabeležili v prisotnosti ploščic grafenovega oksida ali amorfne ogljika, sledil je vpliv večslojnih ogljikovih nanocevk in molekul fulerenov C₆₀. Podoben vzorec vpliva smo zabeležili tudi na spremembe oblike eritrocitov ter z encimskimi testi na ribji (*E. electricus*) acetilholinesterazi in encimu iz človeških eritrocitov, torej smo potrdili povezavo med vplivom NM na umetne in biološke membrane (eritrocite in modelne membranske beljakovine).

Delno smo potrdili hipotezo o vplivu različnih površinskih lastnosti NM na njihovo biološko reaktivnost. Zabeležili smo večji vpliv ND kobaltovega ferita z adsorbirano citronsko kislino, ki so oblikovali manjše aglomerate v primerjavi s površinsko neobdelanimi delci, na razbitje liposomov in spremembe oblike eritrocitov in odsotnost bistvenih razlik v vplivu različno površinsko modificiranih ND železovega oksida. Zaključili smo, da obstaja povezava med učinki NM na umetne membrane in biološke membranske sisteme; ta je posredno odvisna od tipa funkcionalne skupine na površini NM, saj vpliva na električni dvosloj, ki se oblikuje v polarnih medijih in narekuje aglomeracijo NM v suspenziji ali v biološkem mediju. Izpostavljamo, da je pri vrednotenju interakcij NM z biološkimi sistemi treba upoštevati vzajemni vpliv oz. kombinacijo lastnosti NM in ne posameznih lastnosti (npr. primarna oblika in/ali površinske lastnosti).

Neposredne povezave med količino aminoskupin na površini polistirenskih nanodelcev in kvarnimi učinki na celične kulture *in vitro* nismo opazili, prav tako ne povezave med izbranimi parametri: velikost in morfologija jedra, mitohondrijski membranski potencial, znotrajcelična koncentracija kalcija, propustnost plazmaleme, število celic in spremembe delovanja lizosomov; slednje se je izkazal kot eden prvih odgovorov celic na dejavnik v okolju (pred sprožitvijo apoptoze). Odgovor različnih kationskih nanodelcev z različnimi lastnostmi površin (vezane molekule z aminoskupinami ali trimetilamonijevimi skupinami, slednje ustvarijo stalni pozitivni naboj v biološkem okolju) se razlikuje na nivoju lizosomov in celičnega cikla.

Predpostavili smo možne mehanizme interakcije med NM in umetnimi ali biološkimi membranami, ki temeljijo na adsorpciji NM na membrane, spremenjeni (lokalni ali globalni) ukrivljenosti membrane, kar lahko vodi v enkapsulacijo NM ali ovijanje z membranskimi fosfolipidi in posledično zmanjšanje integritete membrane (oblikovanje

membranskih por), tudi razbitje liposomov. Zaključili smo, da je vrednotenje vpliva na umetne in biološke membrane pomembno pri obravnavanju NM, predvsem za uporabo v medicinske namene.

6.2 SUMMARY

During this past decade, diverse products of nanotechnology have been used in a variety of applications, such as commercially available sports equipment, food and textiles, semiconductor parts, in energetics, and as diagnostic or therapeutic medical agents. A better understanding of the interactions between nanomaterials (NMs) and blood cell membranes is required especially when nanomaterials are applied for the NM-based treatment of malignancies or for the targeted drug delivery agents. When NMs are administered intravenously they interact with both target and non-target cells, which results in systemic effects, including blood coagulation and changes in membrane permeability.

Biological reactivity of NMs is affected by their primary characteristics (shape, size, and surface charge of the primary particles), and the characteristics formed in the contact with biological systems. We hypothesized that the interaction of surface-unmodified NMs depends on their primary shape; we distinguished spherical nanoparticles (NPs), nanotubes and nanoplatelets. We assumed that the reactivity of similarly shaped NM depends on their surface characteristics; the latter also affects the secondary NM characteristics which form in the suspension (e.g. degree of agglomeration, protein corona formation).

The first interactions of NM with biological systems occur at the cell membranes. We used artificial phospholipid membranes forming differently sized uni- or multilamellar liposomes, which are a suitable system for the investigation of the structural and functional membrane properties, such as the order of correlated phospholipid bilayers, their stability, fluidity, phase transition and alterations in the shape of liposomes as a consequence of exogenously added substances (also NM). To assess the effect of NM on biological membranes, we used human red blood cells; due to the unique combination of characteristics, they are a widely used system for studying cell shape alterations at the specified testing conditions.

Complementary to the assessment of the effect of NM on the lipid component of the cell membranes, we applied biosensor enzymatic tests with acetylcholinesterase as model systems for the assessment of effect of NM on the protein components of the membranes.

The effects of the selected characteristics of NMs (cationic surface modification) was assessed *in vitro* by the selected cell lines. We applied multiparametric approach, namely high content screening analysis, to assess the effect of cationic NPs on selected apoptotic parameters; our main focus was to find the connection between cationic NP surface and lysosomal functionality.

We confirmed the first hypothesis on the importance of primary NM shape in the interaction with biological systems, though concluded that it was not the main factor governing the NM-membrane interactions. The influence of the primary shape was more pronounced with isolated lipid systems, where direct contact between NM and lipids was provided. The most prominent structural alterations of multilamellar vesicles were observed after the exposure to graphene oxide platelets or carbon black, followed by multi-walled carbon nanotubes and fullerenes C₆₀. Similar effect was observed for shape alterations of human erythrocytes and with the enzymatic test on the vertebrate (*E. electricus*) and human erythrocyte acetylcholinesterase. We confirmed the connection between the effect on artificial and biological membranes (erythrocytes and model membrane proteins).

The second hypothesis that biological reactivity depends on the surface modification of NMs was partially confirmed. More pronounced effects of the citric acid-adsorbed cobalt ferrite NPs (which formed smaller agglomerates in the suspension, in comparison to the surface-unmodified NPs) on the liposomal rupture and the alterations of the erythrocyte shapes were observed, but no significant differences among the different surface-modified iron oxide NPs. We suggest that the type of the functional group influences the electric double bilayer on the surface of NM in the suspension or in the biological medium, which essentially affects their effect on artificial or biological membranes. Not only single NM properties (primary shape and/or surface characteristics), but combination of NM characteristics has to be considered when assessing their interactions with biological systems.

There was no significant connection between the relative amount of the amino groups on the surface of polystyrene NPs, and the deleterious effect on the cell cultures *in vitro*. Also, no relationship was observed among the tested parameters: nuclear size and morphology, mitochondrial membrane potential, intracellular calcium level, plasma membrane permeability, cell number, and the alterations in lysosomal functionality; the latter has been observed to be one of the earliest cell responses to stress or the exogenously added factors, prior to the apoptosis. The main difference in the cell response to differently surface modified cationic NPs, *i.e.* amino- or trimethylammonium-modified

(the latter exhibit constant positive surface charge), was observed to be the lysosomal and the cell cycle impairment.

We proposed possible mechanisms governing interactions between the NM and the artificial or biological membranes. The explanations of the mechanisms are based on the adsorption of NMs on the membranes, leading to the altered membrane curvature (local or global) which can in turn cause NM encapsulation or membrane wrapping by NM, and, consequently, leads to the reduced membrane integrity (formation of membrane pores), and also rupture of liposomes. We concluded that the assessment of the effect of NMs on membranes is important when considering safe application of NM, especially for biomedical purposes.

7 PRISPEVEK AVTORICE K DOKTORSKEMU DELU

Kot avtorica doktorske disertacije sem pripravila vzorce umetnih ali bioloških membran in izpostavitev suspenzijam nanomaterialom. Pripravila sem orjaške unilamelarne vezikle in izvedla zajem videoposnetkov s fazno-kontrastno mikroskopijo. Po avtomatski segmentaciji posnetkov sem ročno pregledala dobljene mozaike veziklov; računalniško vodeno obdelavo videoposnetkov in statistično analizo populacij veziklov smo izpeljali pod vodstvom dr. Jerneja Zupanca. Aktivno sem sodelovala pri optimizaciji t.i. biosenzorskega sistema za vrednotenje vpliva nanomaterialov na orjaške unilamelarne vezikle. Pripravila sem vzorce multilamelarnih veziklov in sodelovala pri izvedbi poskusov na konvencionalnem in sinhrotronskem viru žarkovne linije sipanja X-žarkov pod majhnim kotom svetlobe. Obdelavo dobljenih spektrov in analizo rezultatov smo izvedli v sodelovanju s prof. dr. Michaelom Rappoltom in dr. Aminom Sadeghpourom. Pripravila sem vzorce majhnih, velikih ali multilamelarnih veziklov in izvedla meritve fluorescenčne polarizacije ter diferencialne dinamične kalorimetrije ter statistično obdelala dobljene spektre in podatke. Izolirala sem vzorce eritrocitov iz venske krvi in jih predpripravila za fiksacijo vzorcev za elektronsko mikroskopijo; slednjo smo izvedli s pomočjo dr. Mateja Hočevarja na Inštitutu za kovinske materiale in tehnologije. Izvedla sem encimske teste z acetilholinesterazami. Pripravila sem suspenzije nanomaterialov za karakterizacijo; transmisijsko elektronsko mikroskopijo, dinamično sipanje svetlobe, meritve zeta potenciala in interpretacijo rezultatov pa smo izvedli v sodelovanju z Odsekom za sintezo materialov (K8) Inštituta Jožef Štefan v Ljubljani (prof. dr. Darko Makovec, dr. Slavko Kralj).

V obsegu enega daljšega in dveh krajših študijskih obiskov na Centru za bionanointerakcije (*Centre for Bionano Interactions, University College Dublin, Irska*)

sem vzdrževala uporabljene celične linije in izvedla poskuse izpostavitve celic nanomaterialom, pripravo vzorcev celic in izvedbo meritev na inštrumentu za večparametrsko vrednotenje kvarnih učinkov nanomaterialov in statistično obdelala rezultate. S tehniko imunooznačevanja sem pripravila vzorce celic za fluorescenčno konfokalno mikroskopijo in posnela vzorce celic. Izvedla sem osnovne meritve dinamičnega sipanja svetlobe in zeta potenciala polistirenskih nanodelcev.

Kot prva avtorica znanstvenega članka, citiranega v disertaciji (Drašler in sod., 2014), sem s pomočjo mentorice prof. dr. Damjane Drobne in ostalih soavtorjev naredila pregled literature in rezultatov ter jih primerno diskutirala. Kot soavtorica štirih znanstvenih člankov sem aktivno sodelovala pri izvedbi poskusov, interpretaciji rezultatov in pisanju navedenih prispevkov (Zupanc in sod., 2012; Mesarič in sod., 2013; Šimundić in sod., 2013; Zupanc in sod., 2014 v *tisku*).

8 VIRI

- Abram V., Berlec B., Ota A., Sentjunc M., Blatnik P., Ulrih N. P. 2013. Effect of flavonoid structure on the fluidity of model lipid membranes. *Food Chemistry*, 139, 1-4: 804-813
- Albanese A., Chan W. C. W. 2011. Effect of Gold Nanoparticle Aggregation on Cell Uptake and Toxicity. *ACS Nano*, 5, 7: 5478-5489
- Alexeev A., Uspal W. E., Balazs A. C. 2008. Harnessing Janus nanoparticles to create controllable pores in membranes. *ACS Nano*, 2, 6: 1117-1122
- Almizraq R., Tchir J. D. R., Holovati J. L., Acker J. P. 2013. Storage of red blood cells affects membrane composition, microvesiculation, and in vitro quality. *Transfusion*, 53, 10: 2258-2267
- Amenitsch H., Rappolt M., Kriechbaum M., Mio H., Laggner P., Bernstorff S. 1998. First performance assessment of the small-angle X-ray scattering beamline at ELETTRA. *Journal of Synchrotron Radiation*, 5: 506-508
- Anderson N., Borlak J. 2006. Drug-induced phospholipidosis. *Febs Letters*, 580, 23: 5533-5540
- Angelova M. I., Dimitrov D. S. 1986. Liposome Electroformation. *Faraday Discussions*, 81: 303-311
- Arduini F., Errico I., Amine A., Micheli L., Palleschi G., Moscone D. 2007. Enzymatic spectrophotometric method for aflatoxin B detection based on acetylcholinesterase inhibition. *Analytical Chemistry*, 79, 9: 3409-3415
- Arrieta D. E., McCurdy S. A., Henderson J. D., Lefkowitz L. J., Reitstetter R., Wilson B. W. 2009. Normal range of human red blood cell acetylcholinesterase activity. *Drug and Chemical Toxicology*, 32, 3: 182-185
- Arufe M. I., Arellano J. M., Garcia L., Albendin G., Sarasquete C. 2007. Cholinesterase activity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) larvae: Characterization and sensitivity to the organophosphate azinphosmethyl. *Aquatic Toxicology*, 84, 3: 328-336
- Asharani P. V., Sethu S., Vadukumpully S., Zhong S. P., Lim C. T., Hande M. P., Valiyaveetil S. 2010. Investigations on the Structural Damage in Human Erythrocytes Exposed to Silver, Gold, and Platinum Nanoparticles. *Advanced Functional Materials*, 20, 8: 1233-1242
- Babnik B., Miklavčič D., Kanduđer M., Hägerstrand H., Kralj-Iglič V., Iglič A. 2003. Shape transformation and burst of giant POPC unilamellar liposomes modulated by non-ionic detergent C12E8. *Chemistry and Physics of Lipids*, 125, 2: 123-138
- Bakry R., Vallant R. M., Najam-Ul-Haq M., Rainer M., Szabo Z., Huck C. W., Bonn G. K. 2007. Medicinal applications of fullerenes. *International Journal of Nanomedicine*, 2, 4: 639-649
- Banaszak-Holl M. M. 2009. Nanotoxicology: a personal perspective, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 1, 4: 353-359
- Baoukina S., Monticelli L., Tieleman D. P. 2013. Interaction of Pristine and Functionalized Carbon Nanotubes with Lipid Membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, 117, 40: 12113-12123
- Batzill M. 2012. The surface science of graphene: Metal interfaces, CVD synthesis, nanoribbons, chemical modifications, and defects. *Surface Science Reports* 67: 83-115.

- Bernstorff S., Amenitsch H., Laggner P. 1998. High-throughput asymmetric double-crystal monochromator of the SAXS beamline at ELETTRA. *Journal of Synchrotron Radiation*, 5: 1215-1221
- Berry C. C. 2009. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 42, 22
- Betz T., Bakowsky U., Muller M. R., Lehr C. M., Bernhardt I. 2007. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry*, 70, 1: 122-126
- Bexiga M. G., Varela J. A., Wang F. J., Fenaroli F., Salvati A., Lynch I., Simpson J. C., Dawson K. A. 2011. Cationic nanoparticles induce caspase 3-, 7- and 9-mediated cytotoxicity in a human astrocytoma cell line. *Nanotoxicology*, 5, 4: 557-567
- Bhattacharya D., Sahu S. K., Banerjee I., Das M., Mishra D., Maiti T. K., Pramanik P. 2011. Synthesis, characterization, and in vitro biological evaluation of highly stable diversely functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 9: 4173-4188
- Bibi S., Kaur R., Henriksen-Lacey M., McNeil S. E., Wilkhu J., Lattmann E., Christensen D., Mohammed A. R., Perrie Y. 2011. Microscopy imaging of liposomes: From coverslips to environmental SEM. *International Journal of Pharmaceutics*, 417, 1-2: 138-150
- Boggs J. M. 1987. Lipid Intermolecular Hydrogen-Bonding - Influence on Structural Organization and Membrane-Function. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 906, 3: 353-404
- Borm P., Klaessig F. C., Landry T. D., Moudgil B., Pauluhn J., Thomas K., Trottier R., Wood S. 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part V: Role of dissolution in biological fate and effects of nanoscale particles. *Toxicological Sciences*, 90, 1: 23-32
- Bothun G. D. 2008. Hydrophobic silver nanoparticles trapped in lipid bilayers: Size distribution, bilayer phase behavior, and optical properties. *Journal of Nanobiotechnology*, 6: 13
- Bouropoulos N., Katsamenis O. L., Cox P. A., Norman S., Kallinteri P., Favretto M. E., Yannopoulos S. N., Bakandritsos A., Fatouros D. G. 2012. Probing the Perturbation of Lecithin Bilayers by Unmodified C-60 Fullerenes Using Experimental Methods and Computational Simulations. *Journal of Physical Chemistry C*, 116, 6: 3867-3874
- Bove J., Martinez-Vicente M., Vila M. 2011. Fighting neurodegeneration with rapamycin: mechanistic insights. *Nature Reviews Neuroscience*, 12, 8: 437-452
- Bu L. H., Xie J., Chen K., Huang J., Aguilar Z. P., Wang A., Sun K. W., Chua M. S., So S., Cheng Z., Eden H. S., Shen B. Z., Chen X. Y. 2012. Assessment and comparison of magnetic nanoparticles as MRI contrast agents in a rodent model of human hepatocellular carcinoma. *Contrast Media & Molecular Imaging*, 7, 4: 363-372
- Caillé A. 1972. Remarques sur la diffusion des rayons X dans les smectiques A. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 274: 891-893
- Campelj S., Makovec D., Drofenik M. 2008. Preparation and properties of water-based magnetic fluids. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 20, 20: 204101-204106
- Cantor R. S. 1999. Lipid composition and the lateral pressure profile in bilayers, *Biophysical Journal*. 76, 5: 2625-2639

- Cantor R. S. 2002. Size distribution of barrel-stave aggregates of membrane peptides: Influence of the bilayer lateral pressure profile. *Biophysical Journal*, 82, 5: 2520-2525
- CAS RN 2013. Screening assessment for the challenge: Carbon Black. 2013. Chemical Abstracts Service Registry: 1333-86-4
- Cedervall T., Lynch I., Lindman S., Berggard T., Thulin E., Nilsson H., Dawson K. A., Linse S. 2007. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 7: 2050-2055
- Chakraborti S., Joshi P., Chakravarty D., Shanker V., Ansari Z. A., Singh S. P., Chakrabarti P. 2012. Interaction of Polyethyleneimine-Functionalized ZnO Nanoparticles with Bovine Serum Albumin. *Langmuir*, 28, 30: 11142-11152
- Chang R., Lee J. 2010. Dynamics of C-60 Molecules in Biological Membranes: Computer Simulation Studies. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31, 11: 3195-3200
- Chang R., Violi A. 2006. Insights into the effect of combustion-generated carbon nanoparticles on biological membranes: A computer simulation study. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 10: 5073-5083
- Chen C. X., Zhu S. B., Huang T. X., Wang S., Yan X. M. 2013. Analytical techniques for single-liposome characterization. *Analytical Methods*, 5, 9: 2150-2157
- Chen R., Choudhary P., Schurr R. N., Bhattacharya P., Brown J. M., Ke P. C. 2012. Interaction of lipid vesicle with silver nanoparticle-serum albumin protein corona. *Applied Physics Letters*, 100, 1: 137030-137034
- Chen Y. J., Bothun G. D. 2009. Lipid-Assisted Formation and Dispersion of Aqueous and Bilayer-Embedded Nano-C-60, *Langmuir*, 25, 9: 4875-4879
- Cokan M. 2006. Temperaturna odvisnost delovanja alkilpiridinijevih polimerov na različne membranske sisteme. Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije: 48 str.
- Colognato R., Bonelli A., Bonacchi D., Baldi G., Migliore L. 2007. Analysis of cobalt ferrite nanoparticles induced genotoxicity on human peripheral lymphocytes: comparison of size and organic grafting-dependent effects. *Nanotoxicology*, 1, 4: 301-308
- Colvin V. L. 2003. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnology*, 21, 10: 1166-1170
- Crane M., Handy R. D., Garrod J., Owen R. 2008. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, 17, 5: 421-437
- da Rocha E. L., Caramori G. F., Rambo C. R. 2013. Nanoparticle translocation through a lipid bilayer tuned by surface chemistry. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 7: 2282-2290
- Da Ros T., Prato M. 1999. Medicinal chemistry with fullerenes and fullerene derivatives. *Chemical Communications*, 8: 663-669
- Dawson K. A., Salvati A., Lynch I. 2009. Nanoparticles reconstruct lipids. *Nature Nanotechnology*, 4, 2: 84-85
- De Gennes P. G., Prost J. 1993. *The physics of liquid crystals*, 2. izd. Oxford, Oxford University Press: 597 str.

- De Jong W. H., Borm P. J. A. 2008. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3, 2: 133-149
- De M., Chou S. S., Dravid V. P. 2011. Graphene Oxide as an Enzyme Inhibitor: Modulation of Activity of alpha-Chymotrypsin. *Journal of the American Chemical Society*, 133, 44: 17524-17527
- De Maria P., Fontana A., Gasbarri C., Velluto D. 2006. Effects of fullerene guests on the stability of 1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine liposomes. *Soft Matter*, 2, 7: 595-602
- de Planque M. R. R., Aghdaei S., Roose T., Morgan H. 2011. Electrophysiological Characterization of Membrane Disruption by Nanoparticles. *ACS Nano*, 5, 5: 3599-3606
- Dellinger A., Zhou Z. G., Connor J., Madhankumar A. B., Pamujula S., Sayes C. M., Kepley C. L. 2013. Application of fullerenes in nanomedicine: an update. *Nanomedicine*, 8, 7: 1191-1208
- Deserno M., Gelbart W. M. 2002. Adhesion and wrapping in colloid-vesicle complexes. *Journal of Physical Chemistry B*, 106, 21: 5543-5552
- Dhawan A., Taurozzi J. S., Pandey A. K., Shan W. Q., Miller S. M., Hashsham S. A., Tarabara V. V. 2006. Stable colloidal dispersions of C-60 fullerenes in water: Evidence for genotoxicity. *Environmental Science & Technology*, 40, 23: 7394-7401
- DiCiccio J. E., Steinberg B. E. 2011. Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. *Journal of General Physiology*, 137, 4: 385-390
- Dobereiner H. G. 2000. Properties of giant vesicles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 5, 3-4: 256-263
- Drašler B., Drobne D., Novak S., Valant J., Boljte S., Otrin L., Rappolt M., Sartori B., Iglič A., Kralj-Iglič V., Šustar V., Makovec D., Gyergyek S., Hočevár M., Godec M., Zupanc J. 2014. Effects of magnetic cobalt ferrite nanoparticles on biological and artificial lipid membranes. *International Journal of Nanomedicine*, 9: 1559-1581
- Dreyer D. R., Park S., Bielawski C. W., Ruoff R. S. 2010. The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews*, 39, 1: 228-240
- Drobne D., Kralj Iglič V. 2009. Lipid Membranes as Tools in Nanotoxicity Studies V: Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes. Leitmannova Liu A., Iglič A. (eds.). 1. izd. Amsterdam, Elsevier B.V., 10: 121-134
- Ellman G. L., Courtney K. D., Andres V., Featherstone R. M. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 2: 88-90
- Ema M., Naya M., Horimoto M., Kato H. 2013. Developmental toxicity of diesel exhaust: A review of studies in experimental animals. *Reproductive Toxicology*, 42: 1-17
- Encyclopædia Britannica Online. Encyclopædia Britannica, 2014.
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/342910/liposome> (2. 9. 2014)
<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/283636/immune-system> (2. 9. 2014)

- Farre M., Perez S., Gajda-Schranz K., Osorio V., Kantiani L., Ginebreda A., Barcelo D. 2010. First determination of C-60 and C(70) fullerenes and N-methylfulleropyrrolidine C-60 on the suspended material of wastewater effluents by liquid chromatography hybrid quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Hydrology*, 383, 1-2: 44-51
- Fošnarič M., Iglič A., Kroll D. M., May S. 2009. Monte Carlo simulations of complex formation between a mixed fluid vesicle and a charged colloid. *Journal of Chemical Physics*, 131, 10: 1051031-1051039
- Frascione D., Diwoky C., Almer G., Opriessnig P., Vonach C., Gradauer K., Leitinger G., Mangge H., Stollberger R., Prassl R. 2012. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO)-based liposomes as magnetic resonance imaging probes. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 2349-2359
- Fröhlich E., Meindl C., Roblegg E., Ebner B., Absenger M., Pieber T. R. 2012. Action of polystyrene nanoparticles of different sizes on lysosomal function and integrity. *Particle and Fibre Toxicology*, 9, 26: 1-13
- Frost R., Jonsson G. E., Chakarov D., Svedhem S., Kasemo B. 2012. Graphene Oxide and Lipid Membranes: Interactions and Nanocomposite Structures. *Nano Letters*, 12, 7: 3356-3362
- Geim A. K., Novoselov K. S. 2007. The rise of graphene. *Nature Mater*, 6: 183-191
- Gill P., Moghadam T. T., Ranjbar B. 2010. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. *Journal of Biomolecular Techniques*, 21, 4: 167-193
- Gimsa J., Ried C. 1995. Do Band-3 Protein Conformational-Changes Mediate Shape Changes of Human Erythrocytes. *Molecular Membrane Biology*, 12, 3: 247-254
- Ginzburg V. V., Balijepailli S. 2007. Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes. *Nano Letters*, 7, 12: 3716-3722
- Glatzer O., Kratky O. 1982. *Small Angle X-ray Scattering*. London, Academic Press: 308 str.
- Gmajner D., Grabnar P. A., Znidaric M. T., Strus J., Sentjurc M., Ulrih N. P. 2011. Structural characterization of liposomes made of diether archaeal lipids and dipalmitoyl-L-alpha-phosphatidylcholine. *Biophysical Chemistry*, 158, 2-3: 150-156
- Goertz M. P., Goyal N., Bunker B. C., Montano G. A. 2011. Substrate effects on interactions of lipid bilayer assemblies with bound nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 358, 2: 635-638
- Graham T. R., Kozlov M. M. 2010. Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. *Current Opinion in Cell Biology*, 22, 4: 430-436
- Gratton S., Ropp P.A., Pohlhaus P.D, Luft J.C., Madden V.J., Napier M.E., DeSimone J.M. 2008. The effect of particle design on cellular internalization pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 33: 11613-11618
- Grebowski J., Krokosz A., Puchala M. 2013. Fullerenol C(6)(O)(OH)(3)(6) could associate to band 3 protein of human erythrocyte membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1828, 9: 2007-2014
- Grigorova M., Blythe H. J., Blaskov V., Rusanov V., Petkov V., Masheva V., Nihtianova D., Martinez L. M., Munoz J. S., Mikhov M. 1998. Magnetic properties and

- Mossbauer spectra of nanosized CoFe(2)O(4) powders. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 183, 1-2: 163-172
- Gruner S. M. 1985. Intrinsic Curvature Hypothesis for Biomembrane Lipid-Composition - a Role for Nonbilayer Lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82, 11: 3665-3669
- Guinier A. 1963. X-ray diffraction. San Francisco, W. H. Freeman and Co.: 378 str.
- Gyergyek S., Drofenik M., Makovec D. 2012. Oleic-acid-coated CoFe₂O₄ nanoparticles synthesized by co-precipitation and hydrothermal synthesis. *Materials Chemistry and Physics*, 133, 1: 515-522
- Hägerstrand H., Danieluk M., Bobrowska-Hägerstrand M., Pector V., Ruyschaert J. M., Kralj-Iglic V., Iglic A. 1999a. Liposomes composed of a double-chain cationic amphiphile (Vectamidine) induce their own encapsulation into human erythrocytes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1421, 1: 125-130
- Hägerstrand H., Kralj-Iglic V., Bobrowska-Hägerstrand M., Iglic A. 1999b. Membrane skeleton detachment in spherical and cylindrical microexovesicles. *Bulletin of Mathematical Biology*, 61, 6: 1019-1030
- Hammersley R.P. 1997. Fit2d: an introduction and overview, ESRF Internal Report, ESRF97HA02T: 1 str.
http://www.esrf.eu/computing/scientific/FIT2D/FIT2D_REF/node268.html (17. 6. 2014)
- Han Y. C., Wang X. Y., Dai H. L., Li S. P. 2012. Nanosize and Surface Charge Effects of Hydroxyapatite Nanoparticles on Red Blood Cell Suspensions. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 4, 9: 4616-4622
- Hidber P. C., Graule T. J., Gauckler L. J. 1996. Citric acid - A dispersant for aqueous alumina suspensions. *Journal of the American Ceramic Society*, 79, 7: 1857-1867
- Hong S. P., Leroueil P. R., Janus E. K., Peters J. L., Kober M. M., Islam M. T., Orr B. G., Baker J. R., Holl M. M. B. 2006. Interaction of polycationic polymers with supported lipid bilayers and cells: Nanoscale hole formation and enhanced membrane permeability. *Bioconjugate Chemistry*, 17, 3: 728-734
- Hope M. J., Bally M. B., Mayer L. D., Janoff A. S., Cullis P. R. 1986. Generation of Multilamellar and Unilamellar Phospholipid-Vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 40, 2-4: 89-107
- Hotani H., Nomura F., Suzuki Y. 1999. Giant liposomes: from membrane dynamics to cell morphogenesis. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 4, 5: 358-368
- Hou P. X., Xu S. T., Ying Z., Yang Q. H., Liu C., Cheng H. M. 2003. Hydrogen adsorption/desorption behavior of multi-walled carbon nanotubes with different diameters. *Carbon*, 41, 13: 2471-2476
- Huang T. C., Toraya H., Blanton T. N., Wu Y. 1993. X-Ray-Powder Diffraction Analysis of Silver Behenate, a Possible Low-Angle Diffraction Standard. *Journal of Applied Crystallography*, 26: 180-184
- Hurjui I., Neamtu A., Dorohoi D. O. 2013. The interaction of fluorescent DPH probes with unsaturated phospholipid membranes: A molecular dynamics study. *Journal of Molecular Structure*, 1044: 134-139
- Hurt R. H., Monthieux M., Kane A. 2006. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. *Carbon*, 44, 6: 1028-1033

- Hussain S., Boland S., Baeza-Squiban A., Hamel R., Thomassen L. C. J., Martens J. A., Billon-Galland M. A., Fleury-Feith J., Moisan F., Pairon J. C., Marano F. 2009. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: Role of particle surface area and internalized amount. *Toxicology*, 260, 1-3: 142-149
- Iglic A. 1997. A possible mechanism determining the stability of spiculated red blood cells. *Journal of Biomechanics*, 30, 1: 35-40
- Iglič A., Hägerstrand H., Kralj-Iglič V., Bobrowska- Hägerstrand M. 1998. A possible physical mechanism of red blood cell vesiculation obtained by incubation at high pH. *Journal of Biomechanics*, 31, 2: 151-156
- Iijima S. 1991. Helical Microtubules of Graphitic Carbon. *Nature*, 354, 6348: 56-58
- Ikeda A., Mori M., Kiguchi K., Yasuhara K., Kikuchi J., Nobusawa K., Akiyama M., Hashizume M., Ogawa T., Takeya T. 2012. Advantages and Potential of Lipid-Membrane-Incorporating Fullerenes Prepared by the Fullerene-Exchange Method. *Chemistry-an Asian Journal*, 7, 3: 605-613
- Ikeda A., Sato T., Kitamura K., Nishiguchi K., Sasaki Y., Kikuchi J., Ogawa T., Yogo K., Takeya T. 2005. Efficient photocleavage of DNA utilising water-soluble lipid membrane-incorporated [60]fullerenes prepared using a [60]fullerene exchange method. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3, 16: 2907-2909
- Jackson P., Hougaard K. S., Boisen A. M. Z., Jacobsen N. R., Jensen K. A., Moller P., Brunborg G., Gutzkow K. B., Andersen O., Loft S., Vogel U., Wallin H. 2012. Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: Effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring. *Nanotoxicology*, 6, 5: 486-500
- Janiak M. J., Small D. M., Shipley G. G. 1976. Nature of the Thermal pretransition of synthetic phospholipids: dimyristoyl- and dipalmitoyllecithin. *Biochemistry*, 15, 21: 4575-4580
- Jedlovsky-Hajdu A., Bombelli F. B., Monopoli M. P., Tombacz E., Dawson K. A. 2012. Surface Coatings Shape the Protein Corona of SPIONs with Relevance to Their Application in Vivo. *Langmuir*, 28, 42: 14983-14991
- Jefferson D. A. 2000. The surface activity of ultrafine particles. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series a-Mathematical Physical and Engineering Sciences*, 358, 1775: 2683-2692
- Jeng U., Lin T. L., Shin K., Hsu C. H., Lee H. Y., Wu M. H., Chi Z. A., Shih M. C., Chiang L. Y. 2003. Lipophilic C-60-derivative-induced structural changes in phospholipid layers. *Physica B-Condensed Matter*, 336, 1-2: 204-210
- Jeng U. S., Hsu C. H., Lin T. L., Wu C. M., Chen H. L., Tai L. A., Hwang K. C. 2005. Dispersion of fullerenes in phospholipid bilayers and the subsequent phase changes in the host bilayers. *Physica B-Condensed Matter*, 357, 1-2: 193-198
- Jensen A. W., Wilson S. R., Schuster D. I. 1996. Biological applications of fullerenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 4, 6: 767-779
- Jesenek D., Perutkova S., Gozdz W., Kralj-Iglic V., Iglic A., Kralj S. 2013. Vesiculation of biological membrane driven by curvature induced frustrations in membrane orientational ordering. *International Journal of Nanomedicine*, 8: 677-687
- Jorio A., Saito R., Hafner J. H., Lieber C. M., Hunter M., McClure T., Dresselhaus G., Dresselhaus M. S. 2001. Structural (n, m) determination of isolated single-wall

- carbon nanotubes by resonant Raman scattering. *Physical Review Letters*, 86, 6: 1118-1121
- Kato S., Kikuchi R., Aoshima H., Saitoh Y., Miwa N. 2010. Defensive effects of fullerene-C60/liposome complex against UVA-induced intracellular reactive oxygen species generation and cell death in human skin keratinocytes HaCaT, associated with intracellular uptake and extracellular excretion of fullerene-C60. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 98, 2: 144-151
- Katsamenis O. L., Bouropoulos N., Fatouros D. G. 2009. Interaction of Fullerenes C-60 with Large Unilamellar Vesicles. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5, 4: 416-420
- Kim J. A., Aberg C., de Carcer G., Malumbres M., Salvati A., Dawson K. A. 2013. Low Dose of Amino-Modified Nanoparticles Induces Cell Cycle Arrest. *ACS Nano*, 7, 11: 10433-10433
- Kim J. A., Aberg C., Salvati A., Dawson K. A. 2012. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. *Nature Nanotechnology*, 7, 1: 62-68
- Kogej K. 2010. Površinska in koloidna kemija. 1. izd., 1. natis. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo: 185 str.
- Koike E., Kobayashi T. 2006. Chemical and biological oxidative effects of carbon black nanoparticles. *Chemosphere*, 65, 6: 946-951
- Kopecka J., Pempkowiak J. 2008. Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70, 3: 379-391
- Kornberg R. D., McConnel H. M. 1971. Inside-Outside Transitions of Phospholipids in Vesicle Membranes. *Biochemistry*, 10, 7: 1111- 1120
- Kralj-Iglic V. 2012. Stability of membranous nanostructures: a possible key mechanism in cancer progression. *International Journal of Nanomedicine*, 7: 3579-3596
- Kralj-Iglic V., Gomiscek G., Majhenc J., Arrigler V., Svetina S. 2001. Myelin-like protrusions of giant phospholipid vesicles prepared by electroformation. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 181, 1-3: 315-318
- Kralj S., Drofenik M., Makovec D. 2011. Controlled surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles with terminal amino and carboxyl groups. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 7: 2829-2841
- Kralj S., Makovec D. 2014. The chemically directed assembly of nanoparticle clusters from superparamagnetic iron-oxide nanoparticles. *RSC Advances*, 4, 25: 13167-13171
- Kralj S., Makovec D., Campelj S., Drofenik M. 2010. Producing ultra-thin silica coatings on iron-oxide nanoparticles to improve their surface reactivity. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 322, 13: 1847-1853
- Kralj S., Rojnik M., Romih R., Jagodic M., Kos J., Makovec D. 2012. Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 14: 1151
- Kralj-Iglic V., Svetina S., Zeks B. 1996. Shapes of bilayer vesicles with membrane embedded molecules. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 24, 5: 311-321
- Kroto H. W., Heath J. R., O'Brien S. C., Curl R. F., Smalley R. E. 1985. C-60 – Buckminsterfullerene. *Nature*, 318, 6042: 162-163

- Kuroda Y., Saito M. 2010. Prediction of phospholipidosis-inducing potential of drugs by in vitro biochemical and physicochemical assays followed by multivariate analysis. *Toxicology in Vitro*, 24, 2: 661-668
- Laggner P., Mio H. 1992. Swax - a Dual-Detector Camera for Simultaneous Small-Angle and Wide-Angle X-Ray-Diffraction in Polymer and Liquid-Crystal Research. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section a-Accelerators Spectrometers Detectors and Associated Equipment*, 323, 1-2: 86-90
- Lakowicz J. R. 2006. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 3. izd. New York, Springer: 954 str.
- Lammel T., Boisseaux P., Fernandez-Cruz M. L., Navas J. M. 2013. Internalization and cytotoxicity of graphene oxide and carboxyl graphene nanoplatelets in the human hepatocellular carcinoma cell line Hep G2. *Particle and Fibre Toxicology*, 10, 27: 1-21
- Lascialfari A., Sangregorio C. 2011. Magnetic Nanoparticles in biomedicine Recent advances. *Chimica Oggi-Chemistry Today*, 29, 2: 20-23
- Lasic D. 1993. *Liposomes: From physics to applications*. Amsterdam, Elsevier B.V.: 63-107
- Laurencin M., Georgelin T., Malezieux B., Siaugue J. M., Menager C. 2010. Interactions Between Giant Unilamellar Vesicles and Charged Core-Shell Magnetic Nanoparticles. *Langmuir*, 26, 20: 16025-16030
- Leroueil P. R., Berry S. A., Duthie K., Han G., Rotello V. M., McNerny D. Q., Baker J. R., Orr B. G., Holl M. M. B. 2008. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. *Nano Letters*, 8, 2: 420-424
- Li X. Y., Shi Y. C., Miao B., Zhao Y. L. 2012. Effects of Embedded Carbon Nanotube on Properties of Biomembrane. *Journal of Physical Chemistry B*, 116, 18: 5391-5397
- Liao K. H., Lin Y. S., Macosko C. W., Haynes C. L. 2011. Cytotoxicity of Graphene Oxide and Graphene in Human Erythrocytes and Skin Fibroblasts. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 3, 7: 2607-2615
- Lichtenberg D., Menashe M., Donaldson S., Biltonen R. L. 1984. Thermodynamic Characterization of the Pretransition of Unilamellar Dipalmitoyl-Phosphatidylcholine Vesicles. *Lipids*, 19, 6: 395-400
- Lien Y. H., Wu T. M., Wu J. H., Liao J. W. 2011. Cytotoxicity and drug release behavior of PNIPAM grafted on silica-coated iron oxide nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 13, 10: 5065-5075
- Lim H. W. G., Wortis M., Mukhopadhyay R. 2002. Stomatocyte-discocyte-echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer- couple hypothesis from membrane mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99, 26: 16766-16769
- Lipowsky R. 1991. The conformation of membranes. *Nature*, 349: 475-485
- Lipowsky R., Dobereiner H. G. 1998. Vesicles in contact with nanoparticles and colloids. *Europhysics Letters*, 43, 2: 219-225
- Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. 2000. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. New York, W. H. Freeman: Section 5.3, Biomembranes: Structural Organization and Basic Functions.

- Loos C., Syrovets T., Musyanovych A., Mailander V., Landfester K., Simmet T. 2014. Amino-functionalized nanoparticles as inhibitors of mTOR and inducers of cell cycle arrest in leukemia cells. *Biomaterials*, 35, 6: 1944-1953
- Lundbaek J. A., Collingwood S. A., Ingolfsson H. I., Kapoor R., Andersen O. S. 2010. Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes. *Journal of the Royal Society Interface*, 7, 44: 373-395
- Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T., Dawson K. A. 2008. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 38: 14265-14270
- Lynch I., Weiss C., Valsami-Jones E. 2014. A strategy for grouping of nanomaterials based on key physico-chemical descriptors as a basis for safer-by-design NMs. *Nano Today*, 9: 266-270
- Mabrey S., Sturtevant J. M. 1976. Investigation of Phase-Transitions of Lipids and Lipid Mixtures by High Sensitivity Differential Scanning Calorimetry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73, 11: 3862-3866
- Markvoort A. J., van Santen R. A., Hilbers P. A. J. 2006. Vesicle shapes from molecular dynamics simulations. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 45: 22780-22785
- Marmorato P., Ceccone G., Gianoncelli A., Pascolo L., Ponti J., Rossi F., Salome M., Kaulich B., Kiskinova M. 2011. Cellular distribution and degradation of cobalt ferrite nanoparticles in Balb/3T3 mouse fibroblasts. *Toxicology Letters*, 207, 2: 128-136
- Mavcic B., Babnik B., Iglic A., Kanduser M., Slivnik T., Kralj-Iglic V. 2004. Shape transformation of giant phospholipid vesicles at high concentrations of C12E8. *Bioelectrochemistry*, 63, 1-2: 183-187
- Maysinger D., Lovric J. 2007. Quantum dots and other fluorescent nanoparticles: Quo vadis in the cell? *Bio-Applications of Nanoparticles*, 620: 156-167
- Mcintosh T. J., Simon S. A. 1986. Hydration Force and Bilayer Deformation - a Reevaluation. *Biochemistry*, 25, 14: 4058-4066
- McMahon H. T., Gallop J. L. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature*, 438, 7068: 590-596
- Mecke A., Majoros I. J., Patri A. K., Baker J. R., Holl M. M. B., Orr B. G. 2005. Lipid bilayer disruption by polycationic polymers: The roles of size and chemical functional group. *Langmuir*, 21, 23: 10348-10354
- Meng J., Cheng X. L., Liu J., Zhang W. Q., Li X. J., Kong H., Xu H. Y. 2012. Effects of Long and Short Carboxylated or Aminated Multiwalled Carbon Nanotubes on Blood Coagulation. *Plos One*, 7, 7: e38995
- Mesarič T., Baweja L., Drašler B., Drobne D., Makovec D., Dušak P., Dhawan A., Sepčič K. 2013. Effects of surface curvature and surface characteristics of carbon-based nanomaterials on the adsorption and activity of acetylcholinesterase. *Carbon*, 62: 222-232
- Michel R., Gradzielski M. 2012. Experimental Aspects of Colloidal Interactions in Mixed Systems of Liposome and Inorganic Nanoparticle and Their Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 9: 11610-11642

- Mikhaylova M., Kim D. K., Bobrysheva N., Osmolowsky M., Semenov V., Tsakalakos T., Muhammed M. 2004. Superparamagnetism of magnetite nanoparticles: Dependence on surface modification. *Langmuir*, 20, 6: 2472-2477
- Monopoli M. P., Aberg C., Salvati A., Dawson K. A. 2012. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7, 12: 779-786
- Monopoli M. P., Walczyk D., Campbell A., Elia G., Lynch I., Bombelli F. B., 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
- Monticelli L., Salonen E., Ke P. C., Vattulainen I. 2009. Effects of carbon nanoparticles on lipid membranes: a molecular simulation perspective. *Soft Matter*, 5, 22: 4433-4445
- Mrakovcic M., Absenger M., Riedl R., Smole C., Roblegg E., Fröhlich L. F., Fröhlich E. 2013. Assessment of Long-Term Effects of Nanoparticles in a Microcarrier Cell Culture System. *Plos One*, 8, 2: e56791
- Naahidi S., Jafari M., Edalat F., Raymond K., Khademhosseini A., Chen P. 2013. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 166, 2: 182-194
- Nappini S., Bombelli F. B., Bonini M., Norden B., Baglioni P. 2010. Magnetoliposomes for controlled drug release in the presence of low-frequency magnetic field. *Soft Matter*, 6, 1: 154-162
- Nappini S., Bonini M., Bombelli F. B., Pineider F., Sangregorio C., Baglioni P., Norden B. 2011. Controlled drug release under a low frequency magnetic field: effect of the citrate coating on magnetoliposomes stability. *Soft Matter*, 7, 3: 1025-1037
- Narducci D. 2007. An introduction to nanotechnologies: What's in it for us? *Veterinary Research Communications*, 31: 131-137
- Natalie M., Margino S., Erik H., Annelieke P., Geert V., Philippe V. 2009. A 96-well flow cytometric screening assay for detecting in vitro phospholipidosis-induction in the drug discovery phase, *Toxicology in Vitro*, 23, 2: 217-226
- Nel A. E., Madler L., Velegol D., Xia T., Hoek E. M. V., Somasundaran P., Klaessig F., Castranova V., Thompson M. 2009. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*, 8, 7: 543-557
- O'Brien P. J., Irwin W., Diaz D., Howard-Cofield E., Krejsa C. M., Slaughter M. R., Gao B., Kaludercic N., Angeline A., Bernardi P., Brain P., Hougham C. 2006. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening. *Archives of Toxicology*, 80, 9: 580-604
- Oberdorster E. 2004. Manufactured nanomaterials (Fullerenes, C-60) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environmental Health Perspectives*, 112, 10: 1058-1062
- Ogorevc E. 2014. Membranski vezikli kot biomarkerji homeostaze (Membrane vesicles as biomarkers of homeostasis). Doktorska disertacija. Ljubljana, Fakulteta za elektrotehniko: 41 str.
- Paasonen L., Sipila T., Subrizi A., Laurinmaki P., Butcher S. J., Rappolt M., Yaghmur A., Urtti A., Yliperttula M. 2010. Gold-embedded photosensitive liposomes for

- drug delivery: Triggering mechanism and intracellular release. *Journal of Controlled Release*, 147, 1: 136-143
- Pabst G., Katsaras J., Raghunathan V. A., Rappolt M. 2003. Structure and interactions in the anomalous swelling regime of phospholipid bilayers. *Langmuir*, 19, 5: 1716-1722
- Pabst G., Rappolt M., Amenitsch H., Laggner P. 2000. Structural information from multilamellar liposomes at full hydration: Full q-range fitting with high quality x-ray data. *Physical Review E*, 62, 3: 4000-4009
- Park K. H., Chhowalla M., Iqbal Z., Sesti F. 2003. Single-walled carbon nanotubes are a new class of ion channel blockers. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 50: 50212-50216
- Park S., Ruoff R. S. 2009. Chemical methods for the production of graphenes. *Nature Nanotechnology*, 4, 4: 217-224
- Partha R., Conyers J. L. 2009. Biomedical applications of functionalized fullerene-based nanomaterials. *International Journal of Nanomedicine*, 4: 261-275
- Parthasarathi R., Tummala N. R., Striolo A. 2012. Embedded Single-Walled Carbon Nanotubes Locally Perturb DOPC Phospholipid Bilayers. *Journal of Physical Chemistry B*, 116, 42: 12769-12782
- Patil Y. P., Jadhav S. 2014. Novel methods for liposome preparation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 177: 8-18
- Pencer J., White G. F., Hallett F. R. 2001. Osmotically induced shape changes of large unilamellar vesicles measured by dynamic light scattering. *Biophysical Journal*, 81, 5: 2716-2728
- Perez-Artacho B., Gallardo V., Ruiz M. A., Arias J. L. 2012. Maghemite/poly(D,L-lactide-co-glycolide) composite nanoplatfrom for therapeutic applications. *Journal of Nanoparticle Research*, 14, 768: 2-10
- Petrache H. I., Tristram-Nagle S., Nagle J. F. 1998. Fluid phase structure of EPC and DMPC bilayers. *Chemistry and Physics of Lipids*, 95, 1: 83-94
- Provencher, S.W. CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations, accessed 2011.
<http://s-provencher.com/pages/contin.shtml> (16. 5. 2014)
- Qiao R., Roberts A. P., Mount A. S., Klaine S. J., Ke P. C. 2007. Translocation of C-60 and its derivatives across a lipid bilayer. *Nano Letters*, 7, 3: 614-619
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.
<http://www.r-project.org> (20. 3. 2014)
- Ramezani F., Amanlou M., Rafii-Tabar H. 2014. Gold nanoparticle shape effects on human serum albumin corona interface: a molecular dynamic study. *Journal of Nanoparticle Research*, 16, 2512: 2-9
- Rappolt M. 2010. Bilayer thickness estimations with "poor" diffraction data. *Journal of Applied Physics*, 107, 8: 0847010-0847017
- Rappolt M., Pabst G. 2008. Flexibility and Structure of Fluid Bilayer Interfaces V: Structure and Dynamics of Membranous Interfaces. Nag, K. (ur.). Hoboken, JohnWiley & Sons: 45-81
- Rappolt M., Vidal M. F., Kriechbaum M., Steinhart M., Amenitsch H., Bernstorff S., Laggner P. 2003. Structural, dynamic and mechanical properties of POPC at low

- cholesterol concentration studied in pressure/temperature space. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*, 31, 8: 575-585
- Reasor M. J. 1989. A Review of the Biology and Toxicologic Implications of the Induction of Lysosomal Lamellar Bodies by Drugs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 97, 1: 47-56
- Reijnders L. 2012. Human health hazards of persistent inorganic and carbon nanoparticles. *Journal of Materials Science*, 47, 13: 5061-5073
- Riske K. A., Barroso R. P., Vequi-Suplicy C. C., Germano R., Henriques V. B., Lamy M. T. 2009. Lipid bilayer pre-transition as the beginning of the melting process. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1788, 5: 954-963
- Roiter Y., Ornatska M., Rammohan A. R., Balakrishnan J., Heine D. R., Minko S. 2008. Interaction of nanoparticles with lipid membrane. *Nano Letters*, 8, 3: 941-944
- Rossi G., Barnoud J., Monticelli L. 2013. Partitioning and solubility of C-60 fullerene in lipid membranes. *Physica Scripta*, 87, 5: 058503-058513
- Rotundo R. L. 2003. Expression and localization of acetylcholinesterase at the neuromuscular junction. *Journal of Neurocytology*, 32, 5-8: 743-766
- Roux A., Cuvelier D., Nassoy P., Prost J., Bassereau P., Goud B. 2005. Role of curvature and phase transition in lipid sorting and fission of membrane tubules. *Embo Journal*, 24, 8: 1537-1545
- Rudenko S. V. 2009. Characterization of morphological response of red cells in a sucrose solution. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 42, 3: 252-261
- Rudenko S. V. 2010. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1798, 9: 1767-1778
- Ruenaroengsak P., Novak P., Berhanu D., Thorley A. J., Valsami-Jones E., Gorelik J., Korchev Y. E., Tetley T. D. 2012. Respiratory epithelial cytotoxicity and membrane damage (holes) caused by amine-modified nanoparticles. *Nanotoxicology*, 6, 1: 94-108
- Ruh H., Kuhl B., Brenner-Weiss G., Hopf C., Diabate S., Weiss C. 2012. Identification of serum proteins bound to industrial nanomaterials. *Toxicology Letters*, 208, 1: 41-50
- Ruiz-Herrero T., Velasco E., Hagan M. F. 2012. Mechanisms of Budding of Nanoscale Particles through Lipid Bilayers. *Journal of Physical Chemistry B*, 116, 32: 9595-9603
- Ruoff R. S., Tse D. S., Malhotra R., Lorents D. C. 1993. Solubility of C-60 in a Variety of Solvents. *Journal of Physical Chemistry*, 97, 13: 3379-3383
- Ruozi B., Tosi G., Forni F., Fresta M., Vandelli M. A. 2005. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25, 1: 81-89
- Safi M., Courtois J., Seigneuret M., Conjeaud H., Berret J. F. 2011. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 32, 35: 9353-9363
- Salvati A., Aberg C., dos Santos T., Varela J., Pinto P., Lynch I., Dawson K. A. 2011. Experimental and theoretical comparison of intracellular import of polymeric nanoparticles and small molecules: toward models of uptake kinetics. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 7, 6: 818-826
- Salvati A., Pitek A. S., Monopoli M. P., Prapainop K., Bombelli F. B., Hristov D. R., Kelly P. M., Aberg C., Mahon E., Dawson K. A. 2013. Transferrin-functionalized

- nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface. *Nature Nanotechnology*, 8, 2: 137-143
- Sato K., Obinata K., Sugawara T., Urabe I., Yomo T. 2006. Quantification of structural properties of cell-sized individual liposomes by flow cytometry. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102, 3: 171-178
- Sayes C. M., Gobin A. M., Ausman K. D., Mendez J., West J. L., Colvin V. L. 2005. Nano-C-60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials*, 26, 36: 7587-7595
- Schara K., Janša V., Šuštar V., Dolinar D., Pavlič J. I., Lokar M., Kralj-Iglič V., Veranič P., Iglič A. 2009. Mechanisms for the formation of membranous nanostructures in cell-to-cell communication. *Cellular & Molecular Biology Letters*, 14, 4: 636-656
- Schmitz G., Muller G. 1991. Structure and Function of Lamellar Bodies, Lipid-Protein Complexes Involved in Storage and Secretion of Cellular Lipids. *Journal of Lipid Research*, 32, 10: 1539-1570
- Schulz M., Olubummo A., Binder W. H. 2012. Beyond the lipid-bilayer: interaction of polymers and nanoparticles with membranes. *Soft Matter*, 8, 18: 4849-4864
- Seelig A., Seelig J. 1974. Dynamic Structure of Fatty Acyl Chains in a Phospholipid Bilayer Measured by Deuterium Magnetic-Resonance. *Biochemistry*, 13, 23: 4839-4845
- Sessa G., Weissmann G. 1968. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research*, 9: 310-318
- Sheetz M. P., Singer S. J. 1974. Biological-Membranes as Bilayer Couples - Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71, 11: 4457-4461
- Šimundić M., Drašler B., Šuštar V., Zupanc J., Štukelj R., Makovec D., Erdogmus D., Hägerstrand H., Drobne D., Kralj-Iglič V. 2013. Effect of engineered TiO₂ and ZnO nanoparticles on erythrocytes, platelet-rich plasma and giant unilamellar phospholipid vesicles. *BMC Veterinary Research*, 9, 7: 1-13
- Sinko G., Vrcek I. V., Goessler W., Leitinger G., Dijanosic A., Miljanic S. 2014. Alteration of cholinesterase activity as possible mechanism of silver nanoparticle toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 21, 2: 1391-1400
- Spohn P., Hirsch C., Hasler F., Bruinink A., Krug H. F., Wick P. 2009. C-60 fullerene: A powerful antioxidant or a damaging agent? The importance of an in-depth material characterization prior to toxicity assays. *Environmental Pollution*, 157, 4: 1134-1139
- Stasiuk M., Bartosiewicz D., Kozubek A. 2008. Inhibitory effect of some natural and semisynthetic phenolic lipids upon acetylcholinesterase activity. *Food Chemistry*, 108, 3: 996-1001
- Stern S. T., Adiseshaiah P. P., Crist R. M. 2012. Autophagy and lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. *Particle and Fibre Toxicology*, 9, 20: 1-15
- Šuštar V., Bedina-Zavec A., Štukelj R., Frank M., Bobojević G., Janša R., Ogorevc E., Kruljc P., Mam K., Šimunič B., Manček-Keber M., Jerala R., Rozman B., Veranič P., Hägerstrand H., Kralj-Iglič V. 2011a. Nanoparticles isolated from blood: a reflection of vesiculability of blood cells during the isolation process. *International Journal of Nanomedicine*, 6: 2737-2748

- Šuštar V., Bedina-Zavec A., Štukelj R., Frank M., Ogorevc E., Janša R., Mam K., Veranič P., Kralj-Iglič V. 2011b. Post-prandial rise of microvesicles in peripheral blood of healthy human donors. *Lipids in Health and Disease*, 10, 47: 1-11
- Thanh N. T. K., Green L. A. W. 2010. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications, *Nano Today*, 5, 3: 213-230
- Thomas R., Park I. K., Jeong Y. Y. 2013. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Multimodal Imaging and Therapy of Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 8: 15910-15930
- Thomassen L. C. J., Rabolli V., Masschaele K., Aberto G., Tomatis M., Ghiazza M., Turci F., Breynaert E., Martra G., Kirschhock C. E. A., Martens J. A., Lison D., Fubini B. 2011. Model System to Study the Influence of Aggregation on the Hemolytic Potential of Silica Nanoparticles. *Chemical Research in Toxicology*, 24, 11: 1869-1875
- Vattanasit U., Navasumrit P., Khadka M. B., Kanitwithayanun J., Promvijit J., Autrup H., Ruchirawat M. 2014. Oxidative DNA damage and inflammatory responses in cultured human cells and in humans exposed to traffic-related particles. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 217, 1: 23-33
- Velikonja A., Santhosh P. B., Gongadze E., Kulkarni M., Eleršič K., Perutkova S., Kralj-Iglič V., Ulrih N. P., Iglič A. 2013. Interaction between Dipolar Lipid Headgroups and Charged Nanoparticles Mediated by Water Dipoles and Ions. *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 8: 15312-15329
- Verde E. L., Landi G. T., Gomes J. A., Sousa M. H., Bakuzis A. F. 2012. Magnetic hyperthermia investigation of cobalt ferrite nanoparticles: Comparison between experiment, linear response theory, and dynamic hysteresis simulations. *Journal of Applied Physics*, 111, 12: 1239021-1239028
- Verma A., Stellacci F. 2010. Effect of Surface Properties on Nanoparticle-Cell Interactions. *Small*, 6, 1: 12-21
- Vermynen J., Nemmar A., Nemeryt B., Hoylaerts M. F. 2005. Ambient air pollution and acute myocardial infarction. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 3, 9: 1955-1961
- Visser M., Waanders S., Krooshoop H. J. G., ten Haken B. 2014. Selective detection of magnetic nanoparticles in biomedical applications using differential magnetometry. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 365: 31-39
- Walter D. 2013. Primary Particles – Agglomerates – Aggregates. Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. Weinheim, Deutsche Forschungsgemeinschaft: 9-24
- Wang B., Zhang L. F., Bae S. C., Granick S. 2008. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 47: 18171-18175
- Wang F. J., Bexiga M. G., Anguissola S., Boya P., Simpson J. C., Salvati A., Dawson K. A. 2013a. Time resolved study of cell death mechanisms induced by amine-modified polystyrene nanoparticles. *Nanoscale*, 5, 22: 10868-10876
- Wang F. J., Yu L., Monopoli M. P., Sandin P., Mahon E., Salvati A., Dawson K. A. 2013b. The biomolecular corona is retained during nanoparticle uptake and protects the cells from the damage induced by cationic nanoparticles until degraded in the lysosomes. *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine*, 9, 8: 1159-1168

- Wang M. J., Petersen N. O. 2013. Lipid-coated gold nanoparticles promote lamellar body formation in A549 cells. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831, 6: 1089-1097
- Wang Z. Y., Zhao J., Li F. M., Gao D. M., Xing B. S. 2009. Adsorption and inhibition of acetylcholinesterase by different nanoparticles. *Chemosphere*, 77, 1: 67-73
- Westerhausen C., Strobl F. G., Herrmann R., Bauer A. T., Schneider S. W., Reller A., Wixforth A., Schneider M. F. 2012. Chemical and Mechanical Impact of Silica Nanoparticles on the Phase Transition Behavior of Phospholipid Membranes in Theory and Experiment. *Biophysical Journal*, 102, 5: 1032-1038
- Wilson S. R. Biological aspects of fullerenes. V: *Fullerenes: Chemistry, physics and technology*. New York, John Wiley and Sons, Inc.: 431-436
- Wong-Ekkabut J., Baoukina S., Triampo W., Tang I. M., Tieleman D. P., Monticelli L. 2008. Computer simulation study of fullerene translocation through lipid membranes. *Nature Nanotechnology*, 3, 6: 363-368
- Worek F., Reiter G., Eyer P., Szinicz L. 2002. Reactivation kinetics of acetylcholinesterase from different species inhibited by highly toxic organophosphates. *Archives of Toxicology*, 76, 9: 523-529
- Xia X. R., Monteiro-Riviere N. A., Mathur S., Song X. F., Xiao L. S., Oldenberg S. J., Fadeel B., Riviere J. E. 2011. Mapping the Surface Adsorption Forces of Nanomaterials in Biological Systems. *ACS Nano*, 5, 11: 9074-9081
- Yang K., Ma Y. Q. 2010. Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer. *Nature Nanotechnology*, 5, 8: 579-583
- Yang K., Zhang S. A., Zhang G. X., Sun X. M., Lee S. T., Liu Z. A. 2010. Graphene in Mice: Ultrahigh In Vivo Tumor Uptake and Efficient Photothermal Therapy. *Nano Letters*, 10, 9: 3318-3323
- Yang W. J., Lee J. H., Hong S. C., Lee J., Lee J., Han D. W. 2013. Difference between Toxicities of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles with Various Surface-Functional Groups against Human Normal Fibroblasts and Fibrosarcoma Cells. *Materials*, 6, 10: 4689-4706
- Yeates D. B., Mauderly J. L. 2001. Inhaled environmental/occupational irritants and allergens: Mechanisms of cardiovascular and systemic responses. *Environmental Health Perspectives*, 109: 479-481
- Yu Y., Granick S. 2009. Pearling of Lipid Vesicles Induced by Nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, 131, 40: 14158-14159
- Zhang C. D., Luo S. M., Chen W. 2013a. Activity of catalase adsorbed to carbon nanotubes: Effects of carbon nanotube surface properties. *Talanta*, 113: 142-147
- Zhang R. T., Suter R. M., Nagle J. F. 1994. Theory of the Structure Factor of Lipid Bilayers. *Physical Review E*, 50, 6: 5047-5060
- Zhang S. W., Nelson A., Beales P. A. 2012. Freezing or Wrapping: The Role of Particle Size in the Mechanism of Nanoparticle-Biomembrane Interaction. *Langmuir*, 28, 35: 12831-12837
- Zhang X., Zhang Y., Zheng Y., Wang B. 2013b. Mechanical characteristics of human red blood cell membrane change due to C60 nanoparticle infiltration. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 15, 7: 2473-2481
- Zi Z. F., Sun Y. P., Zhu X. B., Yang Z. R., Dai J. M., Song W. H. 2009. Synthesis and magnetic properties of CoFe₂O₄ ferrite nanoparticles, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 321, 9: 1251-1255

- Zuo G., Zhou X., Huang Q., Fang H. P., Zhou R. H. 2011. Adsorption of Villin Headpiece onto Graphene, Carbon Nanotube, and C60: Effect of Contacting Surface Curvatures on Binding Affinity. *Journal of Physical Chemistry C*, 115, 47: 23323-23328
- Zupanc J., Bas E., Erdogmus D. 2010a. Analysis of lipid vesicle populations from microscopy video sequences, Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society: 5050-5053
- Zupanc J., Dobnikar A., Drobne D., Valant J., Erdogmus D., Bas E. 2011a. Biological reactivity of nanoparticles: mosaics from optical microscopy videos of giant lipid vesicles. *Journal of Biomedical Optics*, 16, 2: 0260031-02600310
- Zupanc J., Drobne D., Drašler B., Valant J., Iglič A., Kralj-Iglič V., Makovec D., Rappolt M., Sartori B., Kogej K. 2012. Experimental evidence for the interaction of C-60 fullerene with lipid vesicle membranes. *Carbon*, 50, 3: 1170-1178
- Zupanc J., Drobne D., Ster B. 2011b. Markov random field model for segmenting large populations of lipid vesicles from micrographs. *Journal of Liposome Research*, 21, 4: 315-323
- Zupanc J., Valant J., Dobnikar A., Kralj-Iglič V., Iglič A., Drobne D. 2009. Interactions of nanoparticles with lipid vesicles: a population based computer aided image analysis approach. Conference proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society: 1400-1403
- Zupanc J., Valant J., Drobne D., Kralj Iglič V., Iglič A. 2010b. A new approach to analyse effects of nanoparticles on lipid vesicles. *International Journal of Biomedical Nanoscience and Nanotechnology*, 1, 1: 34-51
- Zupanc J., Drašler B., Boljte B., Kralj-Iglič V., Iglič A., Erdogmus D., Drobne D. 2014. Lipid vesicle shape analysis from populations using light video microscopy and computer vision. *Plos One*. *V tisku* 26. 11. 2014.

ZAHVALA

Največjo zahvalo za začetek znanstvene kariere, za vso pridobljeno znanje in velik užitek v raziskovalnem delu izrekam svoji mentorici prof. dr. Damjani Drobne, ki mi je že v samem začetku raziskovalne poti med izdelavo diplomske naloge podala odlično popotnico v svet znanosti. Moje navdušenje nad znanstvenim delom se z vsakim letom sodelovanja v Skupini za nanobiologijo in nanotoksikologijo strmo stopnjuje. Prof. Drobne, hvala vam za novo strast v mojem življenju, za strokovno pomoč in sproščeno vzdušje pri delu.

Draga prof. dr. Kristina Sepčić, hvala tebi in celotni Katedri za biokemijo Oddelka za biologijo za topel sprejem v biokemijski laboratorij in vedno odprta vrata za pomoč pri laboratorijskem delu, različne strokovne nasvete in vedno prijeten klepet.

Prof. Darko Makovec, dr. Slavko Kralj in ostali sodelavci z Odseka za sintezo materialov Inštituta Jožef Štefan, hvala za vedno hitro pripravo in karakterizacijo suspenzij nanomaterialov; predvsem pa najlepša hvala za strokovno razlago. Preko vas sem spoznala nebiološki del nanoznanosti.

Hvala prof. ddr. Alešu Igliču in vsem sodelavcem iz Laboratorija za biofiziko Fakultete za elektrotehniko za možnost izvedbe eksperimentov v njihovem laboratoriju in za strokovno pomoč pri veziklih in mikroskopiranju.

Zahvaljujem se prof. dr. Nataši Poklar Ulrih z Oddelka za živilstvo Biotehniške fakultete za prijazen sprejem v njihove laboratorije. Najlepša hvala za vso podano znanje s področja lipidov. Ajda, predvsem tebi hvala za pomoč pri pripravi liposomov, čiščenju aparatur, obdelavi spektrov in razlagi.

Hvala prof. dr. Veroniki Kralj Iglič za marsikateri dober nasvet glede liposomov in hvala, da ste nam omogočili izvedbo poskusov na človeških eritrocitih. Hvala Romanu in medicinski sestri Milanki za pomoč in potrpežljivost pri pridobivanju vzorcev.

Zahvaljujem se prof. dr. Michaelu Rappoltu za priložnost sodelovanja in izvedbo poskusov na eksperimentalni postaji SAXS na Elettri. Hvala za vso strokovno podporo, hvala Aminu Sadeghpourju za analizo podatkov in Barbari Sartori za tehnično pomoč pri pripravi liposomov.

Dragi bionanoteamovci, brez vas si doktorskega študija in raziskovalnega dela ne morem predstavljati! Zelo sem vesela, da je sodelovanje v raziskovalni skupini obrodilo novo trdno prijateljstvo, Sara, zelo sem vesela, da sva se spoznali in najlepša hvala za podporo pri pisanju »slavnega« članka, doktorske disertacije, za družbo pri obisku laboratorijev v tujini, na službenih in neslužbenih potovanjih in počitnicah, za sprostitev ob kavi, zjutraj ali popoldne. Janez, najlepša hvala, da si me vpeljal v laboratorijsko delo in mi ga predstavil v nadvse zabavni luči; hvala tudi za vse koristne metodološke in strokovne nasvete ter vedno dobro voljo. Anita, tudi tebi najlepša hvala za strokovno branje naloge in praktične splošne nasvete za vsakega (bodočega) znanstvenika. Tea, zelo sem hvaležna za vse strokovne, slovnične in oblikovne popravke in komentarje; res si ustrezno doprinesla k boljši preglednosti doktorske naloge. Veni, hvala za podporo in prijetno družbo v pisarni in vso pomoč, od gojenja celic do vsakdanjih nasvetov. Jernej, hvala za sodelovanje v svetu populacij veziklov že od vsega začetka in hvala za dodatna računalniška znanja, ki sem jih osvojila s tvojo pomočjo. Sabina, hvala za pomoč pri snemanju in obkroževanju dolgih mozaikov veziklov. Martin, zelo sem vesela, da smo se spoznali in skupaj preživljali čas v laboratoriju in hvala za pomoč in družbo pri poskusih na sinhrotronu. Tina in Maja, hvala za delitev izkušenj in dela z encimi. Hvala tudi ostalim: Moniki, Mihi, Tamari in še marsikomu, s katerimi smo si delili laboratorije in/ali pisarno.

Zahvaljujem se predstojnici Katedre za splošno zoologijo prof. dr. Jasni Štrus za možnost sodelovanja in dela v laboratoriju ter vsem ostalim sodelavcem s katedre za družbo na hodnikih, prijeten klepet in pomoč pri delu v laboratoriju.

Poleg neizmerne potrpežljivosti in podpore, ki mi jo vedno nudi, bi se rada zahvalila svojemu fantu Jerneju Čebeli za pomoč pri grafičnem oblikovanju konferenčnih prispevkov in raznovrstnih slikovnih predstavitev v času doktorskega študija ter pomoč pri izdelavi shem, vključenih v doktorsko disertacijo. Zahvaljujem se lektorici Vidi Ani Politakis za hiter in učinkovit pregled doktorske naloge. In nenazadnje, najlepša hvala za nesebično podporo družine in prijateljev tudi v času doktorskega študija.

Hvala vsem, ki ste prispevali k izdelavi doktorske disertacije.

PRILOGA A: MATERIALI IN METODE**KAZALO PRILOGE A**

1 NANOMATERIALI, UPORABLJENI V DOKTORSKEM DELU.....	A3
1.1 OGLJIKOVI NANOMATERIALI	A3
1.2 MAGNETNI NANODELCI.....	A3
1.3 POLISTIRENSKI NANODELCI	A3
2 KARAKTERIZACIJA SUSPENZIJ NANOMATERIALOV	A4
2.1 KARAKTERIZACIJA SUSPENZIJ POLISTIRENSKIH NANODELCEV.....	A4
3 METODE NA UMETNIH FOSFOLIPIDNIH MEMBRANAH	A5
3.1 KEMIČALJE	A5
3.2 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN: SVETLOBNA FAZNO-KONTRASTNA MIKROSKOPIJA.....	A5
3.3 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN: SAXS.....	A5
3.4 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN: FLUORESCENČNA POLARIZACIJA	A5
3.5 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN: DSC	A6
3.6 EKSPERIMENTALNI POTEK POSKUSOV NA ORJAŠKIH UNILAMELARNIH VEZIKLIH	A6
3.6.1 Zajem in analiza mikroskopskih videoposnetkov	A6
3.7 PREVERJANJE VARIABILNOSTI KONTROLNIH POPULACIJ ORJAŠKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV	A7
3.8 IZPOSTAVITEV ORJAŠKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV SUSPENZIJAM NANOMATERIALOV	A8
3.8.1 Eksperimentalni potek izpostavitve GUV suspenziji C₆₀.....	A8
3.9 SIPANJE X-ŽARKOV POD MAJHNIM KOTOM	A9
3.9.1 Podrobnosti izvedbe meritev na sinhrotronskem viru SAXS in analize rezultatov	A9
3.10 FLUORESCENČNA SPEKTROFLUORIMETRIJA.....	A10
3.10.1 Izvedba meritev polarizacije fluorescenčnih sond in analiza vrednosti.....	A10
3.10.2 Kemijska analiza učinkovitosti centrifugacije nanodelcev	A10
3.10.3 Preverjanje morebitno navzkrižnega delovanja nanodelcev s signalom, izmerjenim na fluorimetru	A11

3.11 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA	A11
3.11.1 Podrobnosti izvedbe meritev diferenčne dinamične kalorimetrije in analize	A11
4 METODE NA BIOLOŠKIH MEMBRANAH	A12
4.1 KEMIKALIJE	A12
4.2 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN	A12
5 ENCIMSKI TESTI: TESTIRANJE VPLIVA OGLJIKOVIH NANOMATERIALOV NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZ	A12
5.1 KEMIKALIJE	A12
5.2 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN	A12
5.3 ENCIMI	A13
5.4 PODROBNOSTI MERITEV INHIBITORNE AKTIVNOSTI NANOMATERIALOV IN ADSORPCIJE NA ENCIM	A13
6 CELIČNE METODE <i>IN VITRO</i>	A13
6.1 KEMIKALIJE	A13
6.2 CELIČNE LINIJE	A13
6.3 VEČPARAMETRSKO VREDNOTENJE KVARNIH UČINKOV PS-NH ₂ IN PS-N(CH ₃) ₃ Z METODO »HIGH CONTENT SCREENING ANALYSIS«	A14

1 NANOMATERIALI, UPORABLJENI V DOKTORSKEM DELU

1.1 OGLJIKOVI NANOMATERIALI

Fulerene C_{60} v obliki prahu z ocenjeno nominalno čistostjo $> 99,5\%$ smo kupili pri podjetju Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija), amorfni ogljik v obliki prahu (CB) s povprečno velikostjo primarnih delcev 13 nm in ocenjeno nominalno čistostjo $> 99\%$ smo kupili pri proizvajalcu Plasma Chem GmbH (Berlin, Nemčija), ploščice enoplastnega grafenovega oksida (GO) in komercialno dostopno založno suspenzijo GO (0,275 mg/mL v dH_2O) pri proizvajalcu Graphene Supermarket (Calverton, New York, ZDA), večplastne ogljikove nanocevke (MWCNT) smo prejeli v okviru FP7 EU projekta NanoValid (*Reference methods for managing the risk of engineered nanoparticles*; pogodba št.: 263147).

1.2 MAGNETNI NANODELCI

Nanodelce kobaltovega ferita, površinsko neobdelane ($CoFe_2O_4$) ali z adsorbirano citronsko kislino ($CoFe_2O_4$ -CA), ter superparamagnetne ND železovega oksida (maghemit, γ - Fe_2O_3) z različnimi površinskimi lastnostmi so pripravili na Odseku za sintezo materialov (K8) Inštituta Jožef Štefan v Ljubljani (prof. dr. Darko Makovec, dr. Slavko Kralj). Nanodelci $CoFe_2O_4$ so bili sintetizirani z metodo koprecipitacije vodnih raztopin Co(II) in Fe(III) ionov (Gyergyek in sod., 2012), $CoFe_2O_4$ -CA pa z adsorpcijo citronske kisline (CA) na sintetizirane $CoFe_2O_4$ delce (Čampelj in sod., 2008); CA vsebuje tri karboksilne skupine, ki ohranjajo katione na površini ND (Hidber in sod., 1996).

Izvorni γ - Fe_2O_3 so bili pripravljene s koprecipitacijo Fe^{2+} in Fe^{3+} iz vodnih raztopin (Čampelj in sod., 2007). Nanodelci γ - Fe_2O_3 v stabilni vodni suspenziji so bili prekriti s približno 2 do 5 nm-plastjo amorfnega silicijevega dioksida (Fe_2O_3 -Si) (Kralj in sod., 2010); slednji, prevlečeni z enotno plastjo silicijevega dioksida na površini, so bili funkcionalizirani z molekulami, ki imajo terminalno vezane aminoskupine (Fe_2O_3 -Si- NH_2) ali karboksilne skupine (Fe_2O_3 -Si-COOH) (opis postopka: Kralj in sod. 2011, 2012; Kralj in Makovec, 2014).

1.3 POLISTIRENSKI NANODELCI

Komercialne polistirenske ND (PS) z vezanimi molekulami s funkcionalnimi aminoskupinami (PS- NH_2 -Bang's, 50 nm) smo kupili pri podjetju Bangs Lab (Fishers, Indiana, ZDA). Nanodelci PS z različno primarno velikostjo in površinskim nabojem so bili sintetizirani z emulzijsko polimerizacijsko metodo (opis postopka: Wang in sod., 2013; Suppl. mat.). Nanodelci PS z vezanimi kationskimi trimetilamonijevimi skupinami (PS- $N(CH_3)_3$) so bili dodatno površinsko obdelani z vezavo (vinilbenzil) triamonijevega klorida (Wang in sod., 2013; Suppl. mat.). Površinsko neobdelane ND PS in ND PS z vezano karboksilno skupino (PS-COOH, 40 nm) smo kupili pri GIBCO (Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

2 KARAKTERIZACIJA SUSPENZIJ NANOMATERIALOV

Razen polistirenskih ND smo karakterizacijo NM izvedli v sodelovanju z Odsekom za sintezo materialov (IJS, prof. dr. Darko Makovec), in sicer s transmisijsko elektronsko mikroskopijo (TEM), z metodo dinamičnega sipanja svetlobe (DLS) ter z merjenjem zeta potenciala (ζ -potenciala). Suspenzije NM, ki smo jih uporabljali pri poskusih, smo posušili (25 °C) na prosojnih ogljikovih plasteh na bakrenih podpornih mrežicah in v vakuumu posneli vzorce (TEM, JEOL 2100, Tokyo, Japonska; pri 200 kV). Velikost NM smo izrazili kot premer, ocenjen iz vizualnega pregledovanja in merjenja posnetkov TEM za več kot 300 ND v posameznih vzorcih. Površino ND smo ocenili z uporabo programske opreme DigitalMicrograph (Gatan Inc. software, ZDA). Hidrodinamski premer večine uporabljenih ND smo ovrednotili z inštrumentom DLS Fritsch Analysette 12 DynaSizer (Idar-Oberstein, Nemčija); analizirali smo suspenzije ND z različnimi koncentracijami, pripravljeni v deionizirani vodi (dH₂O; MilliQ, Millipore, Billerica, Massachusetts, ZDA; pH 5,7; $\rho = 18,5 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) ali v medijih, uporabljenih v poskusih (0,3 M glukozna raztopina, PBS-citratni pufer, 10 mM pufer HEPES ali v reakcijski mešanici za encime, t.j. 0,5 mM Ellmanov reagent v 100 mM fosfatnem pufru, pH 8,0 in substrat acetiltioholin klorid s končno koncentracijo 0,5 mM). Razen suspenzij ND meritev NM drugih oblik (nanocerk, nanoploščice) nismo izvedli, saj je merjenje z uporabljenim inštrumentom DLS primerno in zanesljivo le za vrednotenje velikosti ND ali aglomeratov NM približno okrogle oblike. Meritve ζ -potenciala NM smo izvedli v vodni suspenziji v celotnem razponu pH vrednosti ter v medijih, pri vrednostih pH in koncentracijah, uporabljenih v poskusih, z inštrumentom ZetaPALS, Brookhaven Instruments Corp. (New York, ZDA). Hidrodinamski polmer suspenzije C₆₀ v dH₂O, ki smo jo uporabili pri poskusih na oraških unilamelarnih veziklih (GUV), smo določili s spektrometrom 3D DLS-SLS (LS Instruments, Fribourg, Švica) z uporabo laserja HeNe pri valovni dolžini 632,8 nm, sipanje pa smo merili pri kotu 90°. Iz izmerjene vrednosti časovno-odvisne funkcije intenzitete sipanja svetlobe $G_2(t)$ smo z analizo v programu CONTIN izrazili jakostno, masno in številsko porazdelitev hidrodinamskih polmerov (W_i) v suspenziji.

2.1 KARAKTERIZACIJA SUSPENZIJ POLISTIRENSKIH NANODELCEV

Disperzijske lastnosti suspenzij polistirenskih ND (hidrodinamski polmer in ζ -potencial) smo določili z inštrumentom Nano Series Malvern ZetaSizer-ZEN 3600 (Malvern, Worcestershire, Združeno kraljestvo) pri 25 °C, s koncentracijo ND 0,1 mg/mL v 1 mM NaCl in v pufru PBS (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija). Podatke smo prikazali kot povprečne vrednosti ($\pm$ SD) treh ponovitev v treh neodvisnih meritvah. Relativno količino aminoskupin ($-\text{NH}_2$) na površini PS-NH₂ smo povzeli iz rezultatov Wang in sod. (2013; določanje s kvantifikacijo fluorescamina, ki ob reakciji z aminoskupinami tvori fluorescenčni produkt. Rezultati so normalizirani na vrednost izmerjene fluorescence pri komercialnih ND PS-NH₂-Bang's). Z uporabo statističnega programa R (The R Foundation for Statistical Computing, Dunaj, Avstrija) smo ovrednotili povezavo med relativno količino aminoskupin na površini ND (izraženo na količino skupin $-\text{NH}_2$ na komercialno dostopnih suspenzijah, t.j. PS-NH₂-Bang's) in vrednostjo ζ -potenciala v 1 mM NaCl ali v pufru PBS (korelacija med neodvisno in odvisno spremenljivko z linearno regresijo).

3 METODE NA UMETNIH FOSFOLIPIDNIH MEMBRANAH

3.1 KEMIKALIJE

Sintetične lipide 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3 fosfatidilholin (POPC), 1, 2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilholin (DPPC), 1,2-dimiristoil-*sn*-glicero-3-fosfoholin (DMPC) in holesterol smo kupili pri Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL, ZDA). Fluorescenčni sonde 1,6-difenil-1,3,5-heksatrien (DPH) in trimetilamonij-6-fenil-1,3,5-heksatrien (TMA-DPH), glukozo in saharozo (v prahu) ter pufer HEPES (4-(2-hidroksietil-1-piperazinetansulfonična kislina) smo kupili pri podjetju Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija), kloroform (CHCl_3), metanol (CH_3OH) in dimetilsulfoksid (DMSO) pa pri podjetju Merck KGaA (Darmstadt, Nemčija).

3.2 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN: SVETLOBNA FAZNO-KONTRASTNA MIKROSKOPIJA

Založne suspenzije lipidov POPC in holesterola s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili z raztapljanjem lipidov v mešanici CHCl_3 in CH_3OH ($\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, 2:1; v/v). Pred vsakim poskusom smo pripravili sveži 0,3 M raztopini saharoze in glukoze v dH_2O . Založno suspenzijo C_{60} v dH_2O s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili s 3-dnevnim soniciranjem v ultrazvočni vodni kopeli (250 W, 50 Hz; Sonis 2GT, Iskra Pio d.o.o., Slovenija), do vzpostavitve suspenzije, ki se v času trajanja poskusov ni posedala (Dhawan in sod., 2006). Založne suspenzije CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ smo pripravili v 0,3 M raztopini glukoze, s koncentracijo 5 mg/mL, po postopku sušenja vodne suspenzije in ponovnega raztapljanja. Založne suspenzije Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$, C_{60} in CB pa v dH_2O z 10-krat višjo koncentracijo od končne v poskusu. Končna koncentracija lipidov POPC, izpostavljenim ND, je bila 0,007 mg/mL. Za preverjanje vpliva morebitno odtopljenih ionov (Co ali Fe) ali CA, prisotnih v eksperimentalnem mediju, smo pripravili supernatant suspenzije $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ s separacijo ND z uporabo centrifugiranja in magnetnega polja.

3.3 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN: SAXS

Založne suspenzije CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ s koncentracijo 5 mg/mL smo pripravili po postopku sušenja vodne suspenzije ND in ponovnega raztapljanja v 0,3 M raztopini glukoze. Uporabili smo enako založno suspenzijo C_{60} v dH_2O kot pri poskusu z GUV. Založne suspenzije C_{60} , CB in GO v CHCl_3 smo pripravili s suspendiranjem NM (4 mg suhih NM) v CHCl_3 (25 mL) (končna koncentracija NM: 0,16 mg/mL; izbrana na osnovi topnosti C_{60} v CHCl_3 pri sobni temperaturi (Ruoff in sod., 1993)) in sonikacijo v ultrazvočni vodni kopeli (3 h). Ploščice GO smo pred raztapljanjem v terilnici razdrobili na manjše koščke.

3.4 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN: FLUORESCENČNA SPEKTROFOTOMETRIJA

Uporabili smo založne suspenzije CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ ter Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$, suspendirane v pufru HEPES (10 mM; pH 7,0) po postopku sušenja vodne raztopine in ponovnega raztapljanja v predhodno pripravljenem pufru.

3.5 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN: DSC

Uporabili smo založne suspenzije CB, CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ ter Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ v pufru HEPES (10 mM, pH 7,0) po postopku sušenja vodne raztopine in ponovnega raztapljanja v pufru. Uporabili smo enako založno suspenzijo C_{60} v dH_2O kot pri poskusih s fazno-kontrastno mikroskopijo in C_{60} v CHCl_3 , pripravljen na enak način kot pri metodi SAXS.

3.6 EKSPERIMENTALNI POTEK POSKUSOV NA ORJAŠKIH UNILAMELARNIH VEZIKLIH

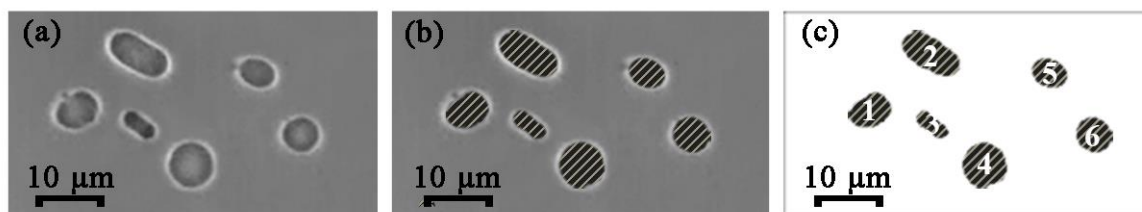
3.6.1 Zajem in analiza mikroskopskih videoposnetkov

Dolžina posameznega videoposnetka je bila približno 2 min (~3000 slik) z ločljivostjo 570×762 pikselov. Izračunali smo, da posamezen videoposnetek ustreza površini $1,15 \pm 0,05 \mu\text{m}^2$; torej smo z dvema videoposnetkoma zajeli približno 3% celotne površine posamezne kamrice (sl. 1).

Z uporabo algoritmov za procesiranje slik smo vsak posamezni videoposnetek najprej pretvorili v mozaik slik, nato pa iz posameznih mozaikov avtomatsko segmentirali GUV (Zupanc in sod. 2009, 2010b, 2011, 2014 v *tisku*). Rezultat avtomatske segmentacije posnetkov (Matlab R2011a, MathWorks, Massachusetts, ZDA) je predstavljala dvoplastna slika, na kateri so bili GUV označeni z drugo barvo in tako ločeni od ozadja. Zaradi morebitne prisotnosti skupkov kristaliziranih lipidov, agregatov ND v mediju ali drugih artefaktov smo po avtomatskem označevanju vsak mozaik posebej pregledali in ročno popravili morebitna odstopanja avtomatsko segmentiranih GUV od dejanske slike. Kvantitativne podatke o GUV smo pridobili z avtomatskim merjenjem označenih (obarvanih) GUV v mozaiku (Matlab R2011a). Vezikle smo prešteli in izračunali njihovo (izražen v μm), in stopnja ekscentričnosti GUV po inkubaciji v testnem mediju, slednje smo izračunali po enačbi:

$$E = \sqrt{\frac{1-b^2}{a^2}} \quad \dots(1);$$

a in b predstavljata dve osi GUV, pri čemer je dolžina osi a večja od dolžine osi b pri GUV eliptične oblike. Stopnja ekscentričnosti je mera sferičnosti GUV, izražena na linearnem intervalu od 0 do 1, kjer popolna sfera ustreza stopnji ekscentričnosti 0, stopnja ekscentričnosti ovalnega GUV pa se približa vrednosti 1. Vrednotenje stopnje ekscentričnosti je zelo občutljivo, saj se že zelo majhni odkloni od oblike popolnega kroga odražajo v velikih spremembah ekscentričnosti (sl. A1, pregl. A1). Stopnja ekscentričnosti GUV (pregl. B1) je dokaz morfološke značilnosti posameznih GUV, preračunane iz segmentacijske maske; vezikel z oznako 4 (stopnja ekscentričnosti 0,08) je bolj sferične oblike od GUV z oznako 5 (stopnja ekscentričnosti 0,64), ki ima obliko blage elipse, vendar se njuni stopnji ekscentričnosti močno razlikujeta (pregl. A1).



Slika A1: Primer vzorca GUV, vključenega v avtomatsko segmentacijo.

(a) Primer vzorca GUV, posnetih pod fazno-contrastnim mikroskopom, (b) GUV s prekrivajočo segmentacijsko masko (rdeče) in (c) segmentacijska maska GUV, ločena od ozadja. Posamezni GUV so označeni s številkami.

Preglednica A1: Podatki o morfoloških značilnostih GUV, izračunani s segmentacijske maske na sliki P1

	Površina vezikla v piksljih	Premjer sferičnega GUV (µm)	Ekscentričnost (0,1)
GUV 1	416	5,75	0,68
GUV 2	639	7,13	0,87
GUV 3	187	3,86	0,90
GUV 4	604	6,93	0,08
GUV 5	311	4,97	0,64
GUV 6	378	5,75	0,41

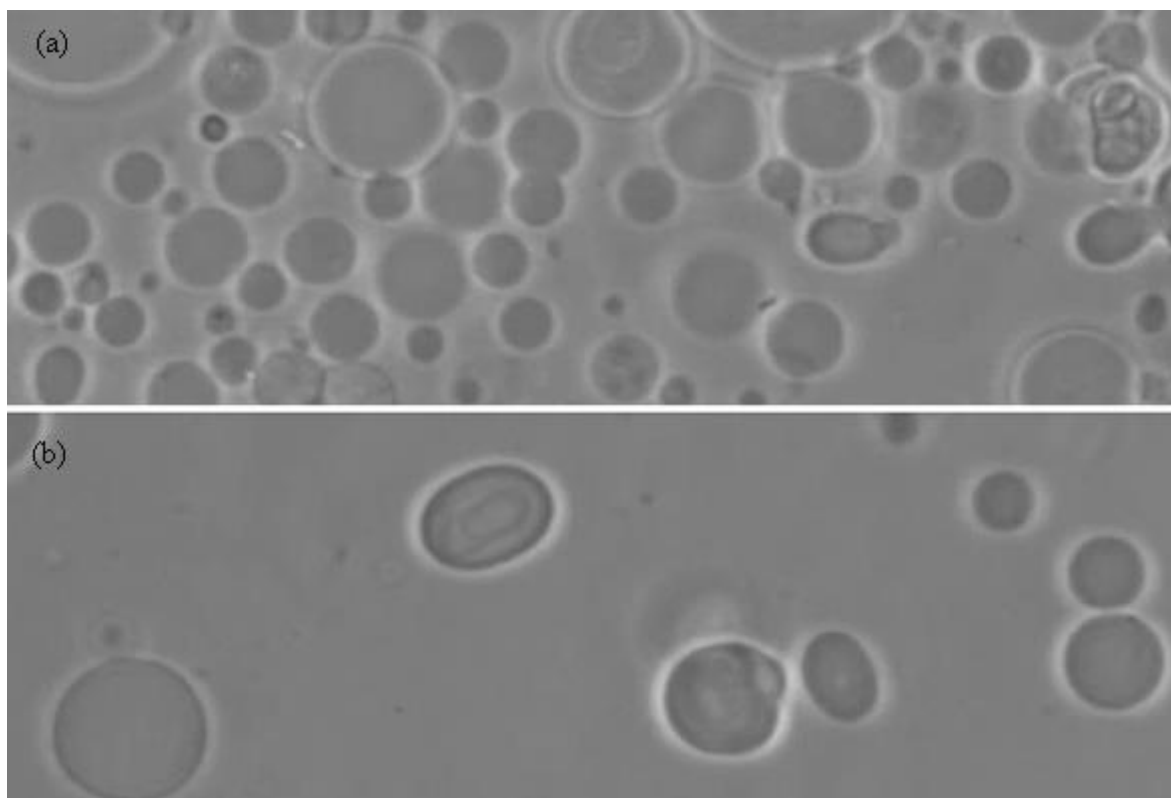
Opombe: Iz segmentacijske maske smo za vsak GUV izračunali njegovo površino (izražena v piksljih); premer enega piksla ustreza 0,25 µm na posnetku.

3.7 PREVERJANJE VARIABILNOSTI KONTROLNIH POPULACIJ ORJAŠKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV

Z namenom testiranja variabilnosti vzorcev med kontrolami znotraj istega eksperimenta (ista populacija GUV) in preverjanja primerljivosti med poskusi smo izvedli kontrolne poskuse (K1, K2, K3). Za preverjanje variabilnosti med kontrolnimi skupinami GUV znotraj istega poskusa smo izračunali relativni standardni odklon (ang. *relative standard deviation*, RSD; razmerje med standardnim odklonom in srednjo vrednostjo) v številčnosti GUV, povprečja premera GUV in stopnje ekscentričnosti v vsaki kamrici in vrednost RSD uporabili kot informativno mero variabilnosti med kamricami v posameznih poskusih.

Predpogoj za izvedbo primerljivih kontrol znotraj in med poskusi je primerna, ne previsoka gostota GUV na objektnem stekelcu (sl. A2a). V K1 smo posneli suspenzijo GUV v 0,3 M raztopini glukoze (0,07 mL) brez dodatnih razredčitev, po 3 in 30 min. Za primerjavo števila, premera in stopnje ekscentričnosti GUV znotraj enega poskusa smo uporabili vrednosti parametrov po 30-min izpostavitvi. V K2 smo GUV redčili z 0,3 M raztopino glukoze v volumskih razmerjih 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7 in 1:8 (z naraščajočim volumskim deležem 0,3 M raztopine glukoze) in posneli populacije GUV po 3, 30 in 60 min. V vsaki kamrici smo zajeli dva videoposnetka (P1 in P2) in primerjali število, premer sferičnih veziklov in stopnjo ekscentričnosti. Ovrednotene parametre smo podali kot povprečne vrednosti, zajete na dveh izbranih pasovih (P1 in P2), v dveh eksperimentalnih kamricah. Izbrali smo najprimernejšo

razredčitev (1:4, v/v; sl. A2b), ki smo jo uporabljali pri poskusih izpostavitve ND (ustreznost gostote GUV smo pred vsakim eksperimentom preverili pod fazno-kontrastnim mikroskopom (sl.A2b). Zaradi različnih medijev, v katerih so pripravljene suspenzije ND, smo v K3 primerjali dodatek dveh medijev, v dH₂O in 0,3 M raztopine glukoze, po 20- in 50-min izpostavitvi (Zupanc in sod., 2014 v *tisku*).



Slika A2: Vzorca dveh populacij GUV z različno gostoto veziklov v suspenziji, posneta pod fazno-kontrastnim mikroskopom.

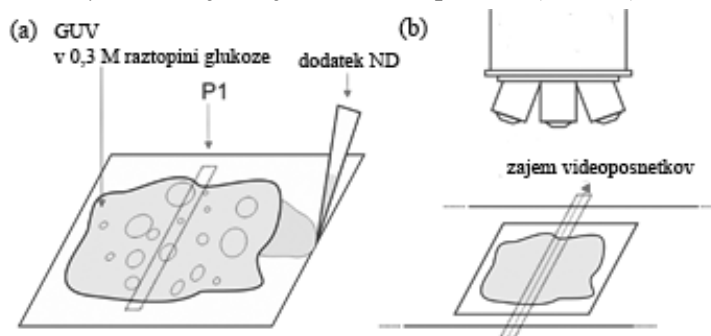
(a) Gostota veziklov je višja (nerazredčeni) kot (b) pri razredčitvi 1:4 (v/v); slednja razredčitev je primerna za avtomatsko segmentacijo veziklov.

3.8 IZPOSTAVITEV ORJAŠKIH UNILAMELARNIH VEZIKLOV SUSPENZIJAM NANOMATERIALOV

3.8.1 Eksperimentalni potek izpostavitve GUV suspenziji C₆₀

Izvedba poskusa vpliva C₆₀ se razlikuje od poskusov z ostalimi NM in poskusov K1-K3. Pripravljeno suspenzijo GUV v raztopini 0,3 M glukoze smo izpostavili vakuumu pri sobni temperaturi in pustili, da so se GUV posedli na dno mikrocentrifugirke. Po 24 h smo suspenzijo GUV v mikrocentrifugirki premešali z obračanjem (3x), odpipetirali (0,045 mL) na objektno stekelce (sl. A3), posneli vzorce (15 vzorcev na P1) in nato dodali (0,005 mL) suspenzije C₆₀ (v dH₂O, 1 mg/mL), referenčne kemikalije 50 mM ZnCl₂ ali dH₂O (kontrolna skupina), pokrili

s krovnim stekelcem in preprečili evaporacijo z nanosom silikonske plasti ob rob stekelc. Vzorce smo (poleg začetnih posnetkov pred dodatkom testnih snovi) posneli pri 400-kratni povečavi še po 10, 100 in 120 min od priprave preparata; vsak posnetek je ustrezal območju na preparatu $200 \times 150 \mu\text{m}$, z ločljivostjo 768×576 pikslov (sl. A3b).



Slika A3: (a) Shema izvedbe poskusa na objektnem stekelcu in (b) zajem videoposnetkov GUV na izbranem mestu P1. Op.: shemi nista predstavljeni v realni skali.

Spremembo oblike veziklov (sferične in hruškaste oblike GUV, GUV v obliki verižic in cevasto oblikovani GUV) smo ovrednotili z modificiranim vtičnikom Shape segmenter v programski opremi ImageJ. Vsakemu tipu smo pripisali posamezno barvo in podatke na osnovi različnih barv obdelali v programu Matlab (Zupanc in sod., 2011).

3.9 SIPANJE X-ŽARKOV POD MAJHNIM KOTOM

3.9.1 Podrobnosti izvedbe meritev na sinhrotronskem viru SAXS in analize rezultatov

Za detekcijo difrakcijskega profila vzorcev smo uporabili detektor slikovnih plošč Mar300 (Marresearch GmbH, Norderstedt, Nemčija). Kalibracijo smo izvedli z vzorcem prahu srebrovega behenata ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{O-COOAg}$, z razdaljo $d = 58,38 \text{ \AA}$ (Huang in sod., 1993). Nosilna kocka je bila v termičnem stiku z vodnim krogom, torej v povezavi z vodno kopeljo s kontrolno enoto (Unistat CC, Huber, Offenburg, Nemčija). Da bi preprečili izgubo toplote preko zraka, smo vhodno in izhodno okno nosilne kocke prekrili s tankim polimernim filmom. Element Pt (100Ω) smo uporabili za merjenje temperature v bližini kapilare, vstavljene v nosilno kocko. Vzorce sipanja svetlobe smo integrirali z uporabo programa *FIT2D* (Hammersley, 1997). Nize podatkov smo normalizirali z intenziteto presevane svetlobe, izmerjene s fotodiodo na koncu žarkovne poti.

Vzorce sipanja svetlobe SAXS z odštetimi vrednostmi ozadja smo analizirali v celotnem območju q , z uporabo modificirane teorije po Caillé (opisano v Pabst in sod., 2000, 2003; Rappolt in sod., 2008; uporabljen model lipidnega dvosloja in njegova aplikacija sta opisana v delu Rappolt in sod., 2010). Razdaljo d , ki ustreza ponavljajoči se razdalji med lipidnimi dvosloji in debelini med dvema regijama lipidnih glav (d_{HH}), smo izrazili iz prilagojenih krivulj intenzitet sipanja svetlobe, po enačbi:

$$I = \frac{S(q)(F(q))^2}{q^2} \quad \dots(2),$$

kjer je $S(q)$ strukturni faktor in $F(q)$ faktor oblike. Kot model profila elektronske gostote regij lipidnih glav smo določili širino Gaussovega vrha $\sigma_H = 3 \text{ \AA}$.

Ukrivljanje membrane (fluktuacijsko) ali Cailléjev parameter (η) (Caillé, 1972; Zhang in sod., 1994) smo izrazili direktno iz prilagojenih krivulj intenzitet sipanja svetlobe, po enačbi:

$$\eta = \frac{\pi k_B T}{2d^2 \sqrt{K C B}} \quad \dots(3),$$

in je odvisen od togosti membranske ukrivljenosti – K_C (ang. *membrane bending rigidity*) in od kompresijskega modula – B (ang. *compression bulk modulus*) (De Gennes in Prost, 1993). Povprečno vrednost fluktuacije razdalj med membranami (σ) smo izrazili iz Cailléjevega parametra, po enačbi (Petrache in sod., 1998), po enačbi:

$$\sigma = \sqrt{\eta} \cdot \frac{d}{\pi} \quad \dots(4).$$

3.10 FLUORESCENČNA SPEKTROFOTOMETRIJA

3.10.1 Izvedba meritev polarizacije svetlobe s fluorescenčnih sond in analiza vrednosti

Meritve polarizacije svetlobe s fluorescenčnih sond DPH in TMA-DPH, vgrajenih med oz. ob lipide POPC, smo izmerili z navpično orientiranim vzbujevalnim polarizatorjem, medtem ko sta bili navpična in vodoravna komponenta emitirane polarizirane svetlobe obeh sond posneti z monokromatskim detektorjem za valovno dolžino 410 nm. Predpostavili smo, da je fluorescenčna emisija svetlobe s sond DPH in TMA-DPH v vodni raztopini zanemarljiva. Vrednosti in polarizacije (P) smo izrazili z uporabo programske opreme Cary Varian (Varian Inc, Mulgrave, Avstralija).

Polarizacija (P) je definirana kot:

$$P = \frac{(I_v - I_p)}{(I_v + I_p)} \quad \dots(5),$$

kjer sta simbola I_v in I_p vzporedna (I_v) in pravokotna (I_p) intenziteta emisije, ko vzorec vzbujamo z vertikalno polarizirano svetlobo. Vrednost faktorja G , ki je definiran kot razmerje med občutljivostjo detektorskega sistema navpično in vodoravno polarizirane svetlobe, smo odčitali za vsako meritev posebej (Lakowicz, 2006).

3.10.2 Kemijska analiza učinkovitosti centrifugacije nanodelcev

Primerjali smo učinkovitost odstranjevanja večjih skupkov ND s konvencionalnim centrifugiranjem (14,000 g, 10 min) ali z gelskim ločevanjem. Vzorec POPC SUV, izpostavljen suspenziji $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$, smo pripravili in centrifugirali po enakem postopku kot pri izvedbi meritev na fluorimetru. Matriks Sephadex G 50 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija), ki omogoča gelsko ločevanje vzorca v območju 1500–30.000 Da, smo pripravili v pufru HEPES (10 mM; pH 7,0) s koncentracijo 0,1 g Sephadex G 50/L. Po inkubaciji (3 h, 25 °C) smo gel pripravili

z zaporednim centrifugiranjem pri 500 g (Centric R322B, Tehnica Železniki, Slovenija): 2-krat 5 min in 2-krat 10 min. Količino nesedimentiranega Fe v vzorcih smo izmerili z metodo plamenske atomske absorpcijske spektrometrije (AAS; Perkin-Elmer AAnalyst 100, Waltham, Massachusetts, ZDA). Sočasno smo po istem postopku pripravili supernatant POPC SUV in supernatant suspenzije $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$, ju redčili v pufru HEPES (10mM; pH 7,0) ali pufru HEPES z dodano HCl (končna koncentracija 0,75 M). Prisotnost HCl v vzorcih povzroči raztapljanje Fe ionov z ND; razlika v količini Fe med nakisanimi in nenakisanimi vzorci supernatantov nakazuje na prisotnost ND (in ne le Fe ionov) po centrifugiranju. Izmerjene vrednosti Fe v vzorcih smo delili z izmerjenimi vrednostmi Fe v izvornih suspenzijah ND z enakimi razredčitvami v dH_2O , pufru HEPES ali pufru HEPES z dodano HCl (pH nismo izmerili) in rezultate izrazili kot % nesedimentiranega Fe v vzorcih.

3.10.3 Preverjanje morebitno navzkrižnega delovanja nanodelcev s signalom, izmerjenim na fluorimetru

Preverili smo morebitno vezavo testiranih ND na fluorescenčni sonde DPH ali TMA-DPH, ki bi lahko bodisi ojačilo, bodisi zadušilo izmerjeni signal s sond. Vzorce POPC SUV v prisotnosti Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ smo pripravili na enak način kot za izvedbo na fluorimetru, le da smo količino SUV zamenjali z enakim volumnom 10 mM pufru HEPES (pH 7,0) in eno serijo vzorcev smo centrifugirali (14.000 g, 10 min), ene pa izmerili brez predhodnega centrifugiranja. Kot dodatno kontrolo morebitne interference ND s svetlobo valovnih dolžin, uporabljenih pri izvedbi meritev na fluorimetru, smo primerjali z izmerjeno intenziteto fluorescence suspenzij Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ pri valovnih dolžinah 358 nm in 410 nm.

3.11 DIFERENČNA DINAMIČNA KALORIMETRIJA

3.11.1 Podrobnosti izvedbe meritev diferenčne dinamične kalorimetrije in analize

Pred vsakim eksperimentom smo posneli signal iz pufru HEPES (10 mM, pH 7,0) z enakimi nastavitvami inštrumenta kot pri merjenju lipidov in vrednosti uporabili pri obdelavi rezultatov kot t. i. signal iz ozadja ter signal lipidov samih (negativna kontrola). Za vsak vzorec smo izvedli 3 ponovitve meritev. Prvi zajem DSC smo uporabili za določitev temperature glavnega faznega prehoda (T_m), faznega predprehoda (T_p), naslednje pa za preverjanje ponovljivosti faznih prehodov lipidov. Dobljene signale smo obdelali v statističnem programu Origin Pro8 (OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, ZDA). Termogrami so prikazani kot presežna toplotna kapaciteta $\langle C_p \rangle$ [kJ/molK] v odvisnosti od temperature [°C], po enačbi:

$$C_p = \frac{q_p}{\Delta T} \quad \dots(6)$$

kjer je presežna toplotna kapaciteta definirana kot razmerje med presežnim prenosom toplote (q_p) in razliko v temperaturi (ΔT) (Cokan, 2006).

4 METODE NA BIOLOŠKIH MEMBRANAH

4.1 KEMIKALIJE

Fosfatno-citratni pufer z NaCl (PBS-citratni pufer; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7,8 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,5 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) je bil pripravljen dH₂O in filtriran pred uporabo (filtri z 0,22 μm porami). Kemikalije NaCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in etanol (EtOH) smo kupili pri Merck KGaA (Darmstadt, Nemčija), KCl in KH_2PO_4 pri Kemiki (Zagreb, Hrvaška), paraformaldehid pri podjetju Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija) ter glutaraldehid, osmijev tetroksid (OsO_4), 2,3,5-trifeniltetrazolijev klorid (THC) in heksametilidisilazan (HMDS) pri S.P.I. Supplies (West Chester, PA, ZDA). Modificiran fiksativ Karnovski smo pripravili z raztapljanjem 2,5 % glutaraldehida in 0,4 % paraformaldehida v 1 M natrijevo-fosfatnem pufru ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

4.2 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN

Založne suspenzije ND CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ smo pripravili v PBS-citratnem pufru (pH 7,4), s koncentracijo ND 4 mg/mL, po postopku sušenja vodne suspenzije in ponovnega raztapljanja. Založne suspenzije C₆₀, CB, GO in MWCNT smo pripravili v PBS-citratnem pufru (pH = 7,4), iz NM v prahu, s končno koncentracijo 2 mg/mL.

5 ENCIMSKI TESTI: TESTIRANJE VPLIVA OGLJIKOVIH NANOMATERIALOV NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZ

5.1 KEMIKALIJE

Reagente 5,5' ditiobis-2-nitrobenzojsko kislino (DTNB), acetiltioholinklorid (AChCl) in 2-merkaptotanol smo kupili pri podjetju Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija). Reagent Pierce™ BCA Protein Assay Kit za določanje količine proteinov v vzorcu smo kupili pri podjetju Thermo Scientific (Illinois, ZDA). 100 mM kalijevo-fosfatni pufer smo pripravili iz K_2HPO_4 in KH_2PO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija) pri pH 8,0. Raztopino DTNB smo pripravili v 250 mM kalijevo-fosfatnem pufru (pH 7,4), založno raztopino AChCl pa v dH₂O (1 M) in pred poskusi redčili s 100 mM kalijevo-fosfatnim pufrom (2 mM AChCl, pH 8,0).

5.2 PRIPRAVA ZALOŽNIH SUSPENZIJ IN RAZTOPIN

Uporabili smo suspenzijo C₆₀ v dH₂O (1mg/mL; enaka založna suspenzija kot pri poskusih z GUV). Založne suspenzije CB in MWCNT smo pripravili sveže pred izvedbo vsakega poskusa (0,5 mg/mL, dH₂O) s palično sonikacijo (Sonics VibraCell, Newtown, ZDA), 1 h pri amplitudi 40%, s ciklom 15 s vklop/15 s izklop, hlajeno na ledu. Uporabili smo komercialno dostopno založno suspenzijo GO (0,275 mg/mL v dH₂O).

5.3 ENCIMI

Ribjo AChE (*E. electricus*) in AChE iz membrane človeških eritrocitov smo kupili pri podjetju Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemčija). Žuželčja AChE (*D. melanogaster*) je rekombinantni encim in smo prejeli kot darilo profesorja Jean-Louisa Martyja (Perpignan, Francija). Založne raztopine encimov smo pripravili v 100 mM kalijevo-fosfatnem pufru (pH 8,0) s končnimi koncentracijami encimov 0,06 encimskih enot/mL (ribja AChE), 2,15 encimskih enot/mL (AChE iz človeških eritrocitov) in 0,1 encimskih enot/mL (žuželčja AChE).

5.4 PODROBNOSTI MERITEV INHIBITORNE AKTIVNOSTI NANOMATERIALOV IN ADSORPCIJE NA ENCIM

Morebitni vpliv NM na produkt encimske reakcije (5-tio-2-nitrobenzojsko kislino) smo preverili z redukcijo Ellmanovega reagenta z minimalnim volumnom 2-merkaptetanola (končna vrednost absorbance pri 405 nm je ustrezala tisti, izmerjeni v encimski reakciji brez dodatka NM). Tako pripravljeni raztopini (0,1 mL) smo dodali substrat AChCl (2 mM v 100 mM K-fosfatnem pufru; 0,05 mL), kalijevo-fosfatni pufer (100 mM, pH 8,0; 0,05 mL) in suspenzijo NM (0,01 mL). Vpliv nanomaterialov na ribjo AChE smo vrednotili v koncentracijskem območju CB, C₆₀ in MWCNT od 0,000048 do 0,0476 mg/mL, in GO do 0,0952 mg/mL, vendar rezultati inkubacije v koncentracijah GO, od 0,0572 do 0,0952 mg/mL nismo vključili v prikaz. Pri AChE iz človeških eritrocitov so bile izpostavitvene koncentracije GO, CB in MWCNT od 0,0009 do 0,119 mg/mL, C₆₀ pa od 0,0476 do 0,04762 mg/mL. Zaradi različnih uporabljenih koncentracij NM in bolj preglednega prikaza podatkov so na vodoravni osi koncentracije prikazane v linearni skali (ribja AChE; sl. 23) ali logaritemski skali (AChE iz človeških eritrocitov; sl. 24). Žuželčjo AChE smo vključili le kot primerjalni encim pri vrednotenju CB in GO na vretenčarski (ribja AChE) ali nevretenčarski (žuželčja AChE) encim, pri izbranih koncentracijah NM 0,0001; 0,001 in 0,01 mg/mL (sl. 25).

6 CELIČNE METODE IN VITRO

6.1 KEMIČNE METODE

Kemikalije, uporabljene pri delu s celičnimi kulturami: gojišče za celične kulture 'Dulbecco's Modified Eagle's Medium-GlutaMAX (DMEM) (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornija, ZDA), fetalni goveji serum (ang. *fetal bovine serum*, FBS), mešanica antibiotikov penicilina in streptomocina, mešanica tripsina in EDTA (0,25%), celični pufer PBS ter fluorescenčna barvila Hoechst 33342, tetrametilrodamin metilester (TMRM), Fluo-4, Lysotracker Green, TOPRO-3 jodid in propidijev jodid (PI) smo kupili pri podjetju Gibco (Invitrogen Corp., Carlsbad, Kalifornija, ZDA).

6.2 CELIČNE LINIJE

Trajno celično linijo človeških astrocit 1321n1 (astrocitom, ECACC-86030402) smo pridobili od Health Protection Agency Culture Collections (Salisbury, Združeno kraljestvo). Trajni celični liniji človeškega pljučnega epitelija alveolov A549 (adenokarcinom, ATCC® CCL-185) in

človeške jetrne celice HepG2 (hepatocelularni karcinom, ATCC® HB-8065) smo kupili pri banki celic ATCC (Manassas, Virginia, ZDA).

6.3 VEČPARAMETRSKO VREDNOTENJE KVARNIH UČINKOV PS-NH₂ IN PS-N(CH₃)₃ Z METODO »HIGH CONTENT SCREENING ANALYSIS«

Vzorci smo posneli z 20-kratnim objektivom z uporabo kombinacije filtrov: fluorescenco barvila Hoechst 33342 smo vzbudili pri 365 ± 50 nm in zbrali emisijo s filtrom 515 ± 20 nm; TMRM pri 549 ± 8 nm in 730 ± 50 nm, Fluo-4 ali LysoTracker green pa z uporabo ekscitacijskega filtra 475 ± 40 nm in emisijskega filtra 515 ± 20 nm. Uspešnost delovanja mešanice fluorescenčnih barvil smo preverili z vsaj dvema paralelkama pozitivnih kontrol, in sicer: dodatek detergenta Triton X 100 za delovanje barvil Hoechst 33342 in TOPRO-3 jodid (povečanje propustnosti membran), trifluorokarbonilcianid fenilhidrazona (FCCP) za propustnost mitohondrijske membrane (razklopljen transport elektronov dihalne verige) ter inionofora Ionomycin (spodbujevalec dviga znotrajcelične koncentracije Ca²⁺) za barvilo Fluo-4. Analizo slike smo izvedli z uporabo aplikacije v programski opremi Cellomics (Cellomics, Portland, ZDA). V vsakem vzorcu celic smo zajeli 10 posnetkov, tako da je eno vidno polje vključevalo 300 do 500 celic. Analizo podatkov smo izvedli po navodilih proizvajalca. Za ločitev signala od signala iz ozadja smo za vsak parameter nastavili fiksni prag.

Izvedli smo dodatne analize kvarnih učinkov izbranih ND (PS-N(CH₃)₃-2) na celično linijo A549; kvarni učinek smo primerjali z vplivom PS-NH₂-Bang's (pozitivni referenčni material) ali PS-COOH (negativni referenčni material) po izpostavitvi (72h, 37 °C) koncentracijam ND: 0,0078; 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125 in 0,250 mg/ml, brez vrednotenja vpliva ND na znotrajcelično koncentracijo Ca²⁺.

PRILOGA B: REZULTATI IN RAZLAGA

KAZALO: PRILOGE B

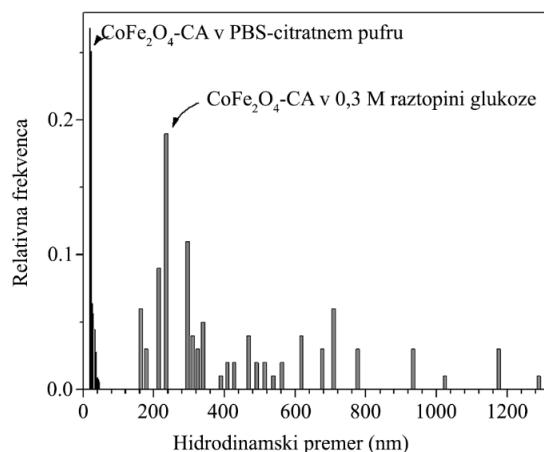
1 LASTNOSTI IZBRANIH NANOMATERIALOV	B3
1.1 HIDRODINAMSKA VELIKOST NANOMATERIALOV	B3
1.1.1 Hidrodinamska velikost CoFe ₂ O ₄ -CA	B3
1.1.2 Hidrodinamska velikost C ₆₀ v vodni suspenziji, uporabljena pri poskusih z GUV	B3
1.1.3 Hidrodinamska velikost C ₆₀ v vodni suspenziji in reakcijski mešanici, uporabljenih pri encimskih testih	B4
1.1.4 Hidrodinamska velikost amorfnega ogljika v vodni suspenziji in reakcijski mešanici, uporabljenih pri encimskih testih	B4
1.2 VPLIV NANOMATERIALOV NA SPREMEMBE UMETNIH FOSFOLIPIDNIH MEMBRAN	B5
1.2.1 Vpliv nanomaterialov na orjaške unilamelarne vezikle.....	B5
1.2.1.1 Primerljivost kontrolnih izpostavitvev	B5
1.2.2 Dodatna razlaga vpliva CoFe ₂ O ₄ in CoFe ₂ O ₄ -CA na orjaške unilamelarne vezikle	B9
1.2.3 Vpliv supernatanta suspenzije CoFe ₂ O ₄ CA na orjaške unilamelarne vezikle	B9
1.2.4 Vpliv Fe ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃ -Si, Fe ₂ O ₃ -Si-COOH in Fe ₂ O ₃ -Si-NH ₂ na orjaške unilamelarne vezikle.....	B10
1.2.5 Vpliv nanodelcev C ₆₀ na multilamelarne vezikle, izmerjeno na konvencionalnem viru SAXS.....	B11
1.2.6 Vpliv nanodelcev C ₆₀ na multilamelarne vezikle, izmerjeno na sinhrotronskem viru SAXS.....	B11
1.2.7 Vpliv nanodelcev CoFe ₂ O ₄ , CoFe ₂ O ₄ -CA na multilamelarne vezikle, izmerjeno na konvencionalnem viru SAXS.....	B12
1.2.8 Fluorescenčna polarizacija - komentar: morebitno navzkrižno delovanje Fe ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃ -Si, Fe ₂ O ₃ -Si-COOH in Fe ₂ O ₃ -Si-NH ₂ s signalom, merjenim na fluorimetru	B12
1.2.9 Vpliv nanomaterialov CoFe ₂ O ₄ , CoFe ₂ O ₄ -CA, Fe ₂ O ₃ , Fe ₂ O ₃ -Si, Fe ₂ O ₃ -Si- COOH, Fe ₂ O ₃ -Si-NH ₂ , CB ali C ₆₀ na multilamelarne vezikle, izmerjeno z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije.....	B13
2 VPLIV NANOMATERIALOV NA BIOLOŠKE MEMBRANE	B13

2.1.1 Analiza EDS površine eritrocitov, izpostavljenih CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$	B13
2.1.2 Mikrovezikulacija eritrocitov v prisotnosti nanomaterialov	B15
2.2 ENCIMSKI TESTI: VPLIV OGLJIKOVIH NANOMATERIALOV NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZE	B16
2.2.1 Vpliv ogljikovih nanomaterialov na inhibicijo in adsorbcijo ribje acetilholinesteraze	B16
2.2.2 Vpliv ogljikovih nanomaterialov na inhibicijo in adsorbcijo acetilholinesteraze iz človeških eritrocitov	B16
2.2.3 Primerjava vpliva ogljikovih nanomaterialov GO in CB na vretenčarsko in nevretenčarsko acetilholinesterazo	B16
2.2.4 KVARNI UČINKI POLISTIRENSKIH NANODELCEV	B17
2.2.5 Kvarni učinki polistirenskih nanodelcev z različno količino aminoskupin na površini	B17
2.2.6 Klastrska analiza povezave vrednotenih parametrov	B18
2.2.7 Kvarni učinki nanodelcev $\text{PS-N}(\text{CH}_3)_3$ s stalnim pozitivnim nabojem na površini	B19
2.2.8 Podrobnejša analiza kvarnih učinkov nanodelcev $\text{PS-N}(\text{CH}_3)_3\text{-2}$ na celice pljučnega epitelijskega tkiva	B24

1 LASTNOSTI IZBRANIH NANOMATERIALOV

1.1 HIDRODINAMSKA VELIKOST NANOMATERIALOV

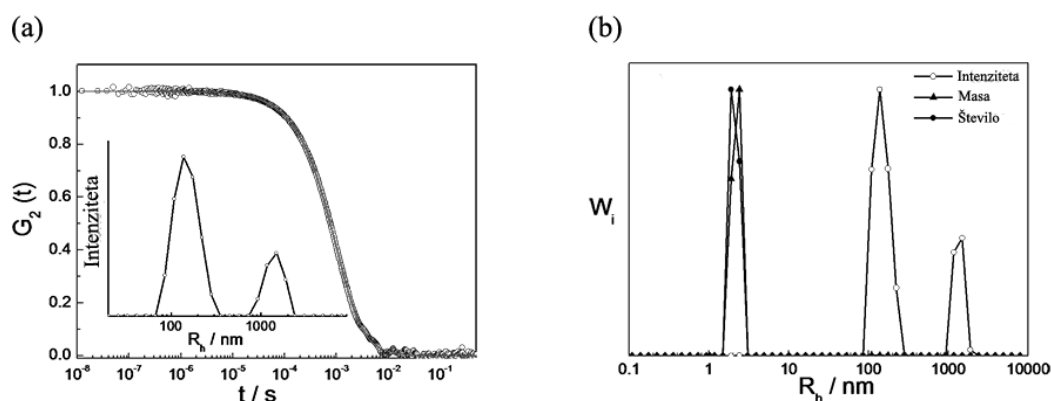
1.1.1 Hidrodinamska velikost CoFe_2O_4 -CA



Slika B1: Hidrodinamski premer CoFe_2O_4 -CA v PBS-citratnem pufru ali v 0,3 M raztopini glukoze (številski porazdelitev).

Številski porazdelitev hidrodinamskih premerov CoFe_2O_4 -CA v PBS-citratnem pufru (5 mg/mL; pH 7,4; levo) ali 0,3 M raztopini glukoze (desno), izmerjeno z metodo DLS. Na vodoravni osi so podani hidrodinamski premeri (v nm), na navpični pa relativna frekvenca pojavljanja ND ali skupkov ND z določeno velikostjo. Analiza in prikaz: prof. dr. Darko Makovec, IJS, Ljubljana. Povzeto po: Drašler in sod., 2014.

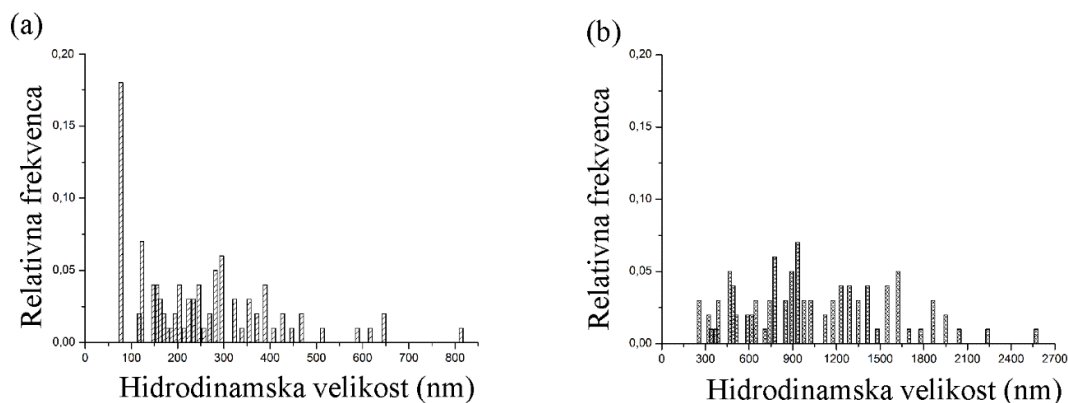
1.1.2 Hidrodinamska velikost C_{60} v vodni suspenziji (poskusi z GUV)



Slika B2: Hidrodinamski polimer C_{60} v vodni suspenziji.

(a) Normalizirana korelacijska funkcija intenzitete sipanja svetlobe ($G_2(t)$), izmerjena pri kotu 90° ; prazni krogi in porazdelitvena funkcija hidrodinamskega polmera C_{60} (0,1 mg/mL) v dH_2O (a; vstavke). Polna črta prikazuje večeksponentno prilagajanje izmerjene korelacijske funkcije. (b) Ustrezajoča porazdelitvena funkcija nanodelcev C_{60} , izražena glede na intenziteto ($-\circ-$), maso ($-\blacktriangle-$) ali številčnost ($-\bullet-$). Navpična os je poimenovana s splošno označbo W_i , ki ponazarja frakcijo posameznih delcev v porazdelitvah. Analiza in prikaz: prof. dr. Ksenija Kogej, FKKT, Univerza v Ljubljani. Povzeto po: Zupanc in sod., 2012.

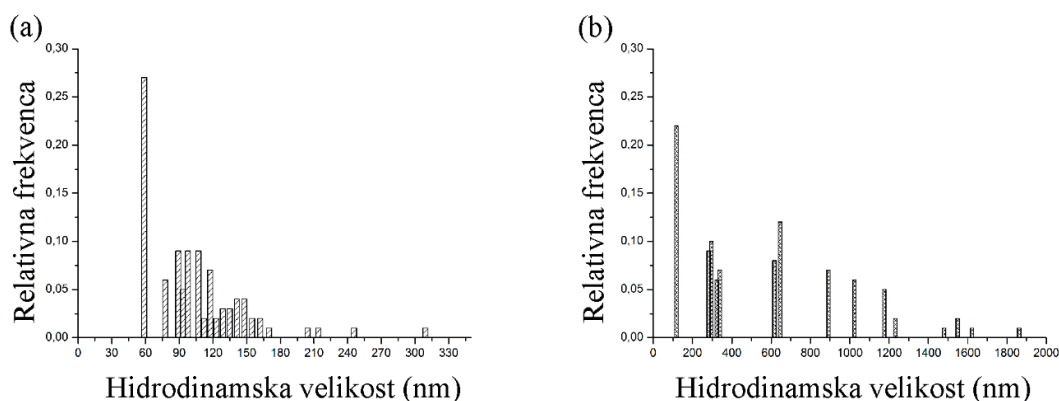
1.1.3 Hidrodinamska velikost C₆₀ v vodni suspenziji in reakcijski mešanici, uporabljenih pri encimskih testih



Slika B3: Hidrodinamska velikost C₆₀ v vodni suspenziji in v reakcijski mešanici za encimske teste (številski porazdelitev).

Številski porazdelitev hidrodinamskih premerov skupkov C₆₀ (a) v dH₂O (pH 7,0) ali (b) v reakcijski mešanici, uporabljeni pri encimskih testih (pH 8,0; 0,01 mg/mL), izmerjeno z metodo DLS. Na vodoravni osi so podani hidrodinamski premeri (v nm), na navpični pa relativna frekvenca pojavljanja ND ali skupkov ND z določeno velikostjo. Analiza in prikaz: prof. dr. Darko Makovec, IJS, Ljubljana. Povzeto po: Mesarič in sod., 2013.

1.1.4 Hidrodinamska velikost amorfnega ogljika v vodni suspenziji in reakcijski mešanici, uporabljenih pri encimskih testih



Slika B4: Hidrodinamska velikost CB v vodni suspenziji in v reakcijski mešanici za encimske teste (številski porazdelitev).

Številski porazdelitev hidrodinamskih premerov CB (a) v dH₂O (pH 7,0) ali v (b) reakcijski mešanici, uporabljeni pri encimskih testih (pH 8,0; 0,01 mg/mL), izmerjeno z metodo DLS. Na vodoravni osi so podani hidrodinamski premeri (v nm), na navpični pa relativna frekvenca pojavljanja ND ali skupkov ND z določeno velikostjo. Analiza in prikaz: prof. dr. Darko Makovec, IJS, Ljubljana. Povzeto po: Mesarič in sod., 2013.

1.2 VPLIV NANOMATERIALOV NA SPREMEMBE UMETNIH FOSFOLIPIDNIH MEMBRAN

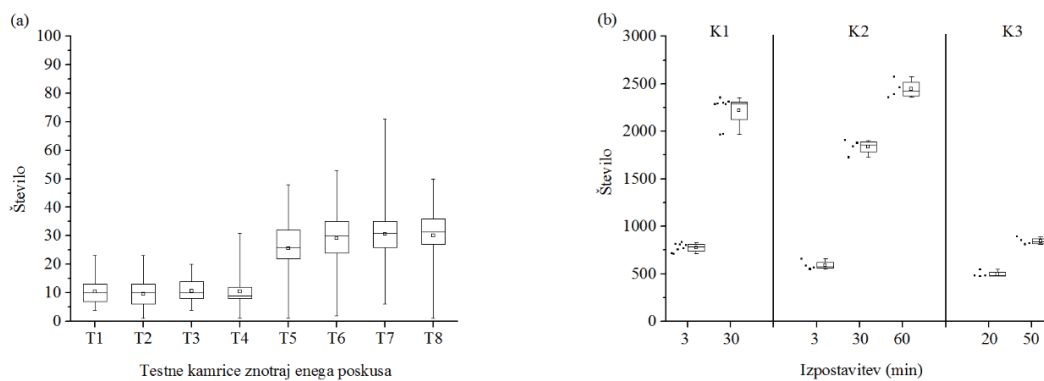
1.2.1 Vpliv nanomaterialov na orjaške unilamelarne vezikle

1.2.1.1 Primerljivost kontrolnih izpostavitvev

a) Število GUV

Zabeležili smo povečano število GUV v vseh kamricah po 3 in 30 min (K1, K2) (pregl. B1, sl. B5a). Vezikli (napolnjeni z raztopino saharoze) so težji od okoliškega medija (izoosmolarne raztopine glukoze), zato so se med izvedbo poskusa zaradi gravitacijske sile usedali na dno eksperimentalne kamrice, kjer smo jih v žariščni ravnini posneli. Višja sedimentacija med 3 in 30 min (za faktor 3; K2) in izrazito manjša med 30 in 60 min (za faktor 1,3; K2; pregl. B1) kaže na večinsko posedanje GUV v prvih 30 min. Manjši GUV se v prvih 3 min še niso usedli na dno kamrice in jih tako nismo zajeli v videoposnetkih (Slika B5b, K1 in K2). Razlika v številčnosti GUV po 20 in 50 min (Slika B5b, K3) je manjša kot med 30 in 60 min (sl. B5b, K1 in K2), iz česar smo sklepali, da je najintenzivnejše posedanje GUV poteklo že v prvih 20 min.

V poskusih K1 in K2 smo zabeležili visoko število GUV (do 2400 na vzorec; sl. B5), kar je otežilo avtomatsko segmentacijo GUV iz mozaikov, zato smo pri naslednjem poskusu K3 zmanjšali začetno gostoto GUV z dodatno razredčitvijo z 0,3 M raztopino glukoze; kot najprimernejšo smo ocenili razredčitev volumskem razmerju 1:4 (sl. A2, pril. A). Skladno smo zabeležili 4-krat manjše število GUV po 50 min (K3) kot po 60 min (K1) (sl. B5b, pregl. B1). Manjše število GUV pri K3 ni vplivalo na relativni standardni odklon (RSD) znotraj istega poskusa (vrednosti RSD so bile manjše od 8 % pri vseh treh poskusih; pregl. B1).

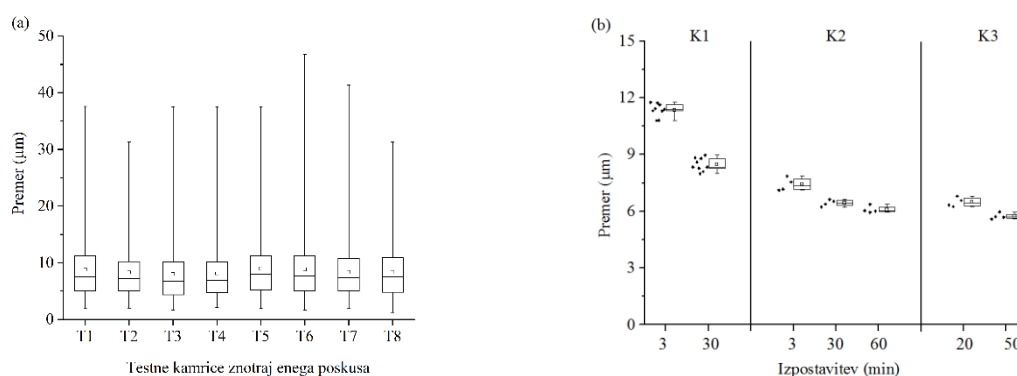


Slika B5: Primerjava števila GUV med kamricami posameznega poksusa in med poskusi.

(a) Število GUV v posameznih testnih kamricah znotraj K1 (izpostavitve 30 min), in (b) v kontrolnih poskusih K1, K2 in K3. Na navpičnih oseh je podano število GUV, na vodoravnih pa (a) testne kamrice, označene s T1 do T8, ali (b) časi izpostavitve (3 in 30 min; 3, 30 in 60 min ali 20 in 50 min). Najvišja in najnižja vrednost v posamezni skupini sta označeni z ročaji, povprečje je predstavljeno kot manjši kvadrat v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil. V posamezni okvir z ročaji je zajeto (a) od 1900 do 2300 GUV, ali (b) od 475 do 2575 GUV.

b) Premer GUV

Premer GUV znotraj enega poskusa (K1) je bil primerljiv med 8 eksperimentalnimi kamricami (izpostavitve 30 min; sl. B6a). Vrednosti RSD med GUV istih skupin so bili pri vseh časih inkubacije manjše od 4% (K1-K3; pregl. B1). Premer vseh GUV je bil večji od 1 μm , približno 90 % pod 15 μm , daljši rep porazdelitve je segal v območje do 50 μm . Pri vseh treh poskusih smo opazili trend manjšanja premera GUV s časom, kar je najverjetneje odraz medsebojnega vpliva gravitacije in vzgona; večji (težji) GUV se hitreje zbirajo na dnu eksperimentalne kamrice kot manjši (lažji). Manjše število majhnih GUV, prisotnih v ravnini zajemanja videoposnetkov po krajši izpostavitvi (3 min), se je odrazilo tudi v naraščajočem celokupnem številu GUV s časom izpostavljenosti (Slika B6b).

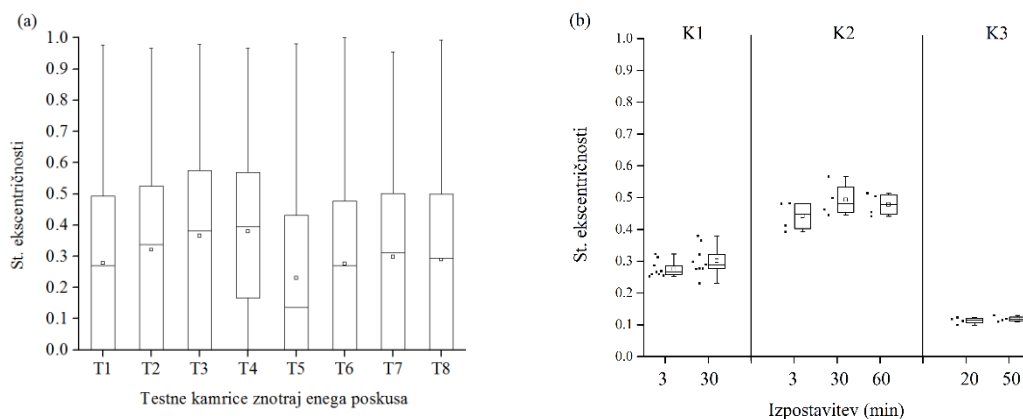


Slika B6: Primerjava premera GUV med kamricami posameznega poskusa in med poskusi.

(a) Premer GUV v posameznih testnih kamricah znotraj K1 (izpostavitve 30 min), in (b) v kontrolnih poskusih K1, K2 in K3. Na navpičnih oseh je podan premer GUV (v μm), na vodoravnih pa (a) testne kamrice, označene s T1 do T8, ali (b) časi izpostavitve (3 in 30 min; 3, 30 in 60 min ali 20 in 50 min). Najvišja in najnižja vrednost v posamezni skupini sta označeni z ročaji, povprečje je predstavljeno kot manjši kvadrat v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil. V posamezni okvir z ročaji je zajeto (a) od 1900 do 2300 GUV, ali (b) od 475 do 2575 GUV.

c) Oblika GUV: ekscentričnost

Spremembe oblike GUV smo ovrednotili z mero ekscentričnosti (stopnja bližje 1 pomeni odklon GUV od popolne sfere, ki ustreza stopnji 0). Zabeležili smo primerljive vrednosti stopnje ekscentričnosti med kontrolami znotraj poskusov (sl. B7a), ne pa med poskusi K1, K2 in K3 (sl. B7b, pregl. B1). Zaradi visoke občutljivosti smo to mero variabilnosti uporabili le kot okvirno oceno vpliva testirane snovi na obliko GUV.



Slika B7: Stopnje ekscentričnosti GUV med kamricami posameznega poskusa in med poskusi.

Povprečje stopnje ekscentričnosti GUV v (a) posameznih testnih kamricah znotraj K1 (izpostavitve 30 min), in (b) v kontrolnih poskusih K1, K2 in K3. Na navpičnih oseh je podan stopnja ekscentričnosti GUV (od 0 do 1), na vodoravnih pa (a) testne kamrice, označene s T1 do T8, ali (b) časi izpostavitve (3 in 30 min; 3, 30 in 60 min ali 20 in 50 min). Najvišja in najnižja vrednost v posamezni skupini sta označeni z ročaji, povprečje je predstavljeno kot manjši kvadrat v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil. V posamezni okvir z ročaji je zajeto (a) od 1900 do 2300 GUV, ali (b) od 475 do 2575 GUV.

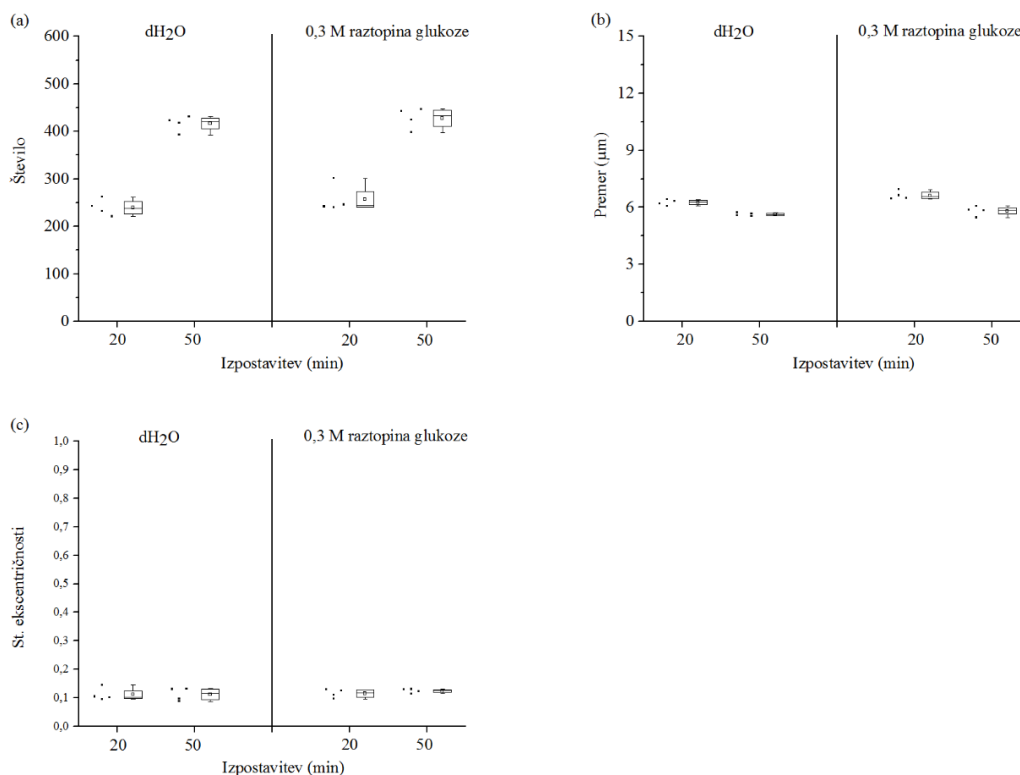
Preglednica B1: Glavni parametri treh kontrolnih poskusov: število, srednje vrednosti premera in srednje vrednosti ekscentričnosti GUV

Kontrolni poskus	Čas [min]	Število $\pm$ SD	Število RSD	Sr. vrednost premera [μm] $\pm$ SD	Sr. vrednost premera RSD	Sr. vrednost ekscentričnosti	St. ekscentričnosti RSD
1	3	775 $\pm$ 45	6%	11,4 $\pm$ 0,4	3%	0,28	9%
	30	2221 $\pm$ 157	7%	8,5 $\pm$ 0,4	4%	0,31	16%
2	3	590 $\pm$ 47	8%	7,7 $\pm$ 0,3	4%	0,44	11%
	30	1837 $\pm$ 78	4%	6,6 $\pm$ 0,2	3%	0,49	11%
	60	2446 $\pm$ 96	4%	6,3 $\pm$ 0,1	2%	0,78	8%
3	20	497 $\pm$ 34	6%	6,5 $\pm$ 0,3	4%	0,11	9%
	50	844 $\pm$ 35	4%	5,7 $\pm$ 0,2	3%	0,12	7%

Okrajšave: SD, standardni odklon; RSD, relativni standardni odklon. Opombe: Za vsak parameter je izražena mera razlike med posameznimi kamricami iste skupine GUV v obliki RSD. Pri vsakem času izpostavitve je v kontrolni poskus zajeta analiza GUV v 8 (K1) ali 4 (K2, K3) kamricah, v vsaki na dveh mestih vzorčenja (P1 in P2).

d) Primerljivost dodatka različnih medijev

Po dodatku dH₂O ali 0,3 M raztopine glukoze (20 ali 50 min inkubacija) smo zabeležili medsebojno primerljivo število (sl. B8a), premer (sl. B8b) in stopnjo ekscentričnosti GUV (sl. B8c); sklepamo, da dodatek medija ne vpliva na vrednotene parametre.



Slika B8: Primerjava vpliva destilirane vode in 0,3 M raztopine glukoze na število, premer in stopnjo ekscentričnosti GUV.

(a) Število, (b) premer in (c) stopnja ekscentričnosti GUV po dodatku dH₂O (levo) ali 0,3 M raztopine glukoze (desno), po 20 ali 50-min inkubaciji. Na navpični osi so podane povprečne vrednosti števila (a), premera (b) ali stopnje ekscentričnosti (c) GUV, zajetih v dveh eksperimentalnih kamricah, v vsaki na dveh mestih vzorčenja (P1 in P2), na vodoravni osi pa izbrana časa izpostavitve (20 ali 50 min). Povprečna vrednost vsakega parametra, ovrednotena iz enega videoposnetka na izbranem mestu snemanja (P1 ali P2), je ponazorjena s točko ob levi strani okvirja z ročaji; v vsaki točki je zajeto od 221 do 447 GUV. Najvišja in najnižja vrednost v posamezni skupini sta označeni z ročaji, povprečje je predstavljeno kot manjši kvadrat v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil.

1.2.2 Dodatna razlaga vpliva CoFe_2O_4 in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ na orjaške unilamelarne vezikle

a) Število GUV

Skladno z opažanjem in razlago pri kontrolnih poskusih (sl. B5) se je število GUV v kontrolnih kamricah povečalo v prvih 30 min (pregl. B2), podobno tudi po dodatku CoFe_2O_4 , manjšo porast števila GUV (za faktor 1,25; pregl. B2) pa smo zabeležili po dodatku $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$. Med časoma inkubacije 30 in 60 min se je po dodatku ND $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ število GUV statistično značilno zmanjšalo v primerjavi s kontrolno skupino (pregl. B2), po dodatku CoFe_2O_4 statističnih razlik nismo zabeležili.

Preglednica B2: Faktor povečanja povprečne vrednosti števila GUV, vrednoteno v času med 3 in 30 min ter med 30 in 60 min

Čas izpostavitve (min)	Kontrola	CoFe_2O_4	$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$
3 do 30	+ 2,28	+ 2,97	+ 1,25
30 do 60	+ 0,37	+ 0,30	- 0,17*

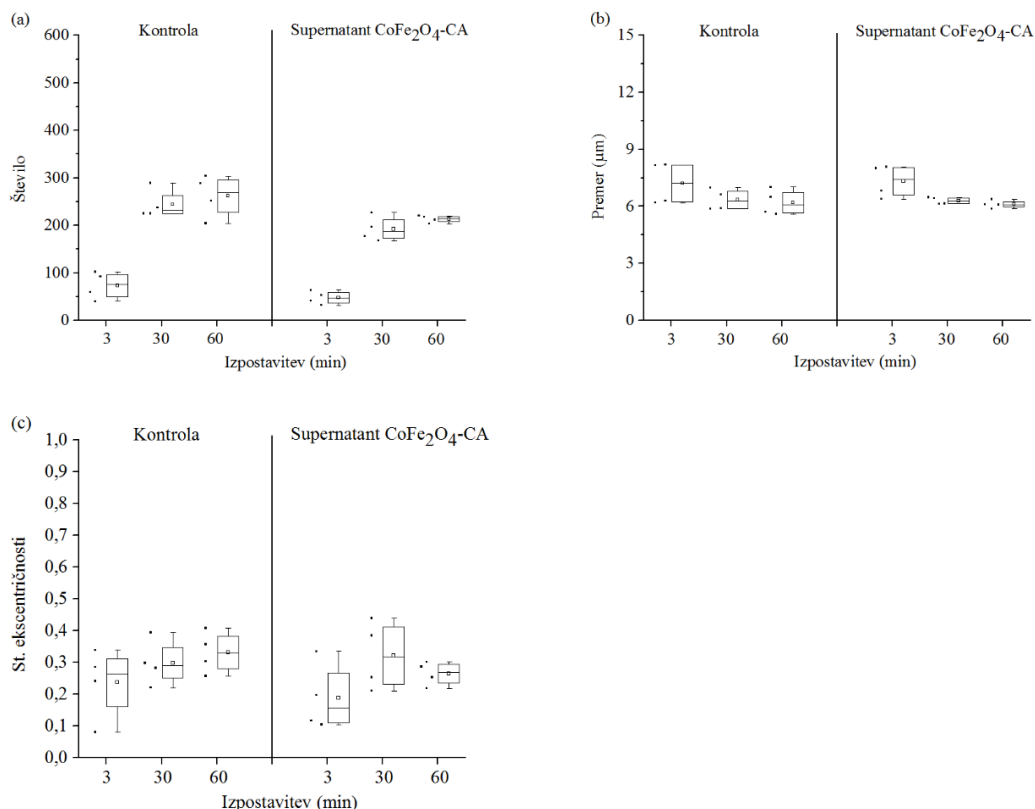
Opombe: simbol * pomeni statistično značilno razliko v primerjavi s kontrolno skupino ($p = 0,02$; Wilcoxonov test vsote rangov, stopnja zaupanja $\alpha = 0,05$).

1.2.3 Vpliv supernatanta suspenzije $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ na orjaške unilamelarne vezikle

Po izpostavitvi (3, 30 ali 60 min) GUV supernatantu suspenzije $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (pripravljeno s kombinacijo ultracentrifugacije in magnetnega polja suspenzije $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ v 0,3 M raztopini glukoze, 1 mg/mL) smo zabeležili rahlo zmanjšanje števila GUV v primerjavi s kontrolno skupino (pregl. B3; Sl. B9a), vendar ne tako izrazito, kot po dodatku suspenzije ND $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (sl. B9a). Statistično značilnih razlik v številu, premeru ali stopnji ekscentričnosti GUV v primerjavi s kontrolnimi GUV nismo zabeležili ($p > 0,05$).

Preglednica B3: Faktorji povečanja povprečne vrednosti števila GUV po izpostavitvi supernatantu suspenzije $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ v primerjavi s kontrolnimi GUV, vrednoteno v času izpostavitve med 3 in 30 min ter 30 in 60 min

Čas izpostavitve (min)	Kontrola	Supernatant $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$
3 do 30	+ 2,2	+ 3,12
30 do 60	+ 0,07	+ 0,12



Slika B9: Vpliv supernatanta suspenzije CoFe₂O₄-CA na število, premer in stopnjo ekscentričnosti GUV.

(a) Število, (b) premer in (c) stopnja ekscentričnosti GUV po dodatku 0,3 M raztopine glukoze (kontrola) ali supernatanta suspenzije CoFe₂O₄-CA. Na navpični osi so podane povprečne vrednosti (a) števila, (b) premera ali (c) stopnje ekscentričnosti GUV, zajetih v dveh eksperimentalnih kamricah, na dveh mestih vzorčenja (P1 in P2), na vodoravni osi pa časi izpostavitve (3, 30 in 60 min). Povprečno število GUV v vsaki kamrici pri posameznih časih izpostavitve je ponazorjeno s pikami ob levi strani okvirja z ročaji; v vsaki točki je zajeto od 32 do 289 veziklov. Najvišja in najnižja vrednost v vsaki skupini sta označeni z ročaji, povprečje je predstavljeno kot manjši kvadrat v centru okvirja z ročaji, centralna črta ponazarja mediano, spodnja in zgornja črta pa 25. in 75. percentil. Med kontrolnimi in izpostavljenimi GUV nismo zabeležili statistično značilnih razlik ($p > 0,05$) pri vseh treh parametrih.

1.2.4 Vpliv Fe₂O₃, Fe₂O₃-Si, Fe₂O₃-Si-COOH in Fe₂O₃-Si-NH₂ na orjaške unilamelarne vezikle

a) Število GUV

Število GUV se je, skladno s kontrolnimi poskusi (sl. B5) pri vseh testiranih skupinah povečalo s časom izpostavitve (med 20 in 50 min). Med kontrolnimi in izpostavljenimi GUV nismo zabeležili statistično značilnih razlik ($p > 0,05$), razen po inkubaciji (50 min) v suspenziji Fe₂O₃ (0,05 mg/mL; **, $p < 0,01$; sl. 10), vendar na podlagi vrednosti faktorjev povečanja povprečnega števila GUV med 20- in 50-min inkubacijo (pregl. B4), sklepamo, da dodatek vseh testiranih suspenzij ND ni imel vpliva na pokanje GUV.

Preglednica B4: Faktor povečanja povprečne vrednosti števila GUV po izpostavitvi dH₂O ali suspenziji Fe₂O₃, Fe₂O₃-Si, Fe₂O₃-Si-COOH ali Fe₂O₃-Si-NH₂, vrednoteno v času izpostavitve med 20 in 50 min

Čas izpostavitve (min)	Kontrola	Fe ₂ O ₃ 10 µg/ml	Fe ₂ O ₃ 50 µg/ml	Fe ₂ O ₃ -Si	Fe ₂ O ₃ -Si-COOH	Fe ₂ O ₃ -Si-NH ₂
20 do 50	1,73	1,70	1,57	1,58	1,51	1,73

1.2.5 Vpliv nanodelcev C₆₀ na multilamelarne vezikle, izmerjeno na konvencionalnem viru SAXS

Preglednica B5: Strukturni parametri POPC MLV, izpostavljeni dH₂O (kontrola) ali C₆₀, brez mehanske motnje ali podvrženi mehanski motnji (oznaka: *)

Strukturni parametri membran MLV	Kontrola (dH ₂ O)	C ₆₀ (0,1 mg/mL)	C ₆₀ * (0,1 mg/mL)
q_c (nm ⁻¹)	0,949	0,962	0,954
Δq_{exp} (nm ⁻¹)	0,1360	0,0874	0,1797
d (nm)	6,62	6,52	6,60
N	9	32	6

Okrajšave: q_c , sredina vrha vzorca sipane svetlobe, izraženo v enotah nm⁻¹; Δq_{exp} , eksperimentalno določena širina prvega vrha, izraženo v enotah nm⁻¹; d , ponavljajoča se razdalja med lipidnimi dvosloji, ki vključuje debelino membrane in vmesnega sloja vode, izraženo v enotah nm; N , ocenjeno povprečno število pozicijsko povezanih membranskih dvoslojev znotraj MLV; kontrola, MLV, oblikovani v dH₂O; C₆₀, MLV, izpostavljeni C₆₀ (0,1 mg/mL v dH₂O); C₆₀*, MLV, izpostavljeni C₆₀ (0,1 mg/mL v dH₂O), podvrženi 10 ciklom taljenja in zamrzovanja (mehanski motnji).

1.2.6 Vpliv nanodelcev C₆₀ na multilamelarne vezikle, izmerjeno na sinhrotronskem viru SAXS

Vrednosti strukturnih parametrov kontrolnih POPC MLV, t.j. ponavljajoča se razdalja med lipidnimi dvosloji (d), razdalja med polarnimi glavami fosfolipidov (d_{HH}), debelina vmesnega sloja vode (d_w) in fluktuacijski parameter (η), dobljene z globalno analizo krivulj, so v skladu s pričakovanimi (sl. 13, -●-; Pabst in sod., 2000; Rappolt in Pabst, 2008). Pri MLV v prisotnosti C₆₀ (2 ali 10 mol. %) se je razdalja d povečala v primerjavi s kontrolo (sl. 12, -▲- ali -■-), kar nakazuje na vključitev molekul C₆₀ v fosfolipidni dvosloj. Debelina membrane – d_{HH} se ni bistveno razlikovala v primerjavi s kontrolo; v temperaturnem obsegu od 15 do 45 °C se je stanjšala za 0,5 do 1 Å, od 45 do 65 °C pa je ostala skoraj enaka (sl. 13). Povečana d_{HH} v prisotnosti je C₆₀ razvidna tudi s profila elektronske gostote fosfolipidnih dvoslojev (sl. 14). V prisotnosti C₆₀ (2 ali 10 mol. %) smo zabeležili povišanje d_w za 15 % (približno 0,21 nm; -▲- in -■-) v primerjavi s kontrolo (sl. 13c). Fluktuacije medmembranskih razdalj so se z naraščajočo temperaturo povišale (sl. 13d, -■-). Fluktuacije medmembranskih razdalj, izražene s koeficientom σ , so se z naraščanjem temperature povečale od 0,48 do 0,68 nm pri kontrolnih POPC in za 0,55 do 0,77 nm v prisotnosti 10 mol. % C₆₀ (kar ustreza 15 do 35 % povečanje koeficienta σ) (sl. 13d).

1.2.7 Vpliv nanodelcev CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ na multilamelarne vezikle, izmerjeno na konvencionalnem viru SAXS

Preglednica B6: Strukturni parametri POPC MLV v prisotnosti 0,3 M raztopine glukoze (kontrola), suspenzije CoFe_2O_4 (v 0,3 M raztopini glukoze; 0,1 mg/mL) ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (v 0,3 M raztopini glukoze; 0,1 mg/mL)

Strukturni parametri membran MLV	kontrola (0,3 M raztopina glukoze)	CoFe_2O_4 (0,1 mg/mL)	$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (0,1 mg/mL)
q_c (nm^{-1})	0,955	0,931	0,794
Δq_{exp} (nm^{-1})	0,158	0,190	1,233
d (nm)	6,58	6,75	7,91
N	6	5	< 2

Okrajšave: q_c , sredina vrha vzorca sipane svetlobe prvega reda, izraženo v enotah nm^{-1} ; Δq_{exp} , eksperimentalno določena širina vrha prvega reda, izraženo v enotah nm^{-1} ; d , ponavljajoča se razdalja med lipidnimi dvosloji, ki vključuje debelino membrane in vmesnega sloja vode, izraženo v enotah nm; N , ocenjeno povprečno število pozicijsko povezanih membranskih dvoslojev znotraj MLV.

1.2.8 Fluorescenčna polarizacija: morebitno navzkrižno delovanje Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$ s spektrofotometričnim signalom

Intenzitete fluorescence vseh suspenzij Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$, izmerjene pri valovnih dolžinah 358 nm in 410 nm, so bile zanemarljive (podatki niso prikazani). Poleg tega po inkubaciji fluorescenčnih sond DPH in TMA-DPH v suspenzijah ND (vzorci pripravljeni na enak način kot v poskusih, le v odsotnosti lipidov) nismo zabeležili signala s fluorescenčnih sond, zato smo sklepali, da prisotnost ND v suspenzijah lipidov ni vplivala na izmerjene vrednosti polarizacije s fluorescenčnih sond.

1.2.9 Vpliv nanomaterialov CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$, Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$, CB ali C_{60} na multilamelarne vezikle, izmerjeno z metodo diferenčne dinamične kalorimetrije

Preglednica B7: Temperature faznega predprehoda (T_p) in glavnega faznega prehoda (T_m) DPPC MLV: kontrolnih in izpostavljenih suspenzijam CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$, Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$, CB ali C_{60}

Vzorec MLV	T_p (°C)	T_m (°C)
DPPC kontrola 1	35,8	41,0
DPPC CoFe_2O_4	35,8	41,0
DPPC $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$	35,8	41,0
DPPC CB	35,8	41,1
DPPC kontrola 2	36,2	41,6
DPPC Fe_2O_3	36,0	41,5
DPPC $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$	36,3	41,5
DPPC $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$	36,2	41,6
DPPC $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$	36,0	41,5
DPPC v vodi	36,2	41,6
DPPC C_{60} v vodi	35,3	41,6
DPPC C_{60} v CHCl_3	34,0	40,4

Opombe: kontrola 1, DPPC v pufru HEPES (10 mM, pH 7,0) v poskusih s CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ in CB; kontrola 2, DPPC v pufru HEPES (10 mM, pH 7,0) v poskusih s Fe_2O_3 , $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ in $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$; DPPC v dH_2O (op.: vrednosti pH nismo določili), DPPC v pufru HEPES (10 mM, pH 7,0) z dodano dH_2O v razmerju 1:1 (v/v) (poskus s C_{60}).

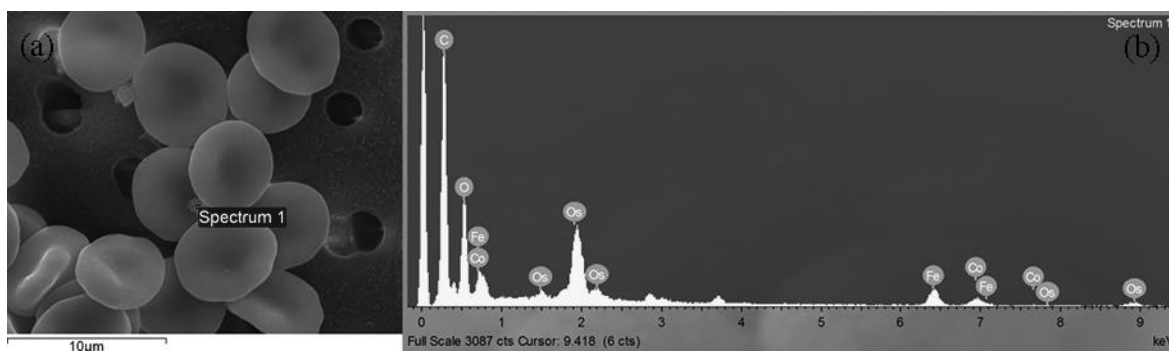
2 VPLIV NANOMATERIALOV NA BIOLOŠKE MEMBRANE

2.1.1 Analiza EDS površine eritrocitov, izpostavljenih CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$

Z metodo energijske disperzije X-žarkov (EDS) smo potrdili prisotnost materiala z vsebnostjo Co in Fe v vzorcih, izpostavljenih suspenzijam CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (v PBS-citratnem pufru, pH 7,4; končna koncentracija 1 mg/mL), vendar eritrociti niso bili na gosto prekrti z NM (pregl. B7-B9; sl. B10, B11).

Preglednica B8: Rezultati analize EDS na izbranih območjih na površini eritrocitov, izpostavljenih CoFe_2O_4 ali $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$

Izpostavitev	Število analiziranih spektrov EDS	Prisotnost Co in Fe
CoFe_2O_4	25	1
$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$	20	4



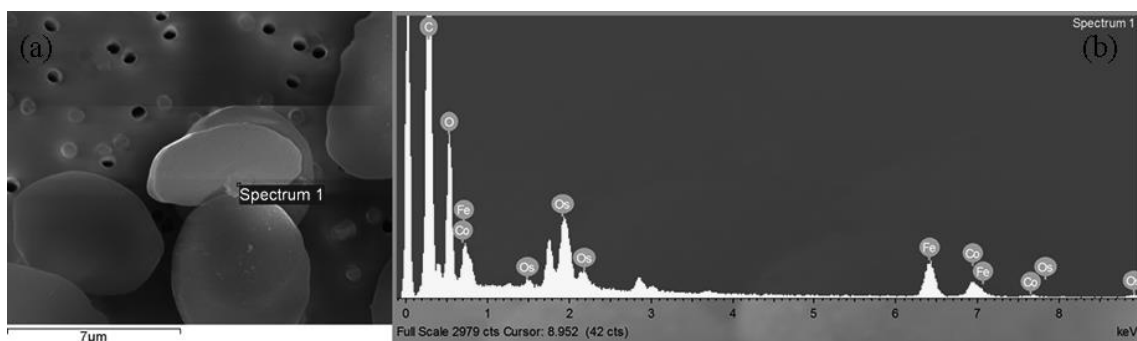
Slika B10: Prisotnost materiala z vsebnostjo Co in Fe na površini eritrocitov, izpostavljenim CoFe_2O_4 .

(a) Posnetek SEM prikazuje mesto izbranega področja za analizo EDS. (b) Spekter EDS elementov, zaznanih na izbranih področjih površine eritrocitov. Prisotnost Os na spektru EDS je posledica priprave vzorcev (postfiksacija z OsO_4), visoka vsebnost C pa zaradi ogljikovih diskov, na katere so bili vzorci vpeti za analizo SEM.

Preglednica B9: Rezultati analize EDS (izraženi v utežnih %) izbranega območja površine eritrocitov, izpostavljenih CoFe_2O_4

Področje analize	C	O	Fe	Co	Os
Spectrum 1	47	25	8	4	16

Opombe: Vsi rezultati so predstavljeni v utežnih %. Izbrano področje analize je prikazano na sliki B10. Prisotnost Os na spektru EDS je posledica priprave vzorcev (postfiksacija z OsO_4), visoka vsebnost C pa zaradi ogljikovih diskov, na katere so bili vzorci vpeti za analizo SEM.



Slika B11: Prisotnost materiala z vsebnostjo Co in Fe na površini eritrocitov, izpostavljenih $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$.

(a) Posnetek SEM prikazuje mesto izbranega področja za analizo EDS. (b) Spekter EDS elementov, zaznanih na izbranih področjih površine eritrocitov. Prisotnost Os na spektru EDS je posledica priprave vzorcev (postfiksacija z OsO_4), visoka vsebnost C pa zaradi ogljikovih diskov, na katere so bili vzorci vpeti za analizo SEM.

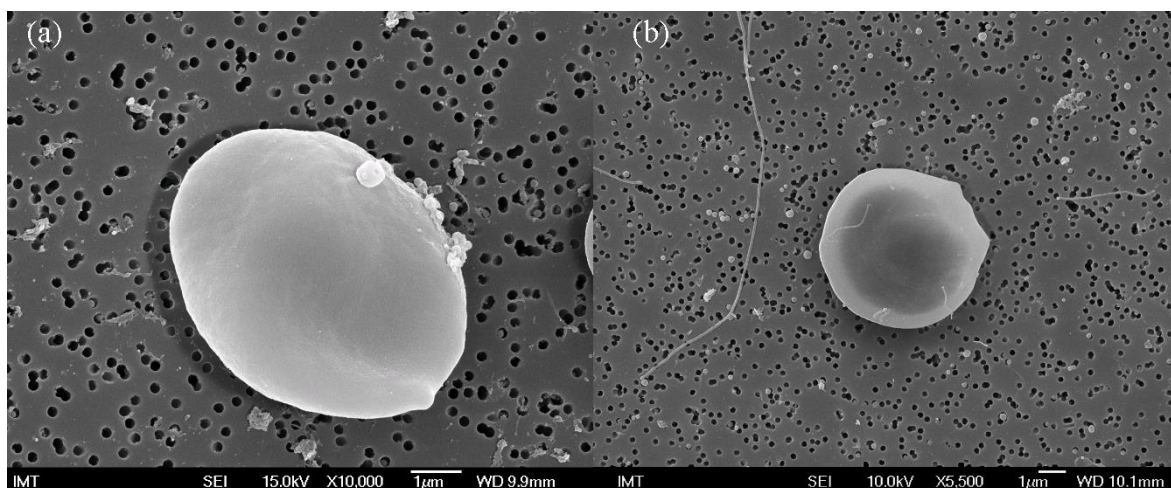
Preglednica B10: Rezultati analize EDS (izraženi v utežnih %) izbranega območja površine eritrocitov, izpostavljenih $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$

Področje analize	C	O	Fe	Co	Os
Spectrum 1	51	23	11	6	9

Opombe: Vsi rezultati so predstavljeni v utežnih %. Izbrano področje analize je prikazano na sliki B11. Prisotnost Os na spektru EDS je posledica priprave vzorcev (postfiksacija z OsO_4), visoka vsebnost C pa zaradi ogljikovih diskov, na katere so bili vzorci vpeti za analizo SEM.

2.1.2 Mikrovezikulacija eritrocitov v prisotnosti nanomaterialov

Zabeležili smo pojav struktur okrogle oblike pri kontrolnih skupinah (1-urna izpostavitve PBS-citratnemu pufru, pH 7,4; sl. B12a) in v prisotnosti $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si}$, $\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$ ali GO (posnetki niso prikazani). Prisotnost izrastkov v obliki tub smo opazili po izpostavitvi ploščicam GO (v PBS-citratnem pufru, pH 7,4; 0,5 mg/mL; 1h) (sl. B12b); izrastek ima na koncu zaključek, ki bi lahko ustrezal odcepljenim mikroveziklom.



Slika B12: Primer mikrovezikulacije eritrocitov.

Posnetek SEM (a) površine eritrocita z okroglimi strukturami (morebitnimi mikrovezikli) (kontrolni vzorec; 1-urna inkubacija v PBS-citratnem pufru, pH 7,4) ali (b) eritrocita v prisotnosti cevasto oblikovanih izrastkov, po izpostavitvi GO (v PBS-citratnem pufru, pH 7,4; končna koncentracija GO: 0,5 mg/mL). Izrastek ima na koncu zaključek, ki bi lahko ustrezal odcepljenim mikroveziklom.

2.2 ENCIMSKI TESTI: VPLIV OGLJIKOVIH NANOMATERIALOV NA AKTIVNOST ACETILHOLINESTERAZE

2.2.1 Vpliv ogljikovih nanomaterialov na inhibicijo in adsorpcijo ribje acetilholinesteraze

Vpliv GO na inhibicijo in adsorpcijo encima smo zabeležili že pri koncentracijah, nižjih od 0,01 mg/mL (pH 8,0), izpostavitve višjim koncentracijam (od 0,0476 do 0,0952 mg/mL; rezultati niso vključeni v prikaz) ni povzročila dodatnega zvišanja stopenj inhibicije in adsorpcije (sl. 22a). Nanomateriala CB in MWCNT (sl. 22b,d) sta povzročila približno enako stopnjo adsorpcije ribje AChE na NM: za spoznanje bolj izrazita inhibicija v primerjavi z adsorpcijo je bila v okviru eksperimentalne napake in je nismo razlagali kot pojav inhibicije encima pred nastopom adsorpcije. Rezultati so pokazali na visoko afiniteto CB do AChE; že pri nizkih koncentracijah smo zabeležili 50 % stopnjo adsorpcije oz. inhibicije (0,0001 oz. 0,0002 mg/mL), popolno adsorpcijo pa nad 0,0004 mg/mL. V primeru GO smo zabeležili visoko stopnjo adsorpcije (> 90%) pri koncentraciji (0,03 mg/mL), stopnji inhibiciji in adsorpcije nista neposredno sovpadali, kar nakazuje, da je po adsorpciji ribje AChE na GO njena aktivnost vsaj delno ohranjena. Pri MWCNT se pri koncentracijah, višjih od 0,0143 mg/mL vpliv na AChE ni spreminjal z naraščajočo koncentracijo (sl. 22d). Prisotnost C₆₀ ni značilno vplivala na aktivnost AChE (sl. 22c), zabeležili smo le blago povišano stopnjo adsorpcije pri koncentracijah, višjih od 0,02 mg/mL.

2.2.2 Vpliv ogljikovih nanomaterialov na inhibicijo in adsorpcijo acetilholinesteraze iz človeških eritrocitov

Nanomaterial GO je povzročil najvišji stopnji adsorpcije in inhibicije encima v primerjavi z ostalimi NM že pri izpostavitvenih koncentracijah do 0,04762 mg/mL (pH 8,0), pri višjih koncentracijah pa sta stopnji adsorpcije in inhibicije še narasli (sl. 23a). Zabeležili smo odsotnost adsorpcije ali inhibicije delovanja AChE iz človeških eritrocitov po izpostavitvi C₆₀ (do 0,04762 mg/mL, sl. 23c). Nanomateriala CB in MWCNT nista povzročila inhibicije delovanja encima, adsorpcija encima pa je naraščala od izpostavitvene koncentracije CB 0,01 in 0,0238 mg/mL MWCNT naprej (sl. 23b,d).

2.2.3 Primerjava vpliva ogljikovih nanomaterialov GO in CB na vretenčarsko in nevretenčarsko acetilholinesterazo

Zabeležili smo podoben trend vpliva CB in GO na vretenčarski (ribja AChE) in nevretenčarski encim (žuželčja AChE) (0,0001; 0,001 in 0,01 mg/mL, sl. 23) z razliko, da je CB bolj izrazito inhibiral delovanje ribje AChE (sl. 23a), GO pa žuželčje AChE (sl. 23b). V primerjavi s CB je prisotnost GO povzročila nižjo inhibicijo obeh encimov (sl. 23a,c), medtem ko je bila stopnja adsorpcije GO na oba encima višja (sl. 23b,d). Ribja AChE je bila pri nižji koncentraciji (0,0001 mg/mL) bolj občutljiva na CB in odpornejša na GO kot AChE.

2.3 KVARNI UČINKI POLISTIRENSKIH NANODELCEV

2.3.1 Kvarni učinki polistirenskih nanodelcev z različno količino aminoskupin na površini

Ovrednotili smo pozitivno korelacijo med količino aminoskupin ($-\text{NH}_2$) na površini PS- NH_2 (oznake 1-9) in izmerjenimi vrednostmi ζ -potenciala v NaCl (1mM, pH 7,0; 0,1 mg/mL) in pufru PBS (pH 7,4; 0,1 mg/mL). Vpliv različnih suspenzij PS- NH_2 smo opisno prikazali v sosledju od najmanjših do največjih absolutnih izmerjenih vrednosti ζ -potenciala v pufru PBS; poleg tega smo za verodostojnejšo interpretacijo rezultatov podali tudi hidrodinamski premer ND, ovrednoten z metodo DLS (0,1 mg/mL; pufer PBS, pH 7,4). Odstopanje krivulj fluorescenčnih signalov med posameznimi ponovitvami je značilno za epifluorescenčne metode, saj lahko visoko koncentrirane suspenzije ND motijo zajem slike in analizo. Četudi smo pri nekaterih ND zabeležili porast ali padec signala na enem ali več kanalih (pri koncentracijah ND, višjih od 0,1 mg/mL), smo vpliv teh ND vrednotili kritično, skladno z vplivom istih suspenzij pri nižjih koncentracijah, tako da smo hkrati upoštevali celostno stanje celic (rezultate sprememb vseh opazovanih parametrov):

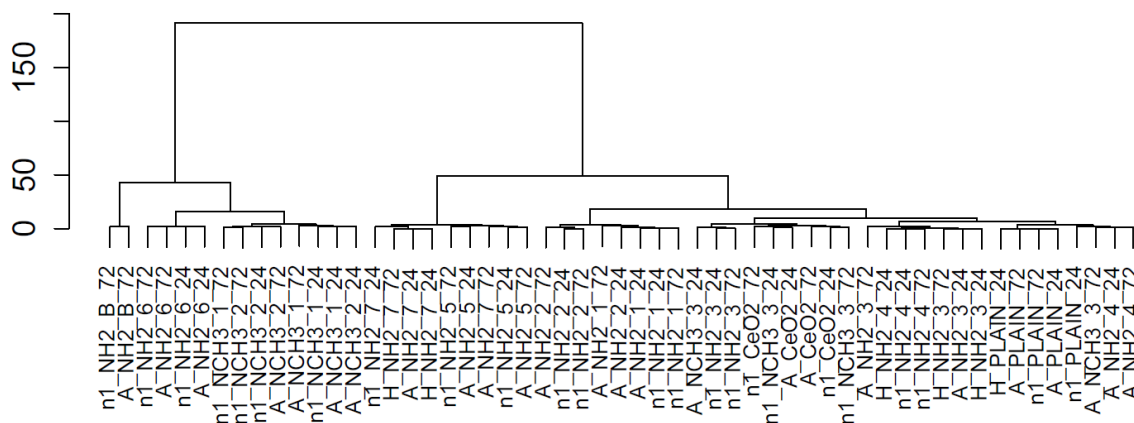
Opisno oceno vpliva (točke a do h) smo podali na osnovi grafov intenzitete signala fluorescence v vsakem kanalu v odvisnosti od koncentracije ND (vrednosti EC50 in IC50: pregl. B11, B12; vrednosti ζ -potenciala smo izmerili v pufru PBS (pH 7,4):

- (a) Površinsko neobdelani PS in PS-COOH (negativna referenčna materiala, izmerjeni vrednosti ζ -potenciala v pufru PBS, pH 7,4: ~ 0 mV, hidrodinamski premer: ~ 50 ali ~ 63 nm) niso povzročili kvarnih učinkov na testirane celične linije (24- ali 72-urna izpostavitve, 37 °C); zabeležili smo podoben vzorec intenzitet signalov kot pri negativni kontroli.
- (b) Nanodelci PS- NH_2 -4 (2 mV, 194 nm) in PS- NH_2 -2 (3 mV, 113 nm) z nizko stopnjo relativne količine skupin $-\text{NH}_2$ na površini ND niso vplivali na viabilnost celic, le pri najvišjih izpostavitvenih koncentracijah smo sporadično zabeležili spremembe nekaterih parametrov (mitohondrijska aktivnost, lizosomi, znotrajcelična koncentracija Ca^{2+}).
- (c) Pri PS- NH_2 -3 (2 mV, 158 nm) smo zabeležili blago povišan signal iz lizosomov pri astrocitih in pljučnih celicah, znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} se ni spremenila (24- ali 72-urna izpostavitve, 37 °C), medtem ko smo po 72 h zabeležili značilno povišan signal iz lizosomov pri astrocitih in zmanjšano število pljučnih celic.
- (d) Pri izpostavitvi PS- NH_2 -1 (3,8 mV, 130 nm) smo zabeležili značilno povišanje signala iz lizosomov (24- ali 72-urna izpostavitve, 37 °C); začetni odziv celic smo zabeležili že pri nižjih koncentracijah ($\sim 0,025$ mg/mL). Pri jetrnih celicah smo zabeležili povišanje znotrajcelične koncentracije Ca^{2+} (24- ali 72-urna izpostavitve, 37 °C), po 72 h smo zabeležili odmiranje pljučnih celic in povišano intenziteto signala iz jedra pri astrocitih in pljučnih celicah.
- (e) Pri PS- NH_2 -5 (6,3 mV, 315 nm) smo zabeležili zmanjšano mitohondrijsko aktivnost in skrčitev jedra (24- ali 72-urna izpostavitve, 37 °C), podobno pri vseh treh celičnih linijah, po 72 h tudi zmanjšano število pljučnih celic.

- (f) Nanodelci PS-NH₂-7 (6,9 mV, 164 nm) so povzročili povišanje signala iz jedra pri najvišji koncentraciji pri astrocitih ter hkratno povišan signal iz kanala za merjenje mitohondrijske aktivnosti (po 24 h, 37 °C), kar najverjetneje nakazuje na interferenco ND z inštrumentom pri najvišjih koncentracijah (1 mg/mL).
- (g) Pri PS-NH₂-6 (11,4 mV, 180 nm) smo po 24 h, in še bolj izrazito po 72 h, zabeležili spremembe vseh parametrov, razen pri lizosomih in znotrajcelični koncentraciji Ca²⁺.
- (h) PS-NH₂-Bang's (pozitivni referenčni material; 30 mV, 87 nm) so povzročili izrazito apoptozo vseh treh celičnih linij že po 24 h pri koncentraciji 0,05 mg/mL, četudi je bila porast signala, ki ustreza znotrajcelični koncentraciji Ca²⁺ (astrociti) ali lizosomov (pljučne celice), manj izrazita. V primerjavi z astrociti smo zabeležili nekoliko manj izrazit vpliv na pljučne in jetrne celice.

2.3.2 Klastrska analiza povezave vrednotenih parametrov

Dendrogram, izrisan na osnovi klastrske analize (Evklidska povezava, razdalja po Wardu) vrednosti EC₅₀ in IC₅₀ (pregl. B11, B12) za izbrane parametre kvarnih učinkov na celice, nakazuje na odsotnost smiselne združevanja ND glede na izmerjene vrednosti ζ -potenciala (pufer PBS, pH 7,4) (sl. B14); odsotnost povezave je prikazana na grafih odvisnosti EC₅₀ ali IC₅₀ posameznega parametra od vrednosti ζ -potenciala v pufru PBS (pH 7,4; 0,1mg/mL) (sl. B18, B19).



Nanodelci

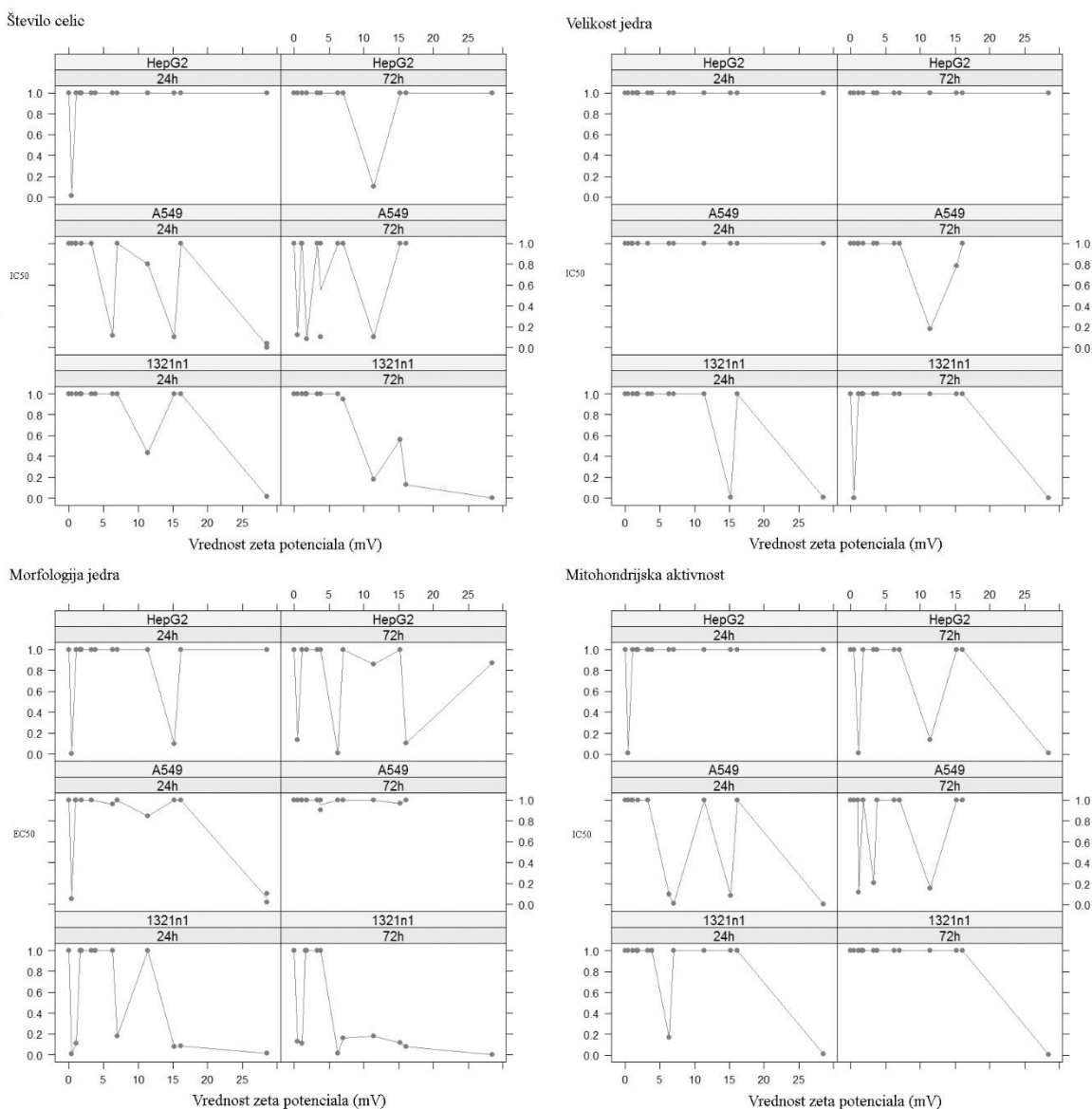
Slika B14: Dendrogram medsebojne odvisnosti vrednotenih parametrov kvarnih učinkov na celične kulture *in vitro*.

Klastrska analiza (Evklidska povezava, razdalja po Ward-u) rezultatov vrednotenih parametrov: števila celic, velikosti jedra, morfologiji jedra, spremembe oblike (nabrekanje) ali števila lizosomov in celična smrt. Na navpični osi je prikazana višina ovrednotene razdalje med vrednostmi vseh parametrov, izmerjenih pri posameznih ND. V analizo so vključeni PS-NH₂ (oznake 1-9), PS-N(CH₃)₃ (oznake 1-3), PS-NH₂-Bang's (oznaka -B), PS-COOH, PS (oznaka -plain), ter ND CeO₂ (op.: vpliva CeO₂ nismo upoštevali pri analizi rezultatov in razpravi). Opombe: Na dendrogramu so ND označeni kot, npr. -NH₂ z dodano zaporedno številko (oznake n1, A in H so del poimenovanja, potrebne le pri izvedbe analize v programu in jih ne razlagamo). Analiza in prikaz: dr. Damijana Kozlevčar, Biotehniška fakulteta, Ljubljana.

2.3.3 Kvarni učinki nanodelcev PS-N(CH₃)₃ s stalnim pozitivnim nabojem na površini

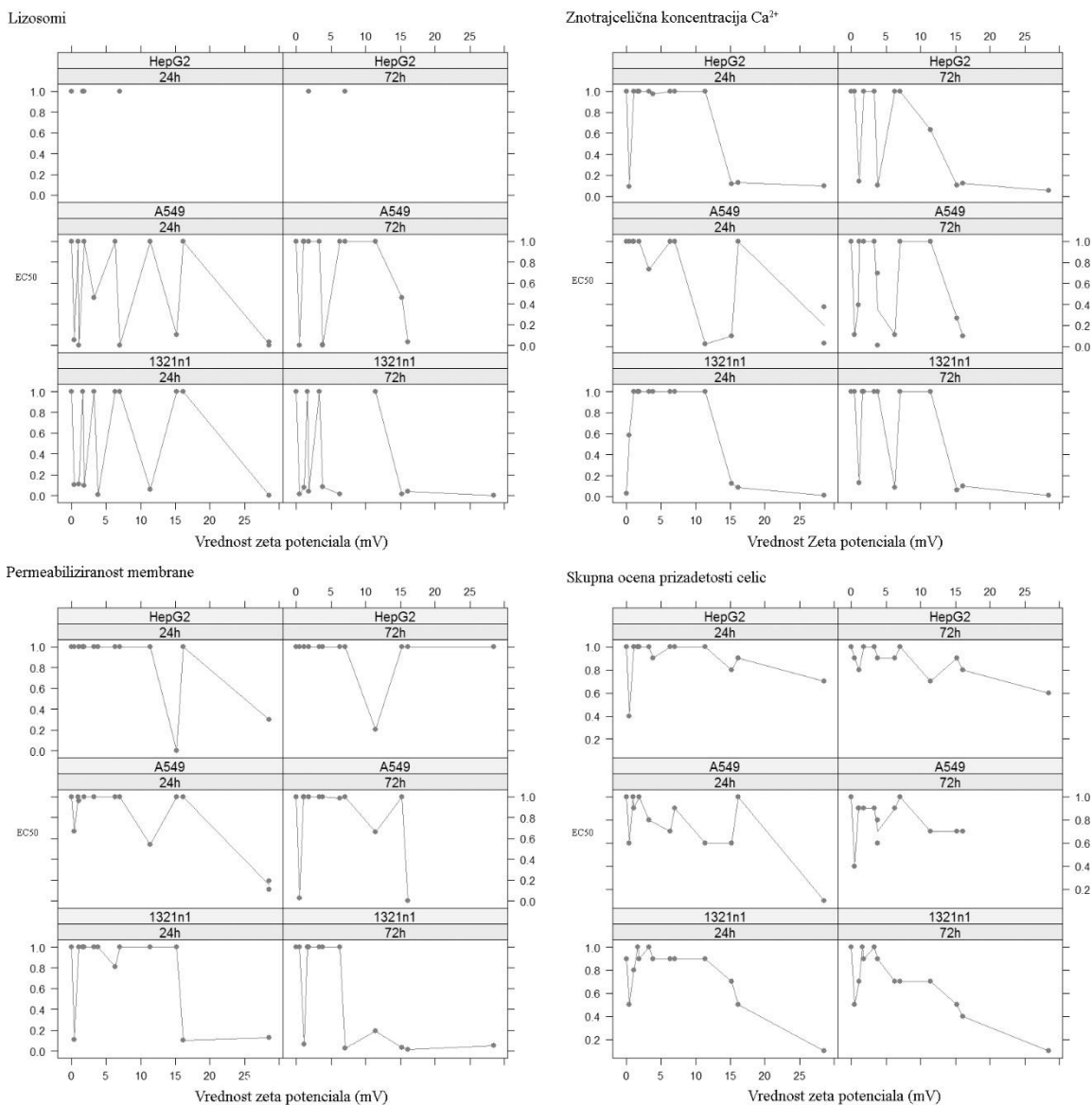
Rezultati izpostavitve suspenzijam PS-N(CH₃)₃ (oznake 1-3) so potrdili, da so pljučne in jetrne celice manj občutljive v primerjavi z astrociti. Pri slednjih je izpostavitve PS-N(CH₃)₃-1 (ζ -potencial v pufru PBS, pH 7,4: 15 mV; hidrodinamski premer aglomeratov: ~800 nm) ali PS-N(CH₃)₃-2 (16 mV, 122 nm) povzročila odziv, različen od zabeleženega pri PS-NH₂ (oznake 1-9); zabeležili smo povišan signal iz jedra v odsotnosti sočasne skrčitve jedra ali izrazito zmanjšanja števila celic (24-urna izpostavitve, 37 °C) (pregl. B11). Iz tega smo sklepali, da se je količina DNA v jedru podvojila (celice so vstopile v fazo celičnega cikla S), kjer je (najverjetneje) prišlo do zaustavitve celičnega cikla in pričakovana posledična delitev celic ni potekla. Ta predpostavka ni potrjena z eksperimentalnimi rezultati; izvedli smo dodatne analize celičnega cikla v prisotnosti ND PS-N(CH₃)₃ (rezultati niso vključeni v doktorsko nalogo). Sočasno s podvojenjo količino DNA smo zabeležili povečano znotrajcelično koncentracijo Ca²⁺ in povišan signal iz lizosomov (nabrekanje lizosomov), celično smrt pa le pri višjih koncentracijah ND (0,1 mg/mL). Po 72 h so bile dobljene krivulje vrednotenih parametrov podobne, a z izrazitejšim vplivom, z izjemo nespremenjenega signala iz lizosomov (pregl. B12).

Po 24-urni izpostavitvi pljučnih ali jetrnih celic PS-N(CH₃)₃ (oznake 1-3) nismo zabeležili kvarnih učinkov na celice (pregl. B11). Po 72 h smo opazili začetek odziva celic z nabrekanjem ali povečanim številom lizosomov, sledil je dvig znotrajcelične koncentracije Ca²⁺, z odsotnostjo smrtnosti celic in vpliva na ostale parametre apoptoze (pregl. B12).



Slika B15: Povezava EC50 ali IC50 parametrov (števila celic, velikosti jedra, morfologije jedra in mitohondrijske aktivnosti) z izmerjenimi vrednostmi ζ -potenciala po 24- ali 72-urni izpostavitvi PS-NH₂ z različno količino aminoskupin na površini ND.

Na navpični osi (levo ali desno) so prikazane ovrednotene vrednosti EC50 (morfologija jedra) ali IC50 (število celic, velikost jedra, mitohondrijska aktivnost (ovrednotena na osnovi mitohondrijskega membranskega potenciala) parametrov, po 24- ali 72-urni izpostavitvi. Na vodoravni osi so prikazane vrednosti ζ -potenciala v PBS-citratnem pufru (0,1 mg/mL; pH 7,4), ki ustrezajo različnim količinam aminoskupin na površini PS-NH₂.



Slika B16: Povezava EC50 ali IC50 parametrov (signal iz lizosomov, znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} , propustnost membrane in skupna ocena prizadetosti celic) z izmerjenimi vrednostmi ζ -potenciala po 24- ali 72-urni izpostavitvi PS-NH₂ z različno količino aminoskupin na površini ND.

Na navpični osi (levo ali desno) so prikazane ovrednotene vrednosti EC50 (signal iz lizosomov, znotrajcelična koncentracija Ca^{2+} , propustnost membrane (permeabiliziranost membrane) in skupna ocena prizadetosti celic (ovrednotena na osnovi vseh parametrov hkrati), po 24- ali 72-urni izpostavitvi. Na vodoravne osi so prikazane vrednosti ζ -potenciala v PBS-citratnem pufru (0,1 mg/mL; pH 7,4), ki ustrezajo različnim količinam aminoskupin na površini PS-NH₂.

Preglednica B11: Izračunane vrednosti EC50 in IC50 po 24-urni izpostavitvi astrocit (1321n1), celic pljučnega epitelijskega (A549) ali jetrnih celic (HepG2) izbranim ND: PS-NH₂ (oznake 1-9), PS-N(CH₃)₃ (oznake 1-3), PS-NH₂-Bang's, PS-COOH ali PS

24 h /celična linija	Nanodelci	Zeta pot. (mV)	Mitohon. MP	Intracel. Ca ²⁺	Lizosomi	Permeab. plazm.	Št. celic	Vel. jedra	Morf. jedra	Skupna ocena
1321n1	PS-N(CH ₃) ₃ -1	15,2	1,00	0,12	1,00	1,00	1,00	0,01	0,08	0,70
1321n1	PS-N(CH ₃) ₃ -2	16,1	1,00	0,09	1,00	0,10	1,00	1,00	0,08	0,50
1321n1	PS-N(CH ₃) ₃ -3	1,1	1,00	1,00	0,11	1,00	1,00	1,00	0,11	0,80
1321n1	PS-NH ₂ -1	3,8	1,00	1,00	0,01	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
1321n1	PS-NH ₂ -2	3,3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1321n1	PS-NH ₂ -3	1,8	1,00	1,00	0,10	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
1321n1	PS-NH ₂ -4	1,6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1321n1	PS-NH ₂ -5	6,3	0,17	1,00	1,00	0,81	1,00	1,00	1,00	0,90
1321n1	PS-NH ₂ -6	11,4	1,00	1,00	0,06	1,00	0,43	1,00	1,00	0,90
1321n1	PS-NH ₂ -7	7,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,18	0,90
1321n1	PS-NH ₂ -Bang's	28,5	0,01	0,01	0,00	0,13	0,01	0,01	0,01	0,10
1321n1	PS	0,0	1,00	0,03	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
A549	PS-N(CH ₃) ₃ -1	15,2	0,08	0,10	0,10	1,00	0,10	1,00	1,00	0,60
A549	PS-N(CH ₃) ₃ -2	16,1	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
A549	PS-N(CH ₃) ₃ -3	1,1	1,00	1,00	0,00	0,96	1,00	1,00	1,00	0,90
A549	PS-NH ₂ -1	3,3	1,00	0,74	0,46	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80
A549	PS-NH ₂ -2	1,8	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
A549	PS-NH ₂ -3	1,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
A549	PS-NH ₂ -4	6,3	0,10	1,00	1,00	1,00	0,11	1,00	0,96	0,70
A549	PS-NH ₂ -5	11,4	1,00	0,02	1,00	0,54	0,80	1,00	0,84	0,60
A549	PS-NH ₂ -6	7,0	0,01	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
A549	PS-NH ₂ -7	28,5	0,00	0,03	0,00	0,11	0,04	1,00	0,10	0,10
A549	PS-NH ₂ -Bang's	28,5	0,00	0,38	0,03	0,19	0,00	1,00	0,02	0,10
A549	PS	0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-N(CH ₃) ₃ -1	15,2	1,00	0,12	/	0,00	1,00	1,00	0,10	0,80
HepG2	PS-N(CH ₃) ₃ -2	16,1	1,00	0,13	/	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
HepG2	PS-N(CH ₃) ₃ -3	1,1	1,00	1,00	/	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-NH ₂ -1	3,8	1,00	0,97	/	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
HepG2	PS-NH ₂ -2	3,3	1,00	1,00	/	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-NH ₂ -3	1,8	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-NH ₂ -4	1,6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-NH ₂ -5	6,3	1,00	1,00	/	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-NH ₂ -6	11,4	1,00	1,00	/	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-NH ₂ -7	7,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-NH ₂ -Bang's	28,5	1,00	0,10	/	0,30	1,00	1,00	1,00	0,70
HepG2	PS	0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Op.: Vrednosti EC50 (intenziteta signala iz jedra, lizosomov, znotrajcelična koncentracija Ca²⁺, propustnost plazmaleme) ali IC50 (število celic, velikost jedra, mitohondrijska aktivnost) so izražene v območju od 0 do 1; vrednost 1 pomeni odsotnost vpliva ND pri merjenih koncentracijah (do 1 mg/mL). Oznaka (/) pomeni, da vrednosti EC50 ali IC50 ni bilo mogoče izračunati iz pridobljenih podatkov.

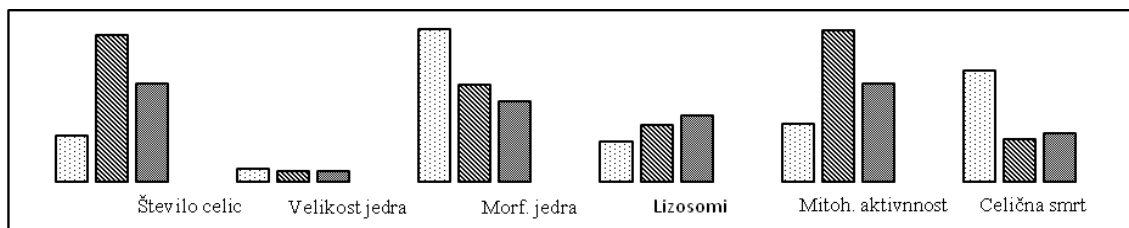
Preglednica B12: Izračunane vrednosti EC50 in IC50 po izpostavitvi (72h) astrocit (1321n1), celic pljučnega epitelija (A549) ali jetrnih celic (HepG2) izbranim ND: PS-NH₂ (oznake 1-9), PS-N(CH₃)₃ (oznake 1-3), PS-NH₂-Bang's, PS-COOH ali PS

72 h /celična linija	Nanodelci	Zeta pot. (mV)	Mitohon. MP	Intracel. Ca ²⁺	Lizosomi	Permeab. plazm.	Št. celic	Vel. jedra	Morf. jedra	Skupna ocena
1321n1	PS-N(CH ₃) ₃ -1	15,2	1,00	0,06	0,01	0,03	0,56	1,00	0,12	0,50
1321n1	PS-N(CH ₃) ₃ -2	16,1	1,00	0,10	0,04	0,01	0,13	1,00	0,08	0,40
1321n1	PS-N(CH ₃) ₃ -3	1,1	1,00	0,13	0,08	0,06	1,00	1,00	0,11	0,70
1321n1	PS-NH ₂ -1	3,8	1,00	1,00	0,08	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
1321n1	PS-NH ₂ -2	3,3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1321n1	PS-NH ₂ -3	1,8	1,00	1,00	0,04	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
1321n1	PS-NH ₂ -4	1,6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
1321n1	PS-NH ₂ -5	6,3	1,00	0,09	0,01	1,00	1,00	1,00	0,01	0,70
1321n1	PS-NH ₂ -6	11,4	1,00	1,00	1,00	0,19	0,18	1,00	0,18	0,70
1321n1	PS-NH ₂ -7	7,0	1,00	1,00	/	0,03	0,95	1,00	0,16	0,70
1321n1	PS-NH ₂ -Bang's	28,5	0,00	0,01	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,10
1321n1	PS	0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
A549	PS-N(CH ₃) ₃ -1	15,2	1,00	0,27	0,46	1,00	1,00	0,78	0,97	0,70
A549	PS-N(CH ₃) ₃ -2	16,1	1,00	0,10	0,03	0,00	1,00	1,00	1,00	0,70
A549	PS-N(CH ₃) ₃ -3	1,1	0,12	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
A549	PS-NH ₂ -1	3,3	1,00	0,70	0,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80
A549	PS-NH ₂ -2	1,8	1,00	0,01	0,00	1,00	0,10	1,00	0,91	0,60
A549	PS-NH ₂ -3	1,0	0,21	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
A549	PS-NH ₂ -4	6,3	1,00	1,00	1,00	1,00	0,08	1,00	1,00	0,90
A549	PS-NH ₂ -5	11,4	1,00	0,39	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
A549	PS-NH ₂ -6	7,0	1,00	0,11	1,00	0,98	1,00	1,00	1,00	0,90
A549	PS-NH ₂ -7	28,5	0,15	1,00	1,00	0,67	0,10	0,18	1,00	0,70
A549	PS-NH ₂ -Bang's	28,5	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
A549	PS	0,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-N(CH ₃) ₃ -1	15,2	1,00	0,10	/	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
HepG2	PS-N(CH ₃) ₃ -2	16,1	1,00	0,12	/	1,00	1,00	1,00	0,10	0,80
HepG2	PS-N(CH ₃) ₃ -3	1,1	0,01	0,14	/	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80
HepG2	PS-NH ₂ -1	3,8	1,00	0,11	/	1,00	1,00	1,00	1,00	0,90
HepG2	PS-NH ₂ -2	3,3	1,00	1,00	/	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-NH ₂ -3	1,8	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-NH ₂ -4	1,6	/	/	/	/	/	/	/	/
HepG2	PS-NH ₂ -5	6,3	1,00	1,00	/	1,00	1,00	1,00	0,01	0,90
HepG2	PS-NH ₂ -6	11,4	0,14	0,63	/	0,20	0,10	1,00	0,86	0,70
HepG2	PS-NH ₂ -7	7,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
HepG2	PS-NH ₂ -Bang's	28,5	0,01	0,06	/	1,00	1,00	1,00	0,87	0,60
HepG2	PS	0,0	1,00	1,00	/	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Op.: Vrednosti EC50 (intenziteta signala iz jedra, lizosomov, znotrajcelična koncentracija Ca²⁺, permeabiliziranost plazmaleme) ali IC50 (število celic, velikost jedra, mitohondrijska aktivnost) so izražene v območju od 0 do 1; vrednost 1 pomeni odsotnost vpliva ND pri merjenih koncentracijah (do 1 mg/mL). Oznaka (/) pomeni, da vrednosti EC50 ali IC50 ni bilo mogoče izračunati iz pridobljenih podatkov.

2.3.4 Podrobnejša analiza kvarnih učinkov nanodelcev PS-N(CH₃)₃-2 na celice pljučnega epitelija

Po 72-urni izpostavitvi celic A549 suspenzijam PS-N(CH₃)₃-2 (s stalnim pozitivnim nabojem na površini) nismo zabeležili celične smrti in izrazitih sprememb lizosomov. V primerjavi z izpostavitvijo PS-COOH (negativni referenčni material) smo zabeležili le majhno porast intenzitete signala iz lizosomov (sl. B17, B18c), kar je najverjetneje odraz pričakovane akumulacije PS-N(CH₃)₃-2 v lizosomih (sl. B19c). Izpostavitvev PS-N(CH₃)₃-2 ni povzročila padca signala iz lizosomov, enako kot pri PS-NH₂-Bang's (pozitivni referenčni material); slednje nakazuje na povečano propustnostjo lizosomalne membrane (sl. B18a,c).



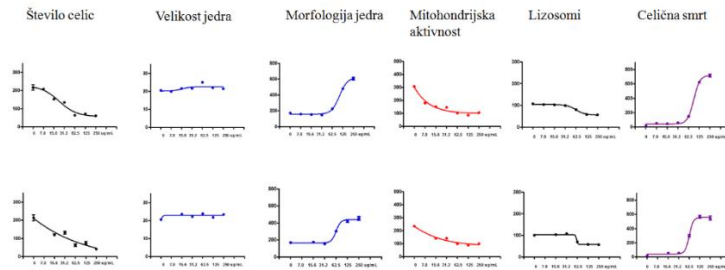
Slika B17: Primerjava vpliva PS-NH₂ Bang's, PS-COOH in PS-N(CH₃)₃-2 na vrednotene parametre kvarnega učinka na celice pljučnega epitelija alveolov po 72-urni izpostavitvi.

Vpliv ND (stolpci od leve proti desni): PS-NH₂ Bang's (0,025 mg/mL; *redke pike*), PS-COOH (0,1 mg/mL; *poševne črte*) in PS-N(CH₃)₃-2 (0,1 mg/mL; *goste pike*) na celice pljučnega epitelija (A549) (72-urna izpostavitve, 37 °C). Vrednoteni parametri sledijo od leve proti desni: število celic, velikost jedra, morfologija jedra, spremembe oblike (nabrekanje) ali števila lizosomov, mitohondrijska aktivnost in celična smrt. Na navpični osi nismo označili enot intenzitete fluorescenčnega signala, saj med parametri niso enotne; višina stolpcev služi kot informativna primerjava vpliva testiranih ND. Rezultati so predstavljeni kot povprečje dveh neodvisnih meritev.

Nanodelci PS-NH₂-Bang's (Slika B18a) so po 72-urni izpostavitvi povzročili zmanjšano število celic A549, in niso bistveno vplivali na velikost jedra. Pri višjih koncentracijah (nad 0,06 mg/mL) so PS-NH₂-Bang's vplivali na spremembo morfologije jedra oz. zgoščevanje DNA v jedru, ter na padec intenzitete signala iz mitohondrijev (zmanjšana aktivnost mitohondrijev) in iz lizosomov; slednje lahko razlagamo kot odraz zmanjšane števila lizosomov ali povišane propustnosti lizosomalne membrane kot posledica celične smrti. Povišano smrtnost celic smo zabeležili tudi z označevalcem za propustnost celičnih membran (barvilo To-Pro 3; sl. B18a, skrajno desni diagram).

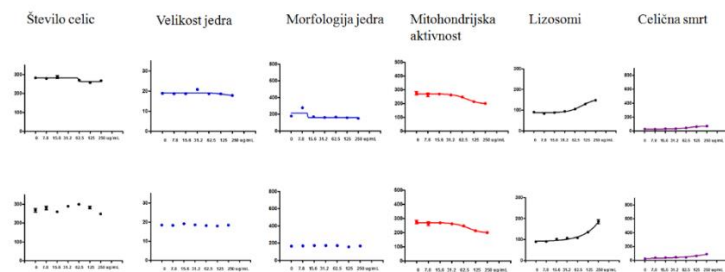
Pri celicah, izpostavljenih PS-COOH (negativni referenčni material), smo zabeležili rahlo zmanjšanje mitohondrijske aktivnosti (pri koncentracijah, višjih od 0,125 mg/mL), ter porast intenzitete signala iz lizosomov, kar je najverjetneje odraz kopičenja PS-COOH v lizosomih (sl. B18b). Izpostavitvev PS-N(CH₃)₃-2 je povzročila zmanjšano število celic (manj izrazito kot pri pozitivnemu referenčnemu materialu), padec mitohondrijske aktivnosti (le pri eni ponovitvi), ter blago povišan signal iz lizosomov (odraz nabrekanja ali povečanega števila lizosomov, sl. B19) in propustnost plazmaleme (celično smrt).

(a)

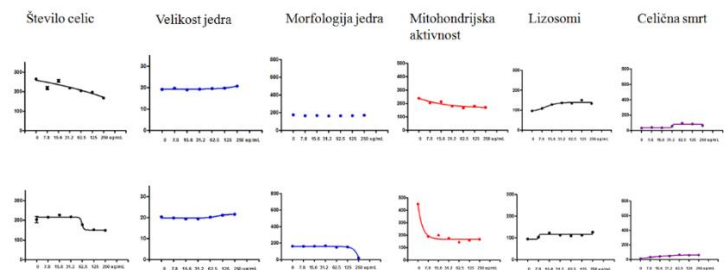
PS-NH₂-Bang's

(b)

PS-COOH

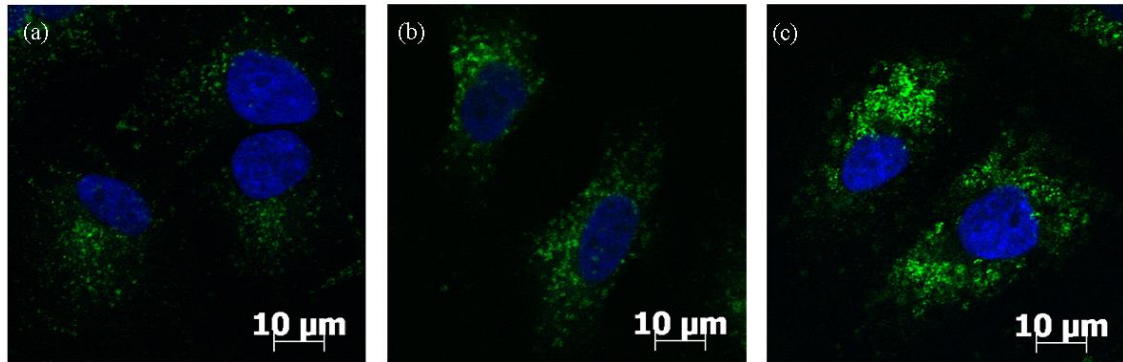


(c)

PS-N(CH₃)₃-2

Slika B18: Koncentracijsko odvisni vpliv pozitivnega (PS-NH₂-Bang's), negativnega referenčnega nanomateriala (PS-COOH) in testiranih ND PS-N(CH₃)₃-2 na vrednotene parametre kvarnega učinka na celice pljučnega epitelia alveolov po 72-urni izpostavitvi.

Vpliv ND (a) PS-NH₂-Bang's, (b) PS-COOH ali PS-N(CH₃)₃-2 na celice pljučnega epitelia (A549) po 72-urni izpostavitvi. Na vodoravni osi so prikazane končne koncentracije ND (0, 0,0078; 0,0156; 0,0312; 0,0625; 0,125 in 0,25 mg/mL), na navpični osi pa izmerjena intenziteta fluorescenčnega signala. Diagrami vrednotenih parametrov v odvisnosti od koncentracije sledijo od leve proti desni: število celic, velikost jedra, morfologija jedra, mitohondrijska aktivnost, spremembe oblike (nabrekanje) ali števila lizosomov in celična smrt. Z namenom prikaza morebitnih odstopanj med neodvisnimi ponovitvami sta grafično predstavljeni dve neodvisni ponovitvi.



Slika B19: Celice pljučnega epitelijskega (A549), posnete pod konfokalnim mikroskopom.

(a) Kontrolne celice, (b) celice, izpostavljene PS-NH₂-Bangs, (c) celice, izpostavljene PS-N(CH₃)₃. Celice so bile po 72-urni izpostavitvi označene s primarnimi protitelesi za proteine lizosomalne membrane (mišje poliklonsko protitelo 'anti-Lamp-1') in sekundarnimi protitelesi (AlexaFluor®488, op.: zeleni spekter). Jedrna DNK je bila označena z barvilom Dapi (modri spekter). Vzorce smo posneli s konfokalnim mikroskopom Leica TCS SP5 AOBS confocal microscope (Mannheim, Nemčija), UCD Conway Imaging Core (zahvala za pomoč Dr. Dimitriju Scholz in UCD Conway Imaging Core Facilities, UCD, Dublin, Irska).

PRILOGA C: DOVOLJENJE KOMISIJE REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO



KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

Prof. dr. Veronika Kralj-Iglič, dr. med.
Laboratorij za klinično biofiziko
Inštitut za biofiziko, Medicinska fakulteta v Ljubljani
Lipičeva 2, 1000 Ljubljana

Štev.: 117/02/10
Datum: 23. 3. 2010

Spoštovana gospa prof. dr. Kralj-Iglič,

Komisiji za medicinsko etiko (KME) ste 11. 2. 2010¹ poslali vašo prošnjo za mnenje o etični primernosti raziskave z naslovom:

"Mikrovezikli v telesnih tekočinah domačih živali in človeka."

KME je na seji 23. 2. 2010 ocenila, da raziskava ni v nasprotju z etičnimi standardi, in Vam s tem izdaja svoje soglasje.

S spoštovanjem in lepimi pozdravi,

prof. dr. Jože Trontelj
predsednik Komisije za medicinsko etiko