KARAKTERIZACIJA IN SLEDENJE NANODELCEM TER NJIHOVEMU TOKSIČNEMU UČINKU V CELICAH

Maja Garvas

Doktorska disertacija
Mednarodna podiplomska šola Jožefa Stefana
Ljubljana, Slovenija, junij 2015

Komisija za oceno doktorske disertacije:

prof. ddr. Boris Turk, predsednik, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana

prof. dr. Saša Novak Krmpotič, član, Institut »Jožef Stefan«, Ljubljana

prof. dr. Damjana Drobne, član, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana

MEDNARODNA PODIPLOMSKA ŠOLA JOŽEFA STEFANA
JOŽEF STEFAN INTERNATIONAL POSTGRADUATE SCHOOL



Maja Garvas

KARAKTERIZACIJA IN SLEDENJE NANODELCEM TER NJIHOVEMU TOKSIČNEMU UČINKU V CELICAH

Doktorska disertacija

CHARACTERIZATION AND TRACKING OF NANOPARTICLES AND THEIR TOXIC EFFECT WITHIN CELLS

Doctoral Dissertation

Mentor: prof. dr. Janez Štrancar

Ljubljana, Slovenija, junij 2015

Kazalo

Povzetek ..... **VII**

Abstract ..... **IX**

Seznam kratic ..... **XI**

1 Uvod **1**
1.1 Interakcije nanodelcev s celicami 1
1.2 Prehod nanodelcev skozi plazmalemo 2
1.3 Lastnosti TiO_2 nanodelcev 3
1.4 Toksičnost TiO_2 4
1.5 Radikali in fototoksičnost 5

2 Namen dela **7**

3 Materiali in metode **9**
3.1 Materiali 9
3.2 Metode 10
3.2.1 Sinteza nanocevk TiO_2 10
3.2.2 Funkcionalizacija površine TiO_2-NC 10
3.2.3 Fluorescenčno označevanje fTiO_2-NC 11
3.2.4 Čiščenje vzorca 11
3.2.5 Karakterizacijske tehnike 12
3.2.5.1 Presevna in vrstična elektronska mikroskopija (TEM in SEM) 12
3.2.5.2 Praškovni difraktogram (XRD) 12
3.2.5.3 Specifična površina (BET) 12
3.2.5.4 Infrardeča spektroskopija (IR) 12
3.2.5.5 Zeta potencial (ζ) 12
3.2.5.6 UV-VIS spektroskopija 12
3.2.5.7 Fluorescenčna spektroskopija 13
3.2.6 Preživetveni test MTS 13
3.2.7 Klonogenični test 14
3.2.8 Stabilnost suspenzije nanocevk 15
3.2.9 Vezava serumskih proteinov na TiO_2-NC 15
3.2.10 Fotokatalitična aktivnost TiO_2-NC 15
3.2.11 Fotokatalitična aktivnost TiO_2-NC v celičnem mediju 16
3.2.12 Priprava neoznačenih TiO_2-NC za celične poskuse 17
3.2.13 Priprava orjaških liposomov za preučevanje interakcije z označenimi nanocevkami 18
3.2.14 FRET FMS eksperimenti 18
3.2.14.1 Zgradba FMS sistema 18
3.2.14.2 Interakcija MCF-7 celic z označenimi nanocevkami A-TiO_2-NC 19

3.2.14.3 Interakcija neoznačenih TiO_2-NC z MCF-7 celicami 19
3.2.14.4 Interakcija fluorescenčno označenih A-TiO_2-NC z liposomi (FRET FMS poskusi) 20
3.2.14.5 Kontrolni poskusi 21
3.2.14.6 FMS analiza slik 21
3.2.14.7 Bledenje membranskega fluorofora 22
3.2.14.8 Analiza interakcije nanocevk z lipidnim dvoslojem 23

4 Rezultati in razprava 25
4.1 Karakterizacija TiO_2-NC 25
4.2 Funkcionalizacija in fluorescenčno označevanje 25
4.3 Interakcija TiO_2-NC s celicami *in vitro* – ocena citotoksičnosti in fototoksičnosti nanocevk 29
4.3.1 Celična viabilnost v odvisnosti od koncentracije TiO_2-NC v temi oziroma v prisotnosti UV svetlobe 29
4.3.2 Razčlenitev rezultatov MTS testa 33
4.3.3 Interakcija TiO_2-NC s serumski proteini 34
4.3.4 Tvorba radikalov prostih ali prekritih TiO_2-NC 37
4.4 Interakcija A-TiO_2-NC s celicami – mikroskopske in mikrospektroskopske meritve 38
4.5 *In vitro* fluorescenčna mikroskopija MCF-7 celic v prisotnosti TiO_2-NC 42
4.6 Interakcija TiO_2-NC z modelnimi lipidnimi membranami, preučevana s FRET FMS metodo 44

5 Zaključki 51

6 Zahvale 53

7 Literatura in viri 55

Kazalo slik 63

Kazalo tabel 69

Priloga A 71
Fotokatalitična aktivnost TiO_2-NC 71
Optične lastnosti suspenzije TiO_2-NC 74
DMPO-OH adukt izvira iz primarnih OH radikalov TiO_2-NC ob prisotnosti UV svetlobe 76
Bledenje membranskega fluorofora – referenčni poskusi 77
Vpliv naboja na interakcije nanocevk z modelnimi lipidnimi membranami 77
EDS TEM analiza lipidnega plašča okoli TiO2-NC 82

Priloga B 85
Objave 85

Povzetek

V zadnjih letih se je izoblikovalo stališče, da je interakcija med nanodelci in membrano odvisna od interakcij z biomolekulami, npr. od proteinske korone, ki je sestavljena iz proteinov in ki naj bi preprečevala neposreden stik površine nanodelcev z membrano. Ker pa je vezavna afiniteta proteinov do površine nanodelcev različno velika, je vezava reverzibilna[1], zaradi česar obstaja verjetnost, da je del površine nanodelcev nepokrit in da lahko torej ta isti del neposredno interagira z membrano.

Po drugi strani pa tudi oblečeni nanodelci verjetno prej ali slej interagirajo z membrano neposredno. Oblečeni v proteinsko korono sicer v celico vstopajo po ustaljenih, energijsko odvisnih poteh, a se v procesu endocitoze nakopičijo v lizosomih, kjer se korona zaradi prisotnih encimov in nizkega pH razgradi. Čeprav opazimo puščanje lizosomske membrane, včasih tudi apoptozo[2], pa pravi mehanizem še vedno ostaja nepojasnjen.

Med različnimi nanodelci TiO_2 spadajo zagotovo med najpogostejše. TiO_2 je namreč na splošno zelo razširjen material. Pri mletju dobimo poleg večjih mikronskih delcev še skoraj tretjino delcev nano velikosti. Več kot tretjino milijona tone se ga porabi samo v hrani kot netoksični prehrambni pigment, dodatno pa še vsaj toliko v barvni in kozmetični industriji. Kljub razširjenosti pa njegova potencialna toksičnost še vedno ni jasna, mehanizem je še vedno neznan.

Ker je pomembna lastnost TiO_2 tudi fotokatalitičnost, smo tekom našega dela želeli razumeti mehanizem fototoksičnosti v fizioloških pogojih, torej v prisotnosti proteinov. Viabilnost modelnih celic, MCF-7, smo zato raziskovali v prisotnosti fotovzbujenih TiO_2 nanocevk in s fluorescenčno ter EPR spektroskopijo spinskega lovljenja ugotovili, da je za fototoksičnost ključen del nepokrite površine samih nanocevk. Ugotovili smo, da je fototoksičnost torej določena z razmerjem med koncentracijo nanodelcev in proteinov.

Varno uporabo TiO_2 nanodelcev bi torej lahko dosegli, če bi samo površino nanodelcev modificirali z ligandi ali polimeri. Nasprotno pa bi lahko učinek fototoksičnosti, npr. pri fotodinamični terapiji raka, optimizirali z doosvetljevanjem z UV-A ob hkratnem zmanjševanju koncentracije proteinov.

Še bolj natančno smo toksičnost TiO_2 nanocevk v našem delu raziskovali preko vpliva na samo membrano, tako celično kot modelno. TiO_2 nanocevke smo v prvem koraku površinsko funkcionalizirali ter v nadaljevanju fluorescenčno označili. Uspešnost označevanja smo potrdili z uporabo različnih spektroskopij (infrardeča spektroskopija, spektroskopija izgub energije elektronov, fluorescenčna spektroskopija). V nadaljevanju so nam fluorescenčno označene cevke omogočile uporabo različnih fluorescenčnih spektroskopskih, mikroskopskih ter mikrospektroskopskih tehnik pri samem preučevanju interakcij cevk z membrano. Pokazali smo, da TiO_2 nanocevke povzročijo razpad modelne lipidne membrane brez prisotnosti proteinov. S fluorescenčno mikrospektroskopijo (FMS) smo v kombinaciji s tehniko fluorescenčnega prenosa energije (FRET) lahko razkrili kopičenje TiO_2 nanocevk na sami membrani. Ugotovili smo tudi, da se agregati nanocevk oblečejo v membranske lipide in z difuzijo v okolico odnašajo lipide ter tako destabilizirajo membrane. Zmanjšana afiniteta TiO_2 do lipidov bi torej lahko preprečila razpad membrane, nanotoksičnost pogosto uporabljenega nanomateriala pa bi bila tako znižana ali morda povsem odpravljena.

Abstract

During the last decade the protein corona has been recognized as the major modulator of the interaction between nanoparticles and membranes. Namely, proteins cover the surface of the nanoparticles and diminish probability of a direct contact between a cell's plasma membrane and nanoparticles. However, proteins bind to nanoparticle surface by a finite affinity and can thus be exchanged by other proteins and consequently expose nanoparticle surface during a lifetime of a corona[1].

On the other hand, even coated nanoparticles are expected to interact with membranes directly. Namely, endocytosis accumulates nanoparticles within the lysosomes, where corona is degraded. Although the lysosome membrane damage and apoptosis is encountered[2], the mechanism, by which this happens, remains unclear.

Among various types of nanoparticles, nano formulations of TiO_2 are very frequent because they can be produced by common milling of the widely produced TiO_2 powder. For that reason, more than a third of a million tonnes of nano TiO_2 is used every year as a nontoxic food coloring pigment. Similarly, nano TiO_2 appears to also be in the paints and the sunscreens. The potential cytotoxicity still remains unclear with the mechanism being unknown.

Since TiO_2 nanomaterial is also photocatalytic we explore the mechanism of the phototoxicity as well, especially in the presence of proteins. Cell viability measurements of the exposed model cells MCF-7, fluorescence and spin trapping EPR spectroscopy reveal that the ratio between the nanoparticle and protein concentrations determines the amount of the nanoparticles not covered by the serum proteins which determines the amount of photoinduced radicals that is responsible for the resulting phototoxicity.

The safe application of the nano TiO_2 can therefore be achieved by surface modifications with ligands or polymers. On the other hand, the efficient nanophototoxicity, targeted during photodynamic cancer therapy, can be realized by illumination with the UV-A light while keeping serum protein concentration low enough.

In addition the nanotoxicity of the TiO_2 nanotubes has been addressed via the study of its interaction with the cell membrane as well as with model membranes. In first step TiO_2 nanotubes surface was functionalised, in addition fluorophore was attached. The success of labelling was confirmed using various spectroscopies (infrared spectroscopy, electron energy loss spectroscopy, fluorescence spectroscopy). With fluorescent labelling of the TiO_2 nanotubes we enabled the application of the various fluorescent spectroscopic, microscopic and microspectroscopic techniques and show that the nanomaterial induces lipid bilayer disintegration without protein interference. By using fluorescence microspectroscopy (FMS) and fluorescence resonance energy transfer (FRET) we identify the accumulation of TiO_2 nanotubes on the membranes. Aggregates of the TiO_2 nanoparticles become wrapped by the membrane lipids and diffuse away, resulting in a lipid outflow that critically destabilizes the lipid bilayer. Our results show that this membrane disintegration can be avoided by decreasing the affinity of the TiO_2 towards the lipids, thus reducing the nanotoxicity of these widely used TiO_2 materials.

Seznam kratic

A = nesimetrija fluorescenčnega emisijskega spektra
A = količina dela oz. energije [kWh]
AFM = mikroskopija na atomsko silo
Alexa 488 = fluorescenčni označevalec Alexa Fluor® 488 sulfodiklorofenol ester
AEAPMS = povezovalna molekula (linker) med nanodelcem in fluoroforom; [3-(2-aminoetilamino)propil]metiltrimetoksi silan
ATCC = ameriška zbirka tipskih celičnih kultur
b = hitrost bledenja fluorofora
Bodipy 530/550 = fluorescenčni lipidni analog Bodipy® 530/550; (2-(4,4-difloro-5,7-difenil-4-bora-3a,4a-diaza-s-pentanoil)-1-heksadekanoil-sn-glicero-3-fosfoholin)
C6-NBD-PC =1-palmitoil-2-{6-[(7-nito-2-1,3-benzoksadiazol-4-il)amino]heksanoil}-sn- glicero-3-fosfoholin
DEPMPO = spinski lovilec 5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksid
DMEM = celični medij Dulbecco`s Modified Eagle Medium GlutaMAX^{TM} – z visoko vsebnostjo glukoze
DMPO = spinski lovilec 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksid
DMPO-O_2•$^-$ = DMPO-adukt superoksidnega radikala
DMPO-OH_2•$^-$ = DMPO-adukt hidroksilnega radikala
DMSO = topilo dimetil sufoksid
DOPC = lipid 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoholin
EPC = lipid 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-etilfosfoholin
EPR = elektronska paramagnetna/spinska resonanca
EtOH = etanol
FBS = fetalni goveji serum, ki v 70% vsebuje protein albumin
FMS = fluorescenčna mikrospektroskopija
FRET = Försterjev resonančni energijski transfer
G = prenos energije kot posledica molekularnega kontakta
GUV = orjaški enoslojni liposomi
HCl = klorovodikova kislina
I = jakost signala fluorescenčne svetlobe
I_0 = začetna jakost fluorescenčnega signala
I_M = jakost fluorescenčnega signala membranskega označevalca
I_{NC} =jakost fluorescenčnega signala ozančevalca, vezanega na nanocevke
I_W = oplaščenje nanocevk z lipidi (ang. wrapping)
J = gostota toplotnega toka [W/m^2]
IR = spektroskopija v infrardečem delu spektra
KOH = kalijev hidroksid
MTS =3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboskimetoksifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolium
NaOH = natrijev hidroksid
O^{2*} = singletni kisik

OH•	= hidroksilni radikal
PBS	= fosfatni pufer
PG	= lipid 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfo-[1-rac-glicerol]
ROS	= reaktivne kisikove zvrsti
STEM	= vrstična presevna mikroskopija
t_L	= čas osvetlitve vzorca
TEM	= transmisijski elektronski mikroskop
TiO2-NT	= nanomaterial titanovega oksida v obliki zvitka
w	= širina fluorescenčnega emisijskega spektra na polovični širini
UVA	= ultravijolična svetloba valovne dolžine 315–400 nm
UV-VIS	= spektroskopija v vidnem in ultravijoličnem spektru
λ	= valovna dolžina
λ_{max}	= lega vrha fluorescenčnega emisijskega spektra

1 Uvod

Dandanes se soočamo s številnimi nanomateriali, ki s svojo dimenzijo na nano-skali omogočajo povsem nove fizikalne, kemijske in mehanske lastnosti, ki jih do zdaj nismo poznali. Prav te lastnosti nanodelce determinirajo kot posebne in izjemno privlačne za uporabo v širokem spektru industrijskih panog, v medicini, prehrani, kozmetiki ter v svetu elektronike. Po drugi strani pa te iste lastnosti nanodelce v interakciji z biološkimi sistemi postavljajo v razred potencialno nevarnih materialov, saj njihova površina močno interagira z biološkimi molekulami[1]. Zato pričakovanja o možnih razsežnostih takih interakcij kot tudi neznane posledice motivirajo številne raziskovalne skupine, da bi čim prej razumeli interakcijo med nanodelci in biološkimi sistemi[3–5] in ovrednotili njihovo nanotoksičnost oziroma biokompatibilnost. Ker pa je področje nanoznanosti še vedno mlada veda, ki se izjemno hitro razvija, in so znanja o vplivu na organizem za zdaj še vedno zelo skopa, so vsake nadaljnje, poglobljene študije, ki v ospredje postavljajo varno uporabo nanodelcev, nujne.

1.1 Interakcije nanodelcev s celicami

V začetkih razmaha nano-področja je bilo večina raziskav interakcij nanodelcev in živih sistemov usmerjenih v razumevanje bio-fizikalno-kemijskih lastnosti[4,6,7] in vpliva velikosti, oblike in površinskega naboja. Zaradi pomanjkanja in omejenih eksperimentalnih metod je bilo težje spremljati dinamičen razvoj takšnih interakcij v realnem času. Zato so se študije večinoma omejile na samo opazovanje posledic interakcij v že fiksiranih vzorcih po nekem času[8].

Danes je dobro znano, da za razumevanje interakcij med nanodelci in celicami ni dovolj poznati le obliko, velikost, površinski naboj delca, ukrivljenost, hidrofobnost[4,9], ampak tudi lastnosti delca v trenutku, ko vstopi v kontakt z živim svetom[1,10,11]. Čeprav ta »biološka identiteta« temelji tudi na fizikalno-kemijskih lastnostih delca[12], pa je močno odvisna od biološke okolice, v kateri se nahaja[13]. Prva interakcija je torej kontakt nanodelca z biološkimi molekulami, plazemskimi proteini, ki vodi v formacijo »proteinske korone«. Takšna korona posameznemu delcu zniža prosto energijo in povečuje stabilnost[14,11,15,1,10]. Kinetika izmenjave posameznih vrst proteinov ter življenjski čas takšne vezave na korono določa kot »trdno« ali »mehko«[16,17], pri čemer poteka izmenjava močno vezanih molekul na urni časovni skali, šibko vezanih proteinov kot v primeru mehke korone pa na sekundni skali[11,14]. Tako kot sama identiteta proteinov tudi življenjski čas takšnega kompleksa določa, ali celični membranski receptorji tak kompleks lahko prepoznajo in omogočijo prehod v celico[8]. Poleg aktivacije nadzorovanega poti oplaščenega nanodelca pa korona hkrati še zmanjšuje vstop delcev v celico, kar se večinoma odraža v zmanjšani citotoksičnosti[18].

Neodvisno od vrste nanodelca in navkljub proteinskemu oplaščenju pa obstaja možnost, da bo ta kmalu podvržen znotrajcelični razgradnji, ki lahko izzove različne celične odzive. Morfološke spremembe celic se navadi raziskuje s svetlobnimi ali elektronskimi mikroskopi. Zelo priljubljeni so testi viabilnosti celičnih linij, ki jih predhodno tretiramo z nanodelci. Pri njih kolorimetrično merijo integriteto plazemske

membrane ali mitohondrijsko aktivnost kot posledico stresa. Z dodatnimi funkcionalnimi testi pa opredelijo tudi znotraj-celični oksidativni stres, celični vnetni odziv in genotoksičnost nanomateriala[19,20]. Še vedno velja, da je ob poplavi vrst nanodelcev zaželena standardizacija ocene citotoksičnosti, pri čemer pa ne smemo pozabiti, da poleg lastnosti nanodelcev na to vpliva tudi izbor celičnih linij ter izbira in način izvajanja testov[21].

1.2 Prehod nanodelcev skozi plazmalemo

Celična membrana, plazmalema, je dinamična struktura z vlogo regulacije vstopa majhnih in velikih molekul iz zunajceličnega okolja v celico in obratno. Prehod je lahko energijsko neodvisen (tako imenovani pasivni transport) ali energijsko odvisen (tako imenovani aktivni transport). Prvega poganja koncentracijski gradient in zniževanje proste energije, za delovanje drugega pa je potrebna energija. Majhne, relativno hidrofobne molekule, plini (O_2, CO_2), majhne polarne, a nenabite molekule (voda, etanol) lahko potujejo po zakonitostih difuzije, molekule kot so aminokisline, ioni in sladkorji potujejo skozi membrano preko proteinskih kanalčkov, ki so sestavni del membrane. Molekule, ki potujejo v nasprotni smeri koncentracijskega gradienta, prehajajo torej v energijsko neugodno smer, trasport je aktiven. Makromolekule pa navadno v celico prehajajo v procesu endocitoze, kjer prihaja do ukrivljanja same plazmaleme. Temu sledi odcepljanje vezikla, ki obdaja delec, v samo notranjost. Takšen prehod je prav tako aktiven prehod, potrebna je energija adenozin trifosfata (ATP)[22].

Endocitozo naprej bolj natančno delimo na fagocitozo, prehod velikih delcev, ter pinocitozo oziroma celično pitje, kjer lahko ločimo vsaj štiri različne mehanizme prehoda: makropinocitozo, od klatrina odvisno endocitozo, od kaveolina odvisno endocitozo ter od klatrina in od kaveolina neodvisno endocitozo. Vsi omenjeni tipi endocitoze so zelo regulirani procesi[23].

V skladu s pričakovano verjetnostjo oplaščenja se je večino študij v začetku usmerjalo v preučevanje posledic reguliranega prehoda nanodelcev skozi membrano celice. Te študije so ponudile precej nasprotujočih si rezultatov o vplivu velikosti delca, oblike, površinske kemije in naboja[9,24–26]. Glavni razlog je bil prav v nenadzorovanem vplivu proteinov in oplaščenja. Z zavedanjem pomena slednjega pa so raziskave začele slediti tudi razliki med prehodom oplaščenih in golih delcev, torej delcev brez proteinskega plašča. Tako so jasno ugotovili, da se oplaščen delec, ki vstopa v celico po poteh endocitoze, skoncentrira v lizosomih, kjer pa je njegov proteinski plašč zaradi izjemno nizkega pH in encimov podvržen razgradnji. Kislo »najedanje« se lahko nadaljuje tudi na sami površini delca in celo zmanjša radij delca. Zaradi najedanja pa se poveča verjetnost za neposredno interakcijo golih delcev s celičnimi strukturami, kar lahko poruši celično ravnovesje[2,20].

Nasprotno so zaradi manjše verjetnosti slabše preučevani prehodi nanodelcev po poteh, ki so neodvisne od mehanizma endocitoze. Pokazano je bilo, da lahko delci v celico vstopajo tudi pasivno[7,4,27–29]. Navadno so za takšne študije zaradi preproste sestave celic izbrane krvne celice[30], saj nimajo jedra in določenih celičnih organelov ter nimajo sposobnosti endocitoze[18]. Tudi te študije kažejo, da se delci, izpostavljeni mediju brez prisotnih serumskih proteinov, zaradi visoke reaktivnosti lahko oplaščijo že pred vstopom v celico. Oblečejo se s proteini citoskeleta in citosola, ki se izločajo v izvencelični medij, če teh ni oziroma jih je premalo, pa se oplaščijo z membranskimi proteini, včasih celo z lipidi[18]. Takšni delci prehajajo membrane hitreje oziroma se v opazovanem času bolj učinkovito akumulirajo znotraj celice, mesto lokacije po internalizaciji je drugačno kot v primeru predhodno proteinsko oplaščenih nanodelcev, delci se namreč lahko nahajajo tudi prosto v citosolu[18].

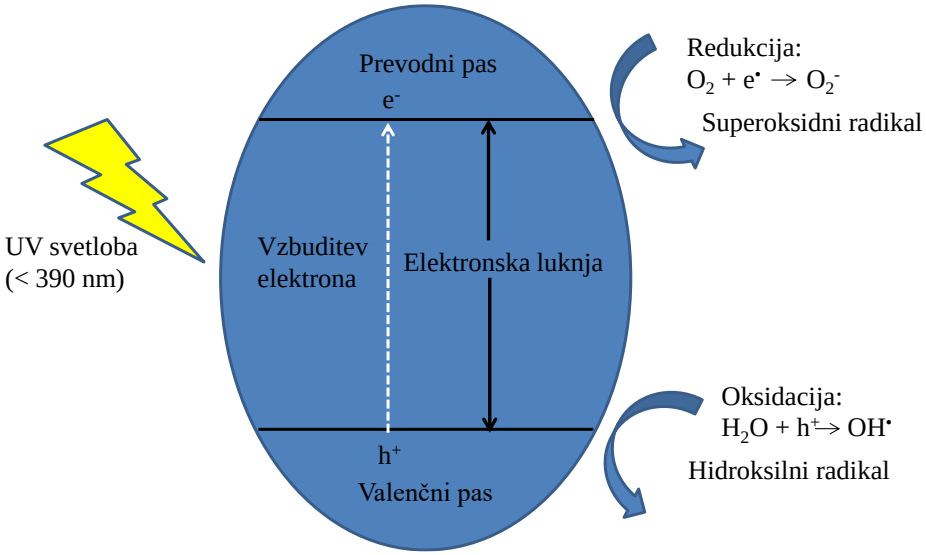
1.3 Lastnosti TiO_2 nanodelcev

Titanov dioksid, znan tudi kot titanov (IV) oksid, se nahaja v treh mineralnih oblikah: rutil, ki je najpogosteje zastopan (90%), anataz in brukit. Te oblike se razlikujejo v kristalni strukturi, ki jo lahko opišemo z nizom TiO_6 oktaedrov, kjer je vsak Ti^{4+} ion obdan s šestimi O^{2-} ioni. Rutilna oblika je posledica delitve robov oktaedrov, pri anatazu si oktaedri delijo kote, oktaedri brukita si delijo kote in robove. Posledično so rezultat tudi razlike v razdaljah med posameznimi Ti-Ti oziroma Ti-O atomi[31]. Različna pa ni le kristalna struktura, temveč tudi termodinamske lastnosti, v katerih izstopa rutil kot najstabilnejša oblika. Ob dovolj veliki temperaturi namreč tako anataz kot tudi brukit prehajata preko različnih stanj v končno obliko rutil, pri čemer so vse transformacije močno odvisne od velikosti delca[31].

Prah titanovega oksida je zaradi svojih lastnosti zelo priljubljen material, najpogosteje je uporabljen zaradi svojih optičnih lastnosti sipanja svetlobe ter visokega lomnega količnika v papirni, kozmetični ter barvni in prehrambni industriji. Različna izbira sinteznih metod pa ponuja širok nabor različnih TiO_2 nanostruktur, kot so nanozvitki, nanocevke, nanopalčke, nanofilmi, s tem pa seveda nove lastnosti, ki odpirajo nove uporabnosti. Trenutno med njimi prednjačijo aplikacije na področjih UV zaščite, fotovoltaike, fotokatalize pa tudi kozmetične[32], prehrambne industrije[33] in medicine.

Razlike v kristalni strukturi se odražajo tudi v elektronski strukturi TiO_2, saj velja, da je za prehod v vzbujeno (prevodno) stanje pri anatazu ter brukitu potrebno dovesti 3,2 eV, za rutil pa 3 eV. S prehodom elektrona iz valenčnega v prevodni pas pa ob prisotnosti vode omogočimo tudi začetek fotokatalize[34]. Čeprav za omenjene prehode potrebujemo svetlobo valovne dolžine, ki ustreza bližnjemu ultravijoličnemu delu spektra, pa ta priljubljena lastnost TiO_2, fotokataliza, širi uporabnost na področje antimikrobnih ukrepov, samočistilnih površin, čistilnih filtrov zraka ter celo za čiščenje odpadnih, onesnaženih voda[35,36].

Fotokataliza je namreč fotoelektrokemičen proces, pri katerem elektromagnetno valovanje z določeno valovno dolžino interagira s površino materiala, ki energijo lahko uporabi za nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Te lahko v nadaljevanju zaradi svoje visoke reaktivnosti reagirajo z okolico. Pri fotokatalizi hkrati potekata dve reakciji: prva vključuje oksidacijo vode, ki je adsorbirana na TiO_2 in je posledica fotoustvarjene luknje, druga pa vključuje redukcijo elektronskega receptorja, ki je navadno kisik in je posledica fotovzbujenega elektrona[36].



Slika 1: *Shema mehanizma fotokatalize TiO_2.* Povzeto po[36]. V TiO_2 po absorpciji energije fotona, ki je večja od 3,2 eV, elektron preide iz valenčnega v prevodni pas in ustvari par elektron-vrzel. Slednja interagirata z okolico: elektron reducira kisik v superoksidni radikal ali peroksid, fotoinducirana luknja pa oksidira vodo v hidroksilni radikal.

Z »dopiranjem« TiO_2 z različnimi kovinami in nekovinami se skušajo fotokatalitične lastnosti materiala prenesti še v vidni del spektra, s čimer bi se nabor aplikacij močno razširil, saj uporabnost ne bi bila več omejena le na območje vzbujanja z bližnjo UV svetlobo. Trenutno sta najbolj učinkoviti rešitvi »dopiranje« z dušikom in fluorom[35].

Zelo zanimiva ter s pridom izkoriščena lastnost tega materiala je tudi superhidrofilnost. Kapljica na površini, obdelani s TiO_2, namreč ob obsevanju z UV svetlobo spremeni kontaktni kot na 0°, kar pomeni, da površina hidrofobne lastnosti zamenja s hidrofilnimi. Ta lastnost širi meje uporabnosti predvsem na področja samočistilnih površin[35].

1.4 Toksičnost TiO_2

Vsekakor je pomembno, da se kljub tehnološki in ekonomski rasti, povezani z uporabnostjo nanomaterialov, zavedamo tudi potencialnih nevarnosti uporabe slednjih. Umetno narejen nanomaterial je v našem okolju nova snov, študije o njihovem vplivu na biološke sisteme pa še zdaleč niso dobro določene, so preveč ali premalo posplošene, predvsem se, tudi zaradi priganjanja financerjev raziskav, premalo pozornosti posveča raziskavam dolgotrajne izpostavljenosti nanomaterialu[37,38]. Vsekakor je potrebno priznati, da je vzpostavitev regulacije proizvodnje in uporabe nanomaterialov zaradi njihovih specifičnih lastnosti in izjemne kompleksnosti področja zelo težka[3] in hkrati zelo pomembna. Samo v Evropi smo namreč leta 2012 proizvedli oziroma (u)porabili kar 550 ton nano-TiO_2[39], torej več kot tono na prebivalca. Taka količina zagotovo ne more ostati brez svojega vpliva na biološke sisteme.

Toksični vpliv TiO_2 najprej spremlja vstop TiO_2 v človeka, ki poteka preko inhalacij, oralnega vnosa, dermalnega kontakta, intraperitonealnega ali intravenoznega vnosa. S transportom v krvni obtok nanodelci potencialno dosežejo poljubne organe oziroma tkiva v telesu, kjer se lahko kopičijo (jetra, ledvica, vranica, pljuča). Ko končno dosežejo celice, je njihov prehod preko membrane, pa naj bo aktiven ali pasiven prehod, odvisen tako od fizikalno-kemijskih lastnosti delca kot tudi od njihove »biološke identitete«. Določene raziskave so tako potrdile aktiven vstop TiO_2 delcev v celico ter kopičenje le teh v endosomih oziroma poznih lizosomih[37], druge pa tudi to, da tudi v rdeče krvničke, ki nimajo fagocitoznih receptorjev, vstopa TiO_2 velikosti pod 200 nm. Večji delci naj bi se kopičili na celični površini. Vstop naj bi bil v tem primeru energijsko neodvisen[40]. Z vstopom v celico je delcem torej odprta pot za interakcijo z določnimi organeli, receptorji, interagirajo lahko s proteini in posegajo v signalne poti. Nekatere raziskave tudi kažejo, da lahko TiO_2 vstopa celo v jedro, kjer lahko neposredno interagira z jedrnim materialom[41]. Dokazana je tudi vloga pri strjevanju krvi, nanocevke naj bi pospešile oziroma upočasnile tvorbo fibrinske mreže, odvisno od oblike delcev[42].

Toksičnost nanomateriala so Shi H. in sod.[43] glede na trajanje študije oziroma izpostavljenosti nanomaterialu razvrstili na akutno (do 14 dni), sub-akutno (do 4 tedne), sub-kronično (do 13 tednov) in kronično (od 4 mesecev naprej), vplive toksičnosti pa opredelili še glede na sistem, na katerem se študije izvajajo, torej *in vitro* in *in vivo* (zelo redke so študije na ljudeh). Kljub številnim študijam je posledice izpostavljenosti zelo težko posplošiti, saj so ugotovljene velike razlike v toksičnosti predvsem zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti samega materiala, ki so ključne za interakcijo s sistemom. Pomembno se je torej zavedati, da izbor sistema, s katerim interagira, igra pomembno vlogo pri

opredelitvi toksičnosti izbranega materiala.

Pri človeku je najpogostejši način vstopa inhalacija TiO_2, pri kateri gre najpogosteje za poklicno izpostavljenost. Pri testnih živalih je pljučni rak in vnetje pljuč najpogostejša opažena posledica izpostavljenosti. Če pa upoštevamo le poskuse, pri katerih so bile uporabljene bolj vsakdanje količine nanomateriala, je zaznati le vnetje pljuč. Najpogostejši način vstopa v organizem je preko adsorpcije v pljučih ali gastrointestinalnem traktu, čemur sledi pot po sistemskem obtoku in prerazporeditev v jetra, ledvici, vranico ali celo možgane. Stopnja takšne prerazporeditve še ni dobro ocenjena. Nekatere študije kažejo, da je prehod TiO_2 skozi nepoškodovano kožo nemogoč. Druge raziskave so identificirale možnost prehoda celo po poti kri-možgani, kri-testisi, kri-placenta. Čeprav so pri posameznih študijah opažene razmnoževalne ter razvojne spremembe, pa takšna opažanja niso bila potrjena na človeku. Ključne so predvsem raziskave, ki vključujejo dolgotrajno izpostavljenost TiO_2, torej sub-kronično oziroma kronično, kjer pa so bile opravljene poglobljene toksikokinetične raziskave, ki vključujejo informacije o adsorpciji, porazdelitvi, metabolizmu, kopičenju ter izločanju TiO_2 glede na različne vire izpostavljenosti. Vsekakor se še vedno kaže pomanjkanje študij, ki bi lahko bolj jasno podajala informacije, kaj nanomaterial, kot je TiO_2, pomeni za človeka[43].

1.5 Radikali in fototoksičnost

Številne raziskave kažejo, da nano-TiO_2 delci ob osvetlitvi z UV svetlobo povzročajo različne oksidativne celične poškodbe[44] in da je fototoksičnost rezultat eksogenih reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS), ki jih generira UV-vzbujen TiO_2 nanomaterial. Celica namreč vsebuje številne biomolekule, ki so tarča oksidacije številnih ROS molekul, kot so prosti radikali (hidroksilni radikali, superoksidni anion), vodikov peroksid in singletni kisik. Nukleinske kisline, nenasičene maščobne kisline ter aminokislinski ostanki, kot so metionin, histidin, cistein, tirozin in triptofan, so občutljivi na interakcijo z ROS molekulami[45]. Številne proteinske poškodbe so nepopravljive in imajo negativne posledice na proteinsko strukturo in njihovo delovanje. Ker so radikali kratkoživi, je učinek oziroma delovanje radikalov odvisen od razdalje fotoaktivnega materiala in celične/subcelične tarče.

Vse več raziskav potrjuje, da je ključni mehanizem toksičnosti TiO_2 ravno povečanje oksidativnega stresa (nad bazalno ravnjo), torej povečana produkcija ROS oziroma oksidativnih produktov, posledično tudi upad antioksidantov v celici. Povečan oksidativni stres pa ni le posledica UV fotoaktivacije samega TiO_2 materiala, pač pa tudi samega celičnega odziva zaradi citotoksičnosti oziroma genotoksičnosti materiala, čeprav je seveda odziv največji, ko je material fotoaktiviran[46]. Raziskave namreč kažejo, da že sam neobsevan TiO_2 povzroča oksidativne poškodbe. Če pa je material še fotoaktiviran, še dodatno znižuje celično viabilnost, povečuje možnost DNA prelomov oziroma oksidativnih poškodb samega dednega materiala. Fotoaktiven TiO_2 generira radikale, ki interagirajo z membranskimi lipidi, transmembranskimi proteini ali adhezijskimi proteini, s katerimi se pritrjuje celični citoskelet, kar v skrajni obliki vodi v izginotje aktinskih filamentov, izgubo celične mehanske trdote in strukturne integritete[47,48]. Ugotovili so tudi, da je najbolj toksična anatazna oblika TiO_2, kar naj bi bilo posledica največje energijske razlike med valenčnim in prevodnim pasom ter večje mobilnosti prenašalcev naboja[49]. Povečanje oksidativnega stresa pa lahko v primeru TiO_2 nanodelcev izvira tudi iz sproščanja ionov, ki interagirajo s celičnimi metabolnimi produkti, katerih rezultat so OH• radikali, krivci za nadaljnje celične poškodbe[50]. Znotrajcelična povišana količina ROS lahko tudi interferira s signalnimi potmi, ki nadzorujejo celično proliferacijo, vnetne procese ter končno celično smrt. ROS prav tako lahko vpliva na mitohondrije ter

endoplazmatski retikulum[51].

Raziskave fototoksičnosti titan oksidnih nanodelcev so torej usmerjene v razumevanje vpliva fizikalno-kemijskih lastnosti, kot so velikost[52,53], oblika[48,52] in kristaliničnost[52,54], na fototoksični izid. Nanocevke se izkažejo za manj fototoksične od sferičnih TiO_2 nanodelcev (P25), manjši je tudi njihov vpliv na celično morfologijo (brstenje membrane, spremembe citoskeleta)[48]. Če primerjamo delce enake oblike različnih velikosti, vidimo, da je fototoksičnost lastnost, ki je pri manjših delcih bolj izrazita, kar lahko razložimo s specifično površino delca, ki je pomembna za tvorbo radikalov. Dokazano je tudi, da je adsorpcija biomolekul na površino manjših delcev večja, posledica pa je večja citotoksičnost po sami fotoaktivaciji materiala[53]. Prav tako je dokazano, da je rutilna oziroma anataz-rutilna kristaliničnost manj fototoksična kot sama anatazna oblika[54]. Iz omenjenih *in vitro* raziskav je zanimivo tudi opažanje, da je pri nizki UV osvetlitvi vpliv fototoksičnosti na viabilnost celic primerljiv s toksičnim vplivom TiO_2 nanomaterala na samo viabilnost celic, gojenih v prisotnosti serumskih proteinov[54], in nasprotno, fotokativen nanomaterial v prisotnosti kožnih celic, gojenih v mediju brez seruma, kaže povečane fototoksične učinke na viabilnost celic v primerjavi s samo toksičnostjo[52].

2 Namen dela

Glede na nepopolno interakcijsko sliko TiO_2 nanodelcev in bioloških sistemov, ki je posledica številnih nasprotujočih si rezultatov različnih raziskav v preteklosti, smo v tem delu poskušali razjasniti mehanizem interakcij TiO_2 nanodelca, bolj natančno TiO_2 nanocevk in biološke membrane kot prve strukture, s katero se nanodelec sreča v stiku s celico, kot tudi vpliv bližnje UV svetlobe in biomolekul, kot so serumski proteini, na to interakcijo.

Glavni razlog za slabo razumevanje interakcij nanodelcev s celicami je vsekakor tesno povezan z lastnostmi materiala in fiziološkimi pogoji, v katerih je potrebno izvajati take študije. Spremljajo nas težave, ki jih pri raziskovanju interakcij klasičnih materialov s celicami ne srečamo. Prva med njimi je agregacija nanodelcev v raztopini, ki oteži samo raziskovanje. Nadalje nas spremljajo omejitve opazovanja zaradi velikosti delcev, saj metode z visoko ločljivostjo, kot so elektronske mikroskopije, ki sicer omogočajo ločevanje in opazovanje takih delcev, ne omogočajo pa opazovanja takih sistemov v interakciji z živimi sistemi, torej v fizioloških pogojih, v realnem času. Že sama priprava vzorca npr. zahteva fiksacijo in aplikacijo različnih nefizioloških pogojev (npr. vakuum ali nizka temperatura). Preostale metode, kot je npr. mikroskopija na atomsko silo, podajajo informacijo le s površine vzorca in ne »vidijo« v celico, številne spektroskopije pa ne podajo informacije o lokaciji interakcij. Šele razvoj mikrospektroskopij, kakršna je konfokalna fluorescenčna mikrospektroskopija (FMS), s kompleksno detekcijo in analizo omogoča spektroskopsko identifikacijo delcev, njihovo hkratno lokalizacijo znotraj celice na nivoju optične ločljivosti in vpogled v interakcije nanodelcev s strukturami živih celic. Pričujoče delo zatorej v veliki meri sloni na razvoju FMS, ki skupaj s posebnim fluorescenčnim označevanjem omogoča delo pri fizioloških pogojih z živimi celicami v 3D, je dovolj občutljivo in lahko razlikuje tudi med različnimi stopnjami agregacije nanomateriala kot tudi bližine nanomateriala in drugih označenih struktur, kar je zelo pomembno pri identifikaciji položaja nanodelcev v celici na molekularni skali.

Za študij interakcij smo izbrali široko uporaben in vsakodnevno zastopan nanomaterial iz titanovega oksida, bolj natančno TiO_2 nanocevke (TiO_2-NC). Material ima namreč zanimive tehnološke aplikacije (samočistilni in protimikrobni premazi, fotodinamične protitumorske terapije), zaradi česar je poznavanje toksičnosti še toliko bolj zaželjeno. Ker so TiO_2 nanodelci zanimivi torej tudi zaradi svoje fotokatalitske sposobnosti, nas je zanimalo, ali ob UV aktivaciji tvorjeni radikali, za katere je toksičen vpliv na mikroorganizme znan, kljub drugačni celični sestavi fototoksično delujejo tudi na evkariontsko celico. Bolj natančno, v okviru doktorskega dela nas je zanimalo, ali TiO_2-NC na modelno celično linijo MCF-7 delujejo fototoksično, kakšen je mehanizem fototoksičnosti kot tudi ali je izbrani nanomaterial potencialen kandidat v namen fotodinamične protitumorske terapije.

Eden od ciljev tega doktorskega dela je bilo tudi stabilno fluorescenčno označevanje nanocevk, brez katerega ne bi bili sposobni slediti TiO_2-NC ob prehodu v celico kot tudi ne njihovemu porazdeljevanju znotraj celice *in vitro* oziroma v interakciji z modelnimi lipidnimi membranami, liposomi, brez prisotnosti proteinov. FMS nam je omogočal preučiti dinamiko prehoda preko plazma membrane in dinamiko znotrajceličnega kopičenja, kljub temu da so delci manjši od optične ločljivosti mikroskopa. Želeli smo

okarakterizirati prehod tako posameznih cevk kot tudi agregatov ter preveriti, kako spreminjajoči površinski naboj na nanocevkah vpliva na samo interakcijo z membranami.

Glavne hipoteze dela so:

- Fotoaktivirane TiO_2-NC na modelne celice deluje citotoksično.
- TiO_2-NC lahko stabilno označimo s fluorescenčnim označevalcem.
- S fluorescenčno mikrospektroskopijo lahko nanodelce, manjše od optične ločljivosti, spektralno identificiramo znotraj celice *in vitro* s submikronsko-ločljivo lokalizacijo v realnem času.
- S fluorescenčno mikrospektroskopijo lahko spremljamo prehod TiO_2-NC preko celične membrane v realnem času.
- TiO_2-NC lahko interagirajo z modelno membrano neposredno, mimo interakcij, pri katerih sodelujejo proteini.
- Površinski naboj nanocevk vpliva na interakcijo s celično oziroma modelno membrano.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

Tabela 1: *Uporabljene kemikalije in materiali tekom raziskovalnega dela.*

Kemikalija ali material	Proizvajalec
Alexa 488	Life Tehnologies
APMS	Sigma
Bikarbonatni pufer	Alkaloid, Keramika
Bodipy530/550	Life Tehnologies
C6-NBD-PC	Avanti Polar Lipids
CellMask Orange Plasma membrane stain	Life Tehnologies
CellTiter 96®AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega
DEPMPO	Alexis, Lausen
Dializne kasete	Thermo Scientific
DMEM Glutamax	Gibco
DMEM without fenol red	Gibco
DMPO	Dojindo
DMSO	Sigma
EPC	Avanti Polar Lipids
DOPC	Avanti Polar Lipids
EtOH	Merck
FBS	PAA
HCl	Merck
KOH	Sigma
KBr	Sigma
Kristal vijolično	Sigma
Mikrotitrske plošče	TPP
Mitotracker®OrangeCMTRos	Life Tehnologies
NaOH	Sigma
PG	Sigma
PBS	Gibco
Penicilin/Streptomicin	Sigma
Posode za gojenje celic 75cm^2	TPP
Posodice za opazovanje na mikroskopu	Lab-Tek
P25	Evonik Degussa
Sljuda	Aldrich
Toluen	Merck
Tripan modro	Gibco
Tripsin EDTA	PAA

Tabela 2: *Raziskovalna oprema.*

Raziskovalna oprema	Proizvajalec
Analitska tehtnica	Mettler Toledo
Avtoklav	Kambič
EPR	Bruker
FMS	
Mikroskop	Nikon
Xe-Hg luč	Sutter Lamda, Novato
Širokopasovni filtri	BrightLine Semrock
Dvobarvna zrcala	BrightLine Semrock
LCTF	Varispec
EMCCD kamera	Andor
Inkubator	Binder
IR spektrofotometer	Perkin Elmer
Laminarij	Gelaire
Merilnik zeta potenciala	Brookhaven Instruments
Mikrotitrski čitalec	Tecan
pH meter	Mettler Toledo
Rentgenski difraktogram	Brucker
Rotavapor	Büchi
Sondni sonikator	Misonix
TEM	Jeol
Tristar 3000	Micromeritics Instrument Co.
UV-VIS	Perkin Elmer
Vodni sonikator	Branson

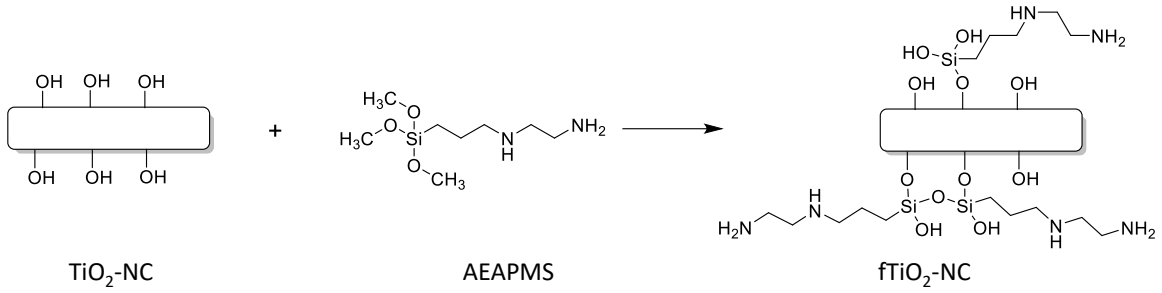
3.2 Metode

3.2.1 Sinteza nanocevk TiO_2

Izhodni material, katerega učinke na biološke sisteme smo preučevali v našem delu, so bile anatazne TiO_2 nanocevke (**TiO_2-NC**). Sintezna pot je splošno znana ter opisana v literaturi[55,56].

3.2.2 Funkcionalizacija površine TiO_2-NC

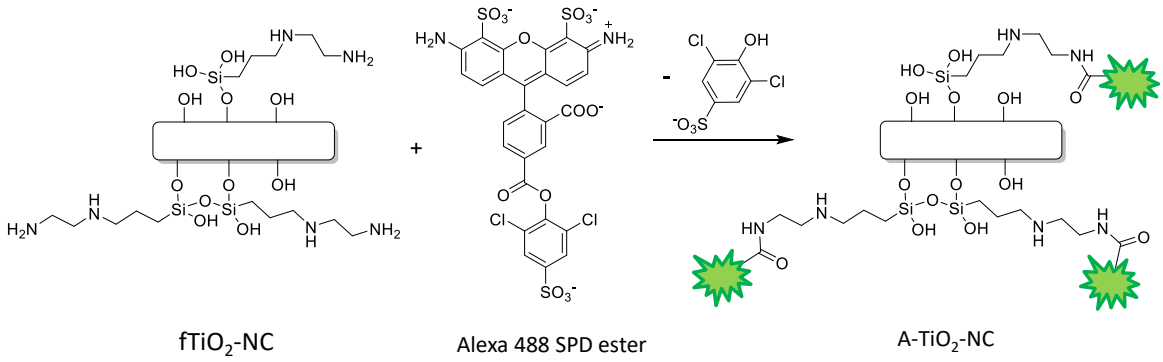
V nadaljevanju smo želeli površino nanocevk (slika 2) primerno "funkcionalizirati" za vezavo fluorescenčnega označevalca, saj bi nam to omogočilo preučevanje le-teh s fluorescenčno mikroskopijo oziroma spektroskopijo. Izbrali smo molekulo 3-(2-aminoetilamino)propiltrimetoksisilane (**AEAPMS**), ki se v primernih pogojih lahko kovalentno veže na samo površino TiO_2-NC, hkrati pa ostanejo proste amino skupine, potrebne za nadaljnjo vezavo z izbranim fluoroforom. Tako smo v 100 ml bučko zatehtali 50 mg TiO_2-NC in dodali 60 ml suhega toluena. Pripravljeno reakcijsko zmes smo v ultrazvočni kopeli sonicirali 20 minut in jo na oljni kopeli segreli na 60 °C. Tako pripravljeni reakcijski zmesi smo v 30 minutah v alikvotih po 500 µL dodali raztopino 840 µL AEAPMS v 6,2 mL suhega toluena. Po 16 h segrevanja smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo in trdno fazo s centrifugiranjem ločili od toluena. Usedlino smo 3x sprali z 10 mL etanola in jo sušili v vakuumskem sušilniku 10 h na 60 °C pri tlaku 200 mbar. Produkt smo označili z oznako **fTiO2-NC.**



Slika 2: *Reakcija funkcionalizacije površine TiO_2-NC z molekulo AEAPMS.*

3.2.3 Fluorescenčno označevanje fTiO$_2$-NC

Funkcionalizirane nanocevke fTiO$_2$-NC smo v nadaljevanju označili s fluorescenčnim označevalcem Alexa 488 SDP ester (slika 3): fTiO$_2$-NC smo z ultrazvočno konico razpršili v 0,1 M bikarbonantem pufru s pH = 8,4. Masna koncentracija fTiO$_2$-NC v pufru je bila 1 mg/mL. Čas sonikacije je bil 15 minut s 5 s delujočim in 2 s nedelujočim ritmom in amplitudo delovanja 70 (20–30 W moči). Reakcijsko zmes smo med soniciranjem hladili na ledeni kopeli. Po končanem soniciranju smo reakcijski zmesi dodali fluorofor Alexa 488 SDP ester, ki smo ga predhodno raztopili v DMSO. Pripravili smo dve vrsti nanocevk. TiO$_2$-NC z več vezanega fluorofora, v tem primeru smo reakcijski zmesi dodali 20 µl 12 mM fluorescenčnega označevalca in delce poimenovali **A$_{max}$-TiO$_2$-NC** oziroma 20 µl 1,2 mM fluorescenčnega označevalca, ko smo pripravili nanodelce z manj vezanega fluorofora ter jih poimenovali **A$_{min}$-TiO$_2$-NC**. Obe mešanici sta na ledeni kopeli mešali še 2 uri, nato pa še čez noč na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi.



Slika 3: *Reakcija vezave molekul fluorofora na spremenjeno površino fTiO$_2$-NC.*

3.2.4 Čiščenje vzorca

Nevezan fluorescenčni označevalec bi nas pri nadaljnjem delu lahko s svojim signalom motil, zato je fazi označevanja sledilo čiščenje vzorca. 3 ml označenih nanocevk s koncentracijo 1 mg/ml smo zaprli v dializno kaseto 10000 MWCO, potopljeno v liter EtOH. Izbor topila je temeljil na lastnosti dializne membrane ter lastnosti topnosti izbranega označevalca. Vsak naslednji dan smo EtOH zamenjali s svežim. Postopek dialize v EtOH je potekal 4 dni, 5. dan pa smo EtOH zamenjali z destilirano vodo. To nam je omogočilo, da smo vzorec ustrezno pripravili za delo v fizioloških pogojih. Uspešnost dialize smo spremljali s padcem jakosti fluorescenčnega signala dializatov. Na koncu smo z metodo UV-VIS spektroskopije ocenili tudi končno koncentracijo cevk v vzorcu. Očiščen vzorec, pripravljen za nadaljnje raziskovalno delo o interakcijah z membranami, smo razdelili na manjše alikvote in jih zamrznili do nadaljnje uporabe.

Obliko fluorescenčnega spektra ter jakost fluorescenčnega signala smo preverili na FMS sistemu tako, da smo vzorec predhodno 15 min sonicirali v vodni kopeli.

3.2.5 Karakterizacijske tehnike

3.2.5.1 Presevna in vrstična elektronska mikroskopija (TEM in SEM)

S presevnim elektronskim mikroskopom (Jeol 2100, 200 keV) smo določili obliko in velikost TiO_2-NC ter izmerili energijski disperzijski spekter (EDS). Vzorci so bili naneseni na ogljikove mrežice (lacy carbon film: 300 Mesh Cu) ter posušeni na zraku.

Na vrstičnem presevnem elektronskem mikroskopu, ki omogoča slikanje v temnem polju z obročastim detektorjem pod visokimi koti (STEM-HAADF), so bile opravljene meritve funkcionaliziranega vzorca, torej fTiO_2-NC, prav tako je bila narejena spektroskopija energijskih izgub elektronov (STEM-EELS), za ugotavljanje vrst prisotnih atomov (Nion U-STEM, 100 keV).

3.2.5.2 Praškovni difraktogram (XRD)

Praškovne difraktograme (XRD) TiO_2-NC smo posneli z rentgenskim difraktogramom Bruker AXS D4. Izvor rentgenske svetlobe je bila bakrena anoda (CuKα1) z valovno dolžino rentgenske svetlobe 1,5406 Å.

3.2.5.3 Specifična površina (BET)

Specifična površina našega nanomateriala je bila določena po BET metodi, s katero merimo število molekul dušika, ki se adsorbirajo na površino delca. Pri konstantni temperaturi iz spremembe tlaka določimo, koliko molekul se je vezalo na trdno površino. Specifična površina TiO_2-NC je bila pomerjena na Tristar 3000 avtomatskem plinskem analizatorju pri temperaturi -196 °C. Pred meritvijo je bil vzorec sušen v dinamičnem vakuumu pri 150 °C.

3.2.5.4 Infrardeča spektroskopija (IR)

Vezavo molekul AEAPMS na TiO_2-NC smo potrdili z infrardečo spektroskopijo v dveh načinih. Praškovne vzorce, torej TiO_2-NC ter fTiO_2-NC, smo pomerili v difuzni refleksiji (ang. DRIFT), ki je še posebej primerna za meritve prahov, infrardeči spekter tekočega silana pa smo pomerili tako, da smo na KBr tableto kanili kapljico izbranega silana ter pomerili infrardeči spekter. Spektre posameznih vzorcev smo primerjali med seboj s predhodno odštetim ozadjem. Rezultati so prikazani kot procent reflektance (DRIFT) oziroma prepustnosti (KBr) infrardečega žarka.

3.2.5.5 Zeta potencial (ζ)

Uspešnost označevanja TiO_2-NC smo preverili tudi z meritvijo elektrokinetične mobilnosti. Glede na vezavo AEAPMS molekul (ki nosijo prosto NH_3^+ reaktivno skupino) na samo površino TiO_2-NC kot tudi glede na vezavo Alexa 488 fluoroforov (ki nosijo 3 SO_3^- skupine) smo namreč pričakovali spremembo v samem neto površinskem naboju. Meritve vzorcev, TiO_2-NC, fTiO_2-NC, A_{min}-TiO_2-NC ter A_{max}-TiO_2-NC, razpršenih v vodi ter predhodno soniciranih v ultrazvočni kopeli za 15 min, so bile opravljene na merilniku zeta potenciala pri sobni temperaturi v odvisnosti od pH (dodajali smo 0,1 oz. 1 M HCl oziroma 0,1 oz. 1 M NaOH).

3.2.5.6 UV-VIS spektroskopija

Končno koncentracijo fluorescenčno označenih nanocevk (A-TiO_2-NC) smo določili na UV-VIS spektrofotometru. Vodno suspenzijo A-TiO_2-NC smo pred samo meritvijo

sonicirali v ultrazvočni kopeli, nato pa izmerili prepustnost pri 400 nm. Enako smo storili v primeru neoznačenih TiO_2-NC. Založno suspenzijo neoznačenih TiO_2-NC smo najprej sonicirali v ultrazvočni kopeli, nato pa redčili z destilirano vodo do želene končne koncentracije. Vsak vzorec smo pred meritvijo še enkrat sonicirali. Iz umeritvene krivulje smo ocenili končno koncentracijo fluorescenčno označenih nanocevk.

Iste meritve smo uporabili za ocenjevanje optičnih lastnosti suspenzije TiO_2-NC.

3.2.5.7 Fluorescenčna spektroskopija

Pripravili smo raztopino proste Alexe 488, Alexe 488, vezane na molekulo AEAPMS (Alexa-AEAPMS), ter fluorescenčno označene A_{max}-TiO_2-NC. Vsi trije vzorci so bili vodni vzorci, tako smo izključili, da bi bila sprememba v spektru posledica različne okolice, torej topila.

Vzorce smo nanesli na črno, mikrotitrsko ploščo s 96 luknjicami, vzbujali pri 480 nm ter beležili izsevani signal v območju od 500 do 660 nm v korakih 2 nm.

Želeli smo preveriti, ali se oblika spektra označenih nanocevk spreminja glede na vrednost pH. V ta namen smo večji količini fosfatnega pufra postopno nižali oziroma višali pH vrednost. Za to smo uporabili 0,1 M HCl oziroma 0,1 M NaOH. Vedno enako količino A_{max}-TiO_2-NC smo razpršili v pufru ustrezne pH vrednosti, prenesli na titrsko ploščo in pomerili spekter za nastavitvami, kot v zgornjem odstavku.

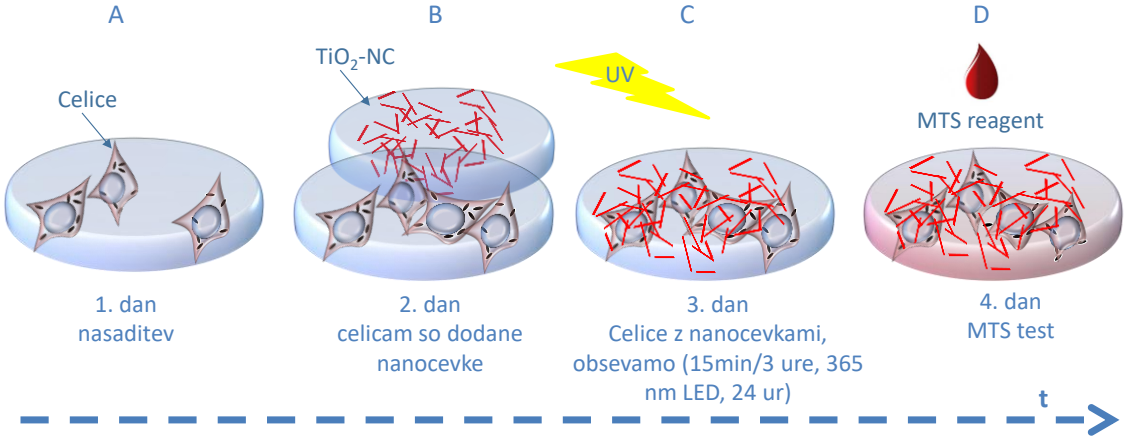
3.2.6 Preživetveni test MTS

Vsi celični poskusi so bili opravljeni z MCF-7 celično linijo adenokarcinoma dojke, kupljenega pri ATTC. Celice so bile vedno sveže odmrznjene ter gojene do tretje pasaže, nato pa uporabljene za sledeče poskuse.

Da bi preverili potencialno toksičen vpliv TiO_2-NC na celično linijo MCF-7, je bil narejen kolorimetrični preživetveni test MTS. Raztopina reagenta vsebuje tetrazolijevo sol (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij) ter intermediatni elektronski prenašalec (fenazin metosulfat (PMS)). MTS tetrazolijevo komponento metabolno aktivne celice reducirajo v barvni produkt formazan, topen v celičnem mediju. Bolj natančno, dehidrogenazni encimi katalizirajo NAD(P)H, prost elektron ob pomoči PMS pa reducira komponento MTS v formazan, produkt, ki močno absorbira pri 490 nm.

Prvi dan poskusa smo približno 5000 celic v celičnem mediju z 10 % FBS in 1 % antibiotikov nasadili v mikrotitsko ploščo s 96 luknjicami za gojenje celic (slika 4A). Naslednji dan smo 10 mg nanocevk razpršili v 1 ml 0,1 M KOH (pH11) z nizko ionsko jakostjo, sonicirali (15 min, 10 s pulz z močjo 20–30 W ter vmesnimi 5 s pavzami, T = 0 °C) ter avtoklavirali. Celice smo sprali s svežim PBS ter dodali enak volumen celičnega medija, ki smo mu predhodno že dodali nanocevke s končno koncentracijo 1, 5, 50, 100, 500 ali 1000 μg/ml (slika 4B). Kontrolni populaciji celic smo dodali enak volumen čistega KOH brez nanocevk. Sledila je enodnevna inkubacija. Tretji dan smo mikrotitrske plošče z nasajenimi celicami z materialom ali brez (kontrola) izpostavili UV svetlobi (365 nm, 15 min/3 ure, j=0,5 W/m2, A=15 m) do naslednjega dne (slika 4C) oziroma so bile inkubirane v popolni temi (kontrola). Četrti dan smo celicam dodali MTS reagent, ki je predstavljal 20 % celotnega volumna (slika 4D). Po 4 urah inkubacije z reagentom AQueous One Solution smo na spektrofluorimetru pri valovni dolžini 490 nm in referenčni valovni dolžini 670 nm izmerili absorbanco produkta. Hkrati smo izmerili vse potrebne kontrole, ki bi potencialno lahko prispevale k dobljenemu signalu (ozadje, same nanocevke v celičnem mediju z reagentom). Test je bil ponovljen najmanj 76x (pri visokih koncentracijah delcev) ter največ 126x (kontrolni vzorci), meritve so bile narejene v okviru 7 pasaž.

Izmerjena absorbanca je sorazmerna številu viabilnih celic v celični kulturi. Prikazani rezultati so normirani na kontrolo, torej na netretirane in neobsevane celice. Vsi rezultati so prikazani v obliki kvartilov, kjer črna črta označuje mediano vrednost MTS testa, rdeča črta pa povprečje. Drugi in tretji kvartil prikazujeta od 25 do 75 % podatkov, prvi in četrti pa območje med 10 in 90 %. Mejne vrednosti so prikazane kot črne pike. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili Mann-Whitney U statistični in ne t-test, saj le-ta zaradi log-porazdelitve (vpliv eksponentne rasti celic) ni bil mogoč.



Slika 4: *Shema poteka poskusa preživitvenega testa.*

3.2.7 Klonogenični test

Klonogenični test oziroma test tvorbe kolonij je *in vitro* test celičnega preživetja, ki temelji na sposobnosti posamezne celice, da se le-ta ob konstantnem dotoku hranil neštetokrat deli in zraste v kolonijo. Definicija kolonije v okviru tega testa obsega najmanj 50 celic. Če celice nasadimo dovolj redko, potem lahko trdimo, da vse celice posamezne kolonije izhajajo iz ene same matične celice. Klonogeničen test nam omogoča oceniti, koliko celic je ohranilo sposobnost deljenja (proliferacijski potencial »plating efficiency (PE)) glede na kontrolo, torej netretirane celice.

Prva faza poskusa je bila izvedena identično, ko smo opisali v točki 3.2.6., le da smo tokrat celice nasadili v 25 mm^2 gojitvene posodice. V vsako od štirih posodic smo nasadili 1,2 milijona celic, pri čemer drugi dan celic v dveh posodicah nismo tretirali z nanocevkami (kontrola), v drugi dve posodici pa smo celicam dodali nanocevke v celičnem mediju s končno koncentracijo 1000 µg/ml. Tretji dan smo eno od kontrolnih posodic ter eno posodico, v kateri so bile tretirane celice, izpostavili UV svetlobi (365 nm, 15 min na 3 ure, celokupen čas 24 ur). Ostali dve posodici smo do naslednjega dne inkubirali v popolni temi. Četrti dan smo namesto kolorimetričnega testa celice tripsinizirali, jih obarvali z barvilom Tripan modrim (volumsko razmerje 50 % barvila: 50 % celičnega vzorca, 3 min). Vzorec smo prenesli na hemocitomer ter prešteli število mrtvih in živih celic. Tako smo dobili informacijo o sami viabilnosti celic. Poskus je bil ponovljen 3-krat.

V nadaljevanju zgornjega poskusa smo na titrsko ploščo s šestimi bazenčki v vsak bazenček nasadili 100 celic v celičnem mediju z 10 % FBS, ki so bile predhodno različno tretirane (kontrola, kontrola + UV, TiO_2 brez UV, TiO_2 + UV). Plošče smo 14 dni inkubirali v inkubatorju, pri tem smo medij menjavali vsake 3 dni. Po 14 dneh smo kolonije obarvali s Kristal vijolično ter jih prešteli s pomočjo svetlobnega mikroskopa. Na koncu smo kolonije fiksirali z metanolom (-80 °C) za primer ponovnega štetja. Vzporedno je bilo enako narejeno za nasaditev z začetnim številom celic 200 in 300. Vse skupaj je bilo v poskus vključenih 12 plošč. Test je bil ponovljen 3-krat.

Statistika meritev je ob skupinah posameznih meritev prikazana v obliki kvartilov, kjer

drugi in tretji kvartil predstavljata 25–75 % podatkov, prvi in četrti kvartil pa območje 10–90 %, pike predstavljajo mejne vrednosti. Meja med belim in obarvanim delom predstavlja mediano, rdeča črta pa povprečno vrednost. Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili Mann-Whitney U statistični in ne t-test, saj le-ta zaradi log-porazdelitve (vpliv eksponentne rasti celic) ni bil mogoč.

3.2.8 Stabilnost suspenzije nanocevk

Da bi še bolje razumeli, kako se naše TiO_2-NC obnašajo v okolju, kot je celični medij, smo skušali oceniti njegovo stabilnost oziroma posedanje v celičnem mediju, ko so prisotni serumski proteini oziroma ko teh ni. Za ta namen smo uporabili metodo UV-VIS spektroskopijo, ki na principu prepustnosti jakosti svetlobe žarka, ki potuje skozi vzorec, v primerjavi z jakostjo svetlobe žarka, ki potuje neposredno na detektor, podaja informacijo v obliki prepustnosti svetlobe(T). Rezultat smo prikazali z absorbanco (A), pri čemer je A= -log (% T/100 %).

Posedanje smo ugotavljali pri dveh izbranih koncentracijah nanocevk, 100 μg/ml ter 1000 μg/ml. Založno suspenzijo nanocevk v KOH smo sonicirali s sondnim sonikatorjem z delujočim 5 s in nedelujočim 2 s ritmom, amplituda delovanja 70 (20–30 W moči) ter jih nato v brezbarvnem celičnem mediju z 10 % FBS ali brez razpršili do končne koncentracije. Svetlobno prepustnost suspenzije smo merili pri 400 nm 24 ur pri sobni temperaturi. Za meritev smo uporabili UV kivete (Brand, BrandTech Scientific) s širino 10 mm. Spektrom smo odšteli ozadje. Poskus je bil ponovljen 3-krat.

3.2.9 Vezava serumskih proteinov na TiO_2-NC

Dokazano je, da se nanodelci v bioloških medijih (plazma, serum) oplaščijo s proteini v tako imenovano »proteinsko korono«[1]. Takšen delec z novimi lastnostmi interagira npr. s celico. Adsorpcija proteinov na površino delca pa ni odvisna le od same površine delca, temveč od številnih sil, ki lahko nastopajo v sistemu (vodikove vezi, Van der Waalsove vezi, hidratacija …), torej je stopnja vezave oziroma razpadanje odvisno od lastnosti obeh sistemov. Obstajajo različne tehnike preučevanja omenjenih interakcij[57], v našem primeru pa smo za potrditev interakcije samih nanodelcev s serumskimi proteini preučevali s fluorescenčno spektroskopijo[58]. Na spektrofotometru smo merili spekter fluorescenčno označenih A_{max}-TiO_2-NC (100 ul, 1000 μg/ml), ki smo jim postopno dodajali vedno enak volumen (2 μl) serumskih proteinov (čisti FBS). Hkrati smo torej spremljali signal fluorescence proteinov oziroma aminokislin, ki so osnovni gradniki proteinov. Pri tem naj izpostavim, da le tri aminokisline (triptofan, fenilalanin in tirozin), katerih strukturne komponente so aromatski obroči, fluorescirajo. V primeru interakcije smo pričakovali spremembo v fluorescenčnem spektru pri enem ali drugem udeležencu[59].

Za meritev smo uporabili črno mikrotitsko ploščo s 96 luknjicami ter v vsakem koraku vzorec vzbujali z 250 nm valovne dolžine in beležili spektralno spremembo posnetega spektra v območju od 280–660 nm valovne dolžine. Titracija je potekala do končnega volumna 150 μl. Pri obdelavi dobljenih rezultatov smo upoštevali rečitveni koeficient.

Naredili smo tudi kontrolni poskus, tako da smo pri istih pogojih in nastavitvah serumske proteine dodajali prostemu fluoroforu Alexa 488 (0,6 μM), torej v odsotnosti nanocevk. Prikazani rezultat je povprečje dveh neodvisnih meritev.

3.2.10 Fotokatalitična aktivnost TiO_2-NC

V preteklosti je že bilo dokazano, da TiO_2 nanodelci ob prisotnosti UV svetlobe tvorijo

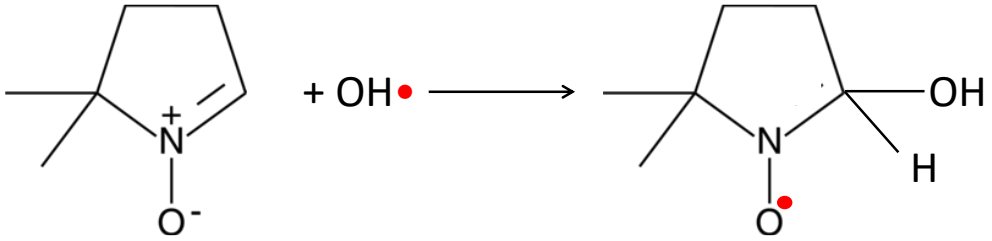
kratkožive kisikove radikale, ki so zelo reaktivni, imajo pomembno vlogo v fotokatalizi, hkrati pa so lahko zelo škodljivi za same celice[54]. Fotoaktivnost TiO_2-NC smo preučevali z metodo elektronske paramagnetne resonance (EPR). Metoda je občutljiva na paramagnetne centre v preučevanem vzorcu in je zaradi svoje občutljivosti primerna za kompleksne sisteme. Te centre, proste elektrone, lahko zaznamo zaradi prehoda le-teh z enega energijskega nivoja na drugega, ko jih obsevamo z elektromagnetnim valovanjem v mikrovalovnem področju. Stanja so navadno zelo kratkoživa in hitro reagirajo z okolico, tako da njihovo sledljivost podaljšamo z dodanimi nitronskimi spinskimi lovilci. Ti se kovalentno vežejo na molekulo s prostim elektronom, pri tem pa nastane spinski adukt, ki je dovolj dolgoživ radikal (nitroksid), da lahko njegov spekter zajamemo z EPR spektroskopijo.

Za oceno uspešnosti fotokatalize sintetiziranih TiO_2-NC ter za primerjavo z "zlatim standardom" fotokatalize, torej s P25 nanodelci (Evonik Degussa), smo izmerili fotokatalizno aktivnost TiO_2-NC oziroma P25 v odvisnosti od valovne dolžine. Za beleženje tvorbe kratkoživih radikalov smo uporabili spinski lovilec 5-(dietoksifosforil)-5-metil-1-pirolin-N-oksid (DEPMPO), ki ga predhodno nismo čistili, hranili pa smo ga na -80 °C. Da bi izključili napačno razlago detektiranih radikalov, ki bi bili lahko posledica nestabilnosti spinskega lovilca ali posledica kakšne druge reakcije, smo meritve izvedli v prisotnosti 30 % etanola (v/v). Etanol namreč ulovljeni hidroksilni radikal pretvori v etilni radikal, tako da namesto DEPMPO-OH adukta beležimo adukt etilnega radikala[60].

Založno suspenzijo TiO_2-NC oziroma P25 smo razpršili v 0,1 M KOH, sonicirali s sondnim sonikatorjem 15 min (10 s pulz on, 10 s pulz off, moč 30 W). Končni koncentraciji 1000 μ/ml nanodelcev smo dodali 2 % (v/v) spinskega lovilca, mešanico odpipetirali na ploščico iz polietilen teleftalata (PET) ter vzorec 5 min obsevali z izbrano UV diodo izbrane valovne dolžine (λ = 300–490 nm, t = 5 min, j = 0,5 W/m^2, A = 15 mJ). Med obsevanjem je bila dioda od vzorca oddaljena 1 do 2 mm. Takoj po obsevanju smo vzorec posrkali v kapilaro ter izmerili EPR signal na EPR spektrometru.

3.2.11 Fotokatalitična aktivnost TiO_2-NC v celičnem mediju

Fotoaktivnost izbranih TiO_2-NC smo želeli preveriti v pogojih, enakih celičnemu poskusu. V tem primeru smo za detekcijo fotoaktivnosti uporabili spinski lovilec 5,5-dimetil-1-pirolin N-oksid (DMPO) (slika 5).



Slika 5: *Reakcija spinskega lovilca DMPO s hidroksilnim radikalom.* Rezultat je spinski adukt, DMPO-OH•, ki ga lahko zaznamo s tehniko elektronske paramagnetne resonance.

Sam nanomaterial smo pripravili identično kot v primeru celičnega poskusa. Založno koncentracijo nanocevk smo pred izvajanjem poskusa sonicirali, nato pa

a) razpršili v celičnem mediju z 10 % do končne koncentracije 1000 μg/ml
   a1) takoj dodali 20 % v/v 1M spinskega lovilca DMPO, vzorec prenesli na predhodno očiščeno polietilensko ploščico ter kapljico 5 min obsevali z UV LED diodo (365 nm, 5 min, j=0,5 W/m^2, A=15 mJ) tik nad površino vzorca, nato pa vzorec takoj posrkali v stekleno kapilaro in jo vstavili v EPR resonator, ki smo ga že uglasili s kontrolnim vzorcem

a2) ter eno uro inkubirali v temi, nato dodali 20 % v/v 1 M spinskega lovilca DMPO, vzorec prenesli na predhodno očiščeno polietilensko ploščico ter kapljico 5 min obsevali z UV LED diodo 365 nm, nato pa vzorec takoj posrkali v stekleno kapilaro in jo vstavili v EPR resonator

b) razpršili v celičnem mediju brez prisotnosti seruma do končne koncentracije 1000 μg/ml

b1) takoj dodali 20 % v/v 1 M spinskega lovilca DMPO, vzorec prenesli na predhodno očiščeno polietilensko ploščico ter kapljico 5 min obsevali z UV LED diodo 365 nm, nato pa vzorec takoj posrkali v stekleno kapilaro in jo vstavili v EPR resonator, ki smo ga že uglasili s kontrolnim vzorcem

b2) ter eno uro inkubirali v temi, nato dodali 20 % v/v 1 M spinskega lovilca DMPO, vzorec prenesli na predhodno očiščeno polietilensko ploščico ter kapljico 5 min obsevali z UV LED diodo 365 nm, nato pa vzorec takoj posrkali v stekleno kapilaro in jo vstavili v EPR resonator.

Spremljali smo signal DMPO-OH• adukta, pokazatelj hidroksilnih radikalov (OH•), dobljeni signal pa lahko nastane tudi kot posledica interakcije DMPO in superoksida (DMPO-O_2•$^-$), ki v nadaljevanju spontano razpade v že omenjeni radikal DMPO-OH•. Ker superoksid prav tako nastane kot posledica fotokatalitične aktivnosti TiO_2-NT, njegovega prispevka ne štejemo za napako.

Vsi vzorci so bili posneti pri sobni temperaturi, pri nastavitvah spektrometra: modulacijska amplituda 0,15 mT, modulacijska frekvenca 100 kHz, 20 mW mikrovalovne moči, širine črte 10 mT, s pozicijo centra pri 332 mT. Spektri so bili simulirani z EPRSim programsko opremo, konstanta hiperfinega razcepa: A_N = 1,49 mT in A_H = 1,49 mT, tipično za DMPO-OH adukt. Intenzitete EPR spektra podaja torej količino tvorjenih radikalov. Vsak vzorec je imel 10 ponovitev, rezultati pa so prikazani kot povprečje višine vrhov posameznih meritev ter normirani na najvišje dobljeni signal.



Slika 6: EPR spektrometer, Bruker ELEXSYS E500.

3.2.12 Priprava neoznačenih TiO_2-NC za celične poskuse

10 mg prahu TiO_2-NC smo s sondnim sonikatorjem razpršili v 1 ml 0,1 M KOH (15 min, 10 s pulz z močjo 20–30 W ter vmesnimi 5 s pavzami, T = 0 °C) ter avtoklavirali.

3.2.13 Priprava orjaških liposomov za preučevanje interakcije z označenimi nanocevkami

Orjaške liposome (ang. giant unilamelar vesicle – GUV) smo pripravili po metodi nežne kopeli (ang. gentle hydration)[61,62]. Liposome smo pripravili v dveh različicah. V vseh primerih smo osnovnemu lipidu, DOPC, primešali nabiti lipid DPPG, ki daje dvosloju naboj in pomaga pri tvorbi enoplastnih liposomov. V prvem primeru smo DOPC fosfolipidu, raztopljenemu v mešanici kloroform in metanol (v razmerju 7:3), v množinskem razmerju 90:10 primešali negativni lipid DPPG, prav tako raztopljen v mešanici kloroform in metanol. Te liposome smo poimenovali GUV10. V drugem primeru smo množinsko razmerje negativnega lipida povečali na 50:50 in liposome poimenovali GUV50. V obeh primerih smo lipidni mešanici dodali fluorescenčni lipidni analog Bodipy v množinskem razmerju 1:200 (1 fluorescenčni lipidni analog proti 200 ostalim lipidom).

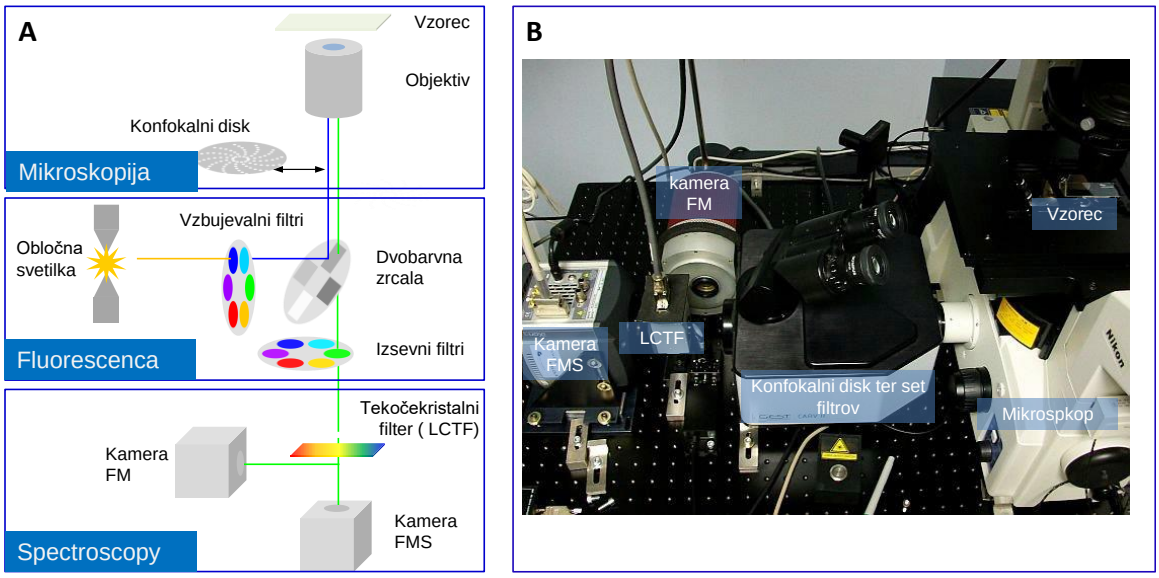
Organska topila smo v prvi fazi izparili z vrtečim rotavaporjem pri temperaturi 60 °C. Temu je sledila še faza izparevanja na vakuumski črpalki, ki je trajala še nadaljnji 2 uri. Tako je na stenah epruvete nastal tanek film lipidov, ki smo ga najprej v vlažnem ozračju pri 60 °C hidrirali, nato pa zalili z 1,5 ml destilirane vode. Takšen vzorec smo preko noči pustili hidrirati v kopelki pri 60 °C. Ta faza je pomembna za nastanek liposomov, saj le-ti nastanejo z luščenjem lipidov s stene. Končna koncentracija lipidov je 30 μM. Naj opozorim, da pri takšni metodi poleg orjaških liposomov seveda hkrati nastajajo tudi zelo majhni liposomi, ki prav tako prispevajo k signalu celotne slike, ne vplivajo pa na samo razlago mikrospektroskopskih rezultatov.

Naslednji dan smo ohlajene vzorce prenesli v stekleno vijalo ter jih še isti dan uporabili za nadaljnje poskuse. Posameznega vzorca, hranjenega v hladilniku, nismo uporabljali dlje kot teden dni.

3.2.14 FRET FMS eksperimenti

3.2.14.1 Zgradba FMS sistema

Fluorescenčni mikrospektrometer (slika 7) je sistem z vsemi elementi klasične fluorescenčne mikroskopije z nadgradnjo dodane spektroskopije. Hibrid nam v takšni obliki omogoča v vsaki točki vidnega polja zajemanje izsevanega fluorescenčnega spektra, komponenta mikroskopije pa nam hkrati z mikrometrsko natančnostjo podaja tudi krajevno informacijo. Obliko fluorescenčnega spektra pridobimo z zaporednim snemanjem slik pri različnih valovnih dolžinah na način, da izvorna svetloba potuje preko širokopasovnega vzbujevalnega filtra in dvobarvnega zrcala na vzorec, označen s fluorescenčnimi molekulami. Tu fluorescenčna molekula absorbira svetlobo izbrane valovne dolžine, rezultat je izsevana svetloba višje valovne dolžine zaradi Stokesovega premika. Ta preko dvobarvnega zrcala in skozi izbrani izsevni filter potuje na detektor, v našem primeru na EMCCD kamero. Preden izsevana svetloba doseže detektor, jo filtriramo s tekočekristalnim filtrom, ki prepušča le ozek pas izsevane svetlobe z določeno valovno dolžino. Takšen sistem nam omogoča določitev spektralnega vrha z natančnostjo 1 nm[63,64].



Slika 7: *A)Shema ter B)fotografija FMS sistem*. V obeh primerih označeni glavni sestavni deli sistema.

3.2.14.2 Interakcija MCF-7 celic z označenimi nanocevkami A-TiO_2-NC

MCF-7 celice smo v celičnem mediju ter v prisotnosti 10 % FBS ter 1 % antibiotikov nagojili v bazenčke, namenjene za opazovanje celic s svetlobnim mikroskopom ter pustili rasti čez noč v inkubatorju (37 °C, 5 % CO_2). Naslednji dan smo tik pred meritvami celicam zamenjali celični medij z medijem (brez komponente fenol rdeče) v prisotnosti 10 % FBS. Na fluorescenčnem mikrospektrometru pri sobni temperaturi smo posneli osnovno stanje, torej signal avtofluorescence, nato pa dodali 30 µg/ml A-TiO_2-NC. Te smo predhodne odmrznili ter 15 minut sonicirali v ultrazvočni kopeli. Takoj po dodatku nanocevk celičnemu vzorcu smo s časom beležili signal, tako v načinu mikroskopije kot mikrospektroskopije. Za vzbujanje vezanega fluorofora na nanocevkah, torej Alexo 488, smo uporabili širokopasovni filter 430–490 nm, dvobarvno zrcalo 495 nm ter merili izsevano svetlobo v območju med 506–594 nm/ 2 nm koraki.

V nekaterih poskusih smo pred dodatkom nanocevk za natančno določitev celične plazmaleme z membranskim označevalcem CellMask Orange® le-to fluorescenčno označili. Založno raztopino smo v celičnem mediju raztopili do končne koncentracije 1,56 µM, inkubirali približno 5 min v inkubatorju, sprali s svežim medijem, nato pa dodali fluorescenčno označene A-TiO_2-NC v brezbarvnem mediju z 10 % FBS. Nanocevke smo v nadaljevanju inkubirali 10 min, nato vzorec ponovno sprali ter merili mikrospektroskopske lastnosti vzorca pri sobni temperaturi. Tudi v tem primeru je bil izbor filtrov identičen zgornjemu.

3.2.14.3 Interakcija neoznačenih TiO_2-NC z MCF-7 celicami

MCF-7 celice smo v celičnem mediju ter v prisotnosti 10 % FBS ter 1 % antibiotikov nagojili v bazenčkih, namenjenih za opazovanje celic s svetlobnim mikroskopom, ter pustili rasti čez noč v inkubatorju (37 °C, 5% CO_2). Naslednji dan smo celice sprali s svežim, temperiranim PBS pufrom ter celice naslednja dva dneva tretirali s 1000 µg/ml TiO_2-NC v celičnem mediju brez prisotnosti FBS. Hkrati smo izvedli kontrolni poskus, celicam nismo dodali nanomateriala, smo pa po enakem postopku obogaten medij zamenjali z medijem brez prisotnosti FBS.

Za identifikacijo aktivnih mitohondrijev smo tretjino celičnega medija izmenjali s svežim PBS, v katerem je bil predhodno raztopljen fluorescenčni označevalec Mitotracker®OrangeCMTRos v nanomolarni delovni koncentraciji. Vzorec smo 15 min

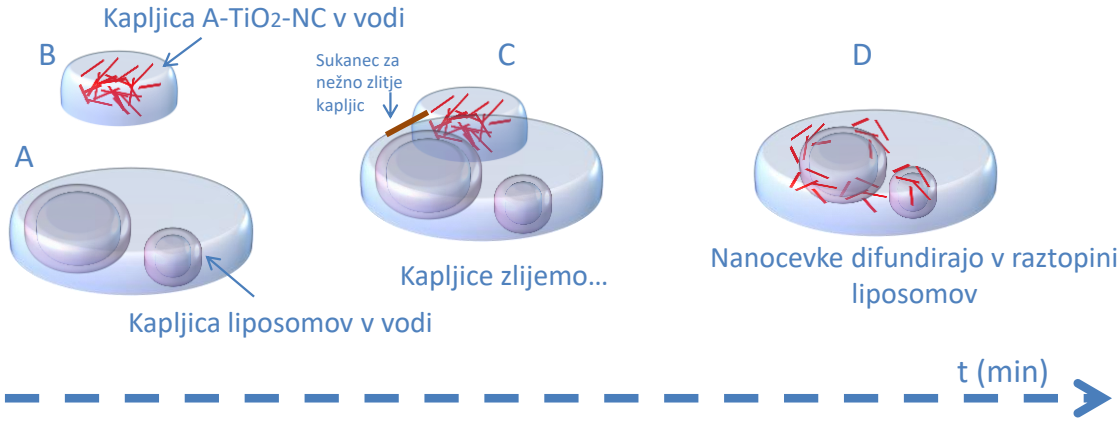
inkubirali v inkubatorju. Tik pred meritvijo na mikrospektrometru smo tretjino medija-PBS izmenjali s svežim, predhodno pogretim PBS, v katerem smo raztopili membranski označevalec 6-NBD-PC v mikromolarni delovni koncentraciji. Fluorescenčne mikrospektroskopske posnetke smo dobili tako, da smo vzorec najprej vzbujali s setom širokopasovnih filtrov, izbranim tako, da čim bolj učinkovito vzbujajo fluorescenčni označevalec Mitotracker Orange, hkrati pa čim manj membranski označevalec 6-NBD-PC (vzbujanje 468–552 nm, dvobarvno zrcalo 560 nm, izsevana svetloba 565–605 nm), saj je za slednjega značilno bledenje fluorescenčnega signala. Brez premikanja vzorca v smeri xyz smo z izborom širokopasovnega seta filtrov (vzbujanje 430–490 nm, dvobarvno zrcalo 495 nm ter izsevana svetloba 506–594 nm) posneli še signal membranskega označevalca. Kasneje smo z uporabo programa ImageJ mikroskopske slike iz iste lokacije združili v eno.

3.2.14.4 Interakcija fluorescenčno označenih A-TiO_2-NC z liposomi (FRET FMS poskusi)

Kapljico 10 x redčenih GUV liposomov (GUV10 ali GUV 50) (slika 8A) s končno koncentracijo 3 µg/ml smo kanili v rob bazenčka, ki je v osnovi namenjen mikroskopiranju celičnih vzorcev. Na drugi konec bazenčka smo kanili majhno kapljico 10 x redčenih, fluorescenčno označenih nanocevk A_{min}-TiO_2-NC oziroma A_{max}-TiO_2-NC (slika 8B). Nato smo sukanec, omočen z vodo, položili med obe kapljici tako, da je bil leta že v samem začetku staknjen z liposomsko kapljico. V vodi potopljen objektiv 60x povečave smo uporabili za opazovanje našega vzorca. Na robu kapljice smo poiskali čim večji, brez notranjih vključkov, osamljen liposom. Oddaljen rob kapljice smo izbrali zato, da bi se liposom zaradi toka ob stiku kapljic čim manj premikal, kar je zelo pomembno pri našem načinu dolgotrajnega opazovanja istega liposoma, poleg tega pa smo pri obdelavi slik potrebovali tudi del slike, ki služi kot ozadje. Nato smo vzorec vzbujali s širokopasovnim filtrom 430–490 nm, dvobarvno zrcalo 495 nm ter zbirali izsevano svetlobo iz vzorca v območju 515 do 580 nm, stohastično v ozkih korakih po 5 nm.

Nato smo kapljico označenih nanodelcev previdno s pomočjo sukanca zlili z liposomsko kapljico (slika 8C). Takšen vzorec smo v 5 min intervalih snemali v spektralnem načinu. V tem času sta se vodna vzorca mešala in navadno smo v času 1 ure zabeležili, da je signal nanodelcev v okolici opazovanega liposoma ustaljen in se ne spreminja več. Končna koncentracija nanocevk po zlitju je bila okoli 3 µg/ml (slika 8D).

Izbrani način snemanja je bila torej mikrospektroskopija, saj nam poleg klasične mikroskopije, ki podaja krajevno informacijo z natančnostjo na mikrometrski skali, omogoči, da v vsaki točki vidnega polja izmerimo tudi obliko izsevane svetlobe. Tako je rezultat poleg slike, ki je kodirana z jakostjo signala, tudi spektralna informacija, ki je občutljiva na nanometrski skali[63]. Natančna analiza vzorca, ki je sledila, je opisana v nadaljevanju.



Slika 8: *Shema poskusa interakcije nanodelcev z liposomi.*

3.2.14.5 Kontrolni poskusi

Glede na lastnost bledenja izbranega membranskega fluorofora, Bodipy 530/550, so bili potrebni kontrolni poskusi. Kapljico 10x redčenih liposomov s končno koncentracijo 3 μg/ml v destilirani vodi smo kanili na rob bazenčka, ki je primarno namenjen za gojenje in opazovanje celic z optičnim mikroskopom. V fluorescenčnem načinu smo na robu kapljice poiskali osamljen čim večji liposom, po možnosti brez vključenih manjših liposomov.

Snemanje je potekalo z identičnimi nastavitvami kot v točki 3.2.14.4. V začetnih poskusih smo snemali v 5 min intervalih s celokupnim časom 1 ure, kasneje pa smo referenčne poskuse časovno optimizirali tako, da smo vmesni čas čakanja v temi skrajšali na nekaj sekund, saj smo ocenili, da sama vmesna faza čakanja v temi ne vpliva na samo intenziteto izsevane svetlobe. Sama analiza referenčnih poskusov je opisana v nadaljevanju.

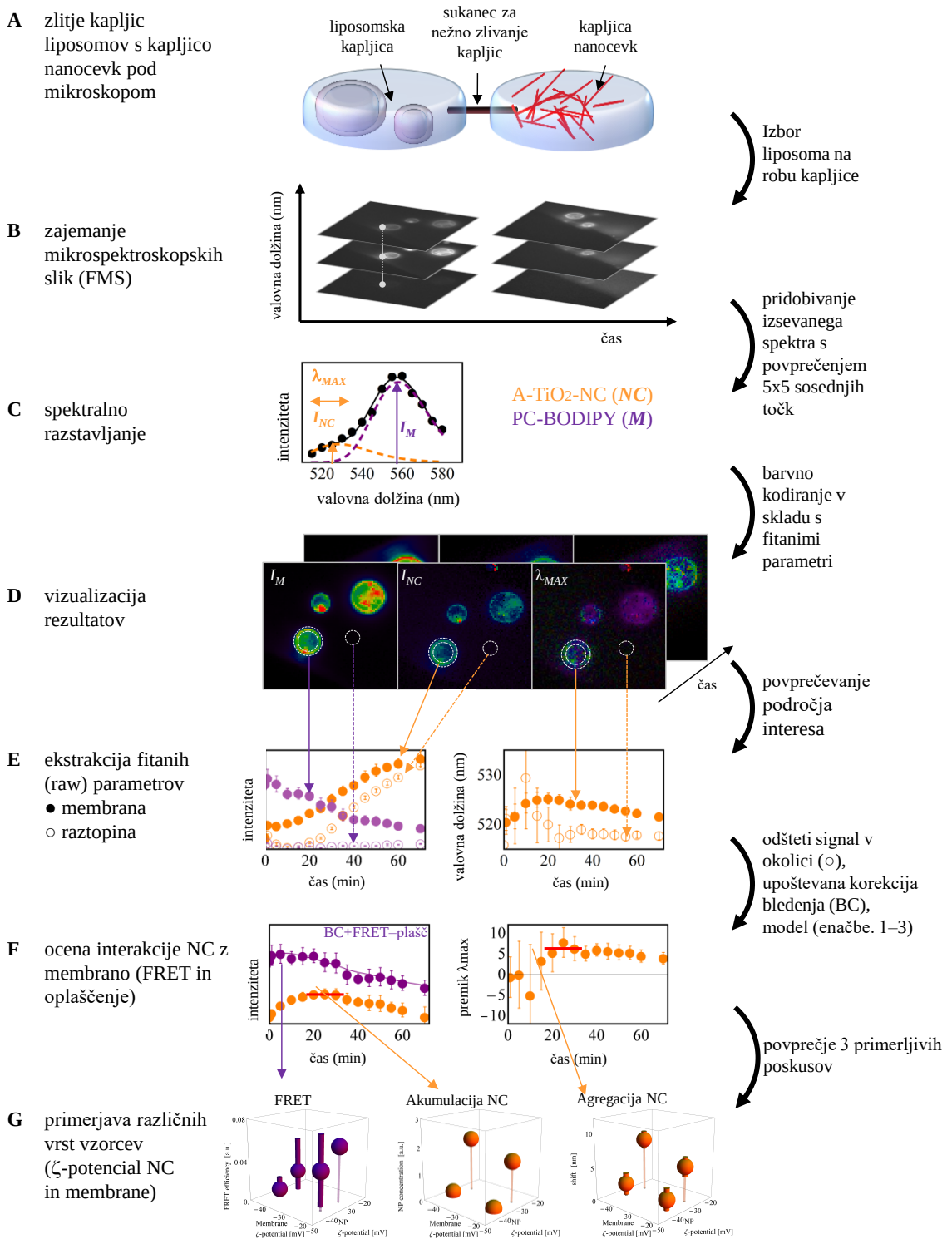
3.2.14.6 FMS analiza slik

Med celotnim potekom poskusa smo na vsakih nekaj minut posneli spektralni niz slik (slika 9B), iz katerega smo v vsaki točki vidnega polja določili spekter izsevane fluorescenčne svetlobe (slika 9C). Podatkom smo najprej odšteli t. i. "temni signal" kamere (tj. signal neosvetljene slike z istimi nastavitvami), nato pa smo spektre popravili glede na prepustnost LCFT pri določenih λ. V nadaljevanju smo signalu po celotni sliki odšteli spekter sipane svetlobe ozadja, ki smo ga določili na isti sliki v neposredni bližini kapljice z vzorcem. Da smo si zagotovili dovolj ugodno razmerje med signalom in šumom za nadaljnjo spektralno analizo, smo sliko analizirali s povprečevanjem 5x5 sosednjih točk.

Vsak spekter smo v nadaljevanju razstavili na dve komponenti (slika 9B) (t. i. "linear unmixing"): na komponento barvila nanocevk (A-TiO_2-NC) ter na komponento membranskega barvila (PC-Bodipy) (slika 9C). Parametre spektralne oblike vsakega označevalca glede na naš model logaritemsko-normalne spektralne porazdelitve [64] smo določili iz ločenih meritev FMS kontrolnih vzorcev (A-TiO_2-NC: širina w = 34 nm, nesimetričnost a = 0,13; PC-Bodipy: položaj spektralnega vrha λmax = 558 nm, w = 32, a = 0,09). Določanje lege spektralnega vrha (λmax) Alexe 488, ki se je med poskusi spreminjala zaradi kopičenja nanodelcev na/v membrani, smo prepustili spektralni optimizaciji. Hkrati smo algoritmu dopustili spreminjanje parametra, ki opisuje hitrost bledenja (b) membranskega fluorescenčnega označevalca, ki pa je v večini primerov le malo vplivalo na obliko izmerjenega spektra[64].

Spektralni analizi celotnega vidnega polja vsake FMS meritve (slika 9D) je sledil zajem signala po obodu liposoma (slika 9E). Spektralne parametre po obodu smo najprej povprečili (I_M - jakost membranskega označevalca PC-Bodipy, I_{NC} - jakost A-TiO_2-NC, λmax – položaj spektralnega vrha A-TiO_2-NC).

Jakost interakcije nanocevk z opazovanim liposomom smo nato ocenjevali iz časovnega poteka sprememb spektralnih parametrov v primerjavi s parametri, merjenimi v neposredni okolici opazovanega liposoma celotne časovne serije (slika 9F, ΔI_M, ΔI_{NC} ter Δλmax).



Slika 9: *Pregled metodologije*. Kratek opis in shematski prikaz ključnih korakov: A) izvedba poskusa, B) zajemanje podatkov, C) spektralna analiza, D) prikaz in E) ekstrakcija ujemajočih podatkov, F) natančna analiza in G) razlaga dobljenih rezultatov.

3.2.14.7 Bledenje membranskega fluorofora

Čeprav je bil vpliv bledenja membranskega fluorofora med zajemom skoraj zanemarljiv, smo med posameznimi spektri v časovnem nizu istega poskusa zaznali občuten upad jakosti signala membranskega označevalca Bodipy 530/550. Pojav je potrebno natančno upoštevati, saj molekula Bodipy 530/550 v našem FRET poskusu nastopa kot prejemnik prenesene energije s strani darovalca Alexe 488 in je torej porast jakosti membranskega

signala neposreden dokaz, da nanocevke pridejo v neposredno bližino membrane. Za pravilno oceno porasta intenzitete signala smo zato izmerjene jakosti membranskega označevalca v celotni časovni seriji popravili glede na neodvisno izmerjeno hitrost bledenja danega označevalca. Slednjo smo določili iz kontrolnih poskusov z liposomi brez nanodelcev (Priloga A), kjer smo spremljali časovno zmanjševanje signala membranskega barvila v liposomih. Analiza meritev FMS je bila enaka kot zgoraj, le da smo spektre opisali z enokomponentnim modelom s parametri za barvilo Bodipy 530/550. Padanje povprečnih jakosti fluorescence po obodu liposoma zaradi bledenja smo opisali z eksponentno funkcijo, s katero smo nato popravili izmerjene jakosti membranskega barvila pri poskusih z nanocevkami (slika 9F). Ker je bila hitrost bledenja odvisna od lipidne sestave membrane, smo referenčne poskuse vsakič izvedli z ustreznimi liposomi in povprečili rezultate nekaj takih meritev z enakimi vzorci (Priloga A).

Učinkovitost prenosa energije FRET med barviloma in s tem jakost interakcije med nanocevkami in membrano smo končno določili iz odvisnosti porasta popravljenega signala membranskega označevalca glede na jakost signala barvila na nanocevkah. Linearni koeficient (K) smo uvedli kot uporabno mero učinkovitosti interakcije, saj je poleg medsebojne oddaljenosti in lege barvil odvisen le še od koncentracije membranskega barvila, ki je bila za vse preiskovane primere enaka, ne pa tudi od koncentracije nanocevk ali količine fluorofora na posamezni nanocevki, ki sta se med poskusi spreminjali. Poleg tega smo kopičenje nanocevk v membrani lahko spremljali tudi iz premika lege spektralnega vrha barvila Alexa 488. Pojav FRET je ob zadostni bližini namreč možen tudi med barvili iste vrste (t. i. homo-FRET), pri čemer se izsevani spekter navidezno premakne proti daljšim valovnim dolžinam.

3.2.14.8 Analiza interakcije nanocevk z lipidnim dvoslojem

Zbrani podatki so nam omogočili izluščiti tri elemente interakcije. **Akumulacija nanocevk** na/v membrane je bila ocenjena neposredno iz razlik v jakosti signala A-TiO_2-NC na/v membrane v primerjavi s signalom v okolici (ΔI_{NC}). Največji porast celotne časovne serije smo prikazali z rdečo horizontalno linijo (slika 9F, Priloga A). Vrednosti smo normirali relativno na količino fluoroforov na nanocevko (c_F). Nanocevke A_{max}-TiO_2-NC namreč nosijo približno 5x več fluorescenčnega označevalca Alexa 488 kot A_{min}-TiO_2-NC. Tako smo lahko zanesljivo primerjali akumulacijo nanocevk različnih poskusov na membrani. Posamezni simboli ustrezajo povprečni vrednosti ter standardni deviaciji treh primerljivih poskusov.

Hkrati smo lahko spremljali premik spektralnega vrha A-TiO_2-NC na membrani v primerjavi z okolico ($\Delta\lambda max$). Premik spektralnega vrha v rdeče ($\Delta\lambda max > 0$) odraža »homo-FRET« pojav, torej medsebojno interakcijo sosednjih nanocevk, kar kaže na **agregacijo nanocevk** v/na membrani. Vrednosti največje akumulacije smo prikazali s horizontalno rdečo črto.

Molekularni kontakt nanocevk in membrane je bil ocenjen iz dveh pojavov. Ker Alexa 488 ter Bodipy 530/550 fluorofor tvorita FRET par, smo lahko prenos energije donorja A-TiO_2-NC na prejemnik PC-Bodipy spremljali tekom akumulacije nanocevk v/na membrani kot porast membranskega signala, ki smo ga predhodno popravili z izmerjenim bledenjem. Kljub temu je v nekaterih primerih močne interakcije namesto pričakovanega porasta membranskega signala opaziti upad le-tega, kar smo lahko obrazložili le s kontinuiranim odtokom PC-Bodipy, ki je posledica interakcije membrane z nanocevkami, najverjetneje z oplaščenjem membrane okoli nanocevk (ang. wrapping) (I_w). Oba vpliva smo zato upoštevali v matematičnem modelu, ki podaja membransko intenziteto:

$$\Delta I_M(t) = \Delta I_M(0)\exp(-bt_L) + I_{FRET}(t) - I_W(t), \qquad (1)$$

kjer $\Delta I_M(0)$ predstavlja začetno intenziteto PC-Bodipy brez vpliva bledenja in interakcije z nanocevkami, b predstavlja stopnjo bledenja, ki smo jo izmerili ločeno, t_L celokupno osvetljenost vzorca od samega začetka poskusa.

FRET prispevek smo oblikovali ob predpostavki preprostega člena kinetike prvega reda

$$I_{FRET}(t) = G[\Delta I_{NC}(t) + I_{FRET}(t)][\Delta I_M(0)\exp(-bt_L)], \quad (2)$$

kjer G predstavlja učinek prenosa energije zaradi molekularnega kontakta. Izmerjena intenziteta A-TiO_2-NC (ΔI_{NC}) je za boljšo oceno dejanske koncentracije na membrani zaradi manjkajočega signala, posledica FRET pojava, popravljena. Zadnji člen upošteva postopno zmanjševanje FRET prejemnika, torej PC-Bodipy, kot posledico bledenja.

Za verjetnost oplaščenja nanocevk z membrano je bilo predpostavljeno, da je v vsakem trenutku sorazmerna koncentraciji nanodelcev na membrani, posledično pojemanje signala PC-Bodipy zaradi odnašanja membrane v okolico pa je sorazmerno koncentraciji nezbledelih fluoroforov. Če pojav poteka zvezno, lahko celokupno znižanje membranskega signala (I_W) ob opazovanem času t ocenimo s časovnim integralom obeh zgornjih dejavnikov

$$I_W(t) = \frac{GW}{c_F}\int_0^t [\Delta I_{NC}(t') + I_{FRET}(t')][\Delta I_M(0)\exp(-bt')]dt' \ , \quad (3)$$

kjer W popravlja vrednosti in enote konstante molekularnega kontakta G *in* c_F upošteva razlike v količini fluorofora na nanocevko.

Z upoštevanjem aritmetičnih manipulacij lahko v enačbi (1) izrazimo pričakovani membranski signal le z meritvijo količin ΔI_{NC} in b ter dveh konstant interakcije (G in W), ki jih lahko pridobimo s prilagajanjem modela izmerjenim podatkom; $\Delta I_M(0)$ lahko vzamemo iz začetne merjene točke ali dobimo z metodo minimalizacije najmanjših kvadratov. Ker smo predpostavili, da je oplaščenje neodvisno od vzorca, smo vrednost W prilagajali za vseh 12 poskusov hkrati. Vsakemu posameznemu poskusu smo določili svojo vrednost G.

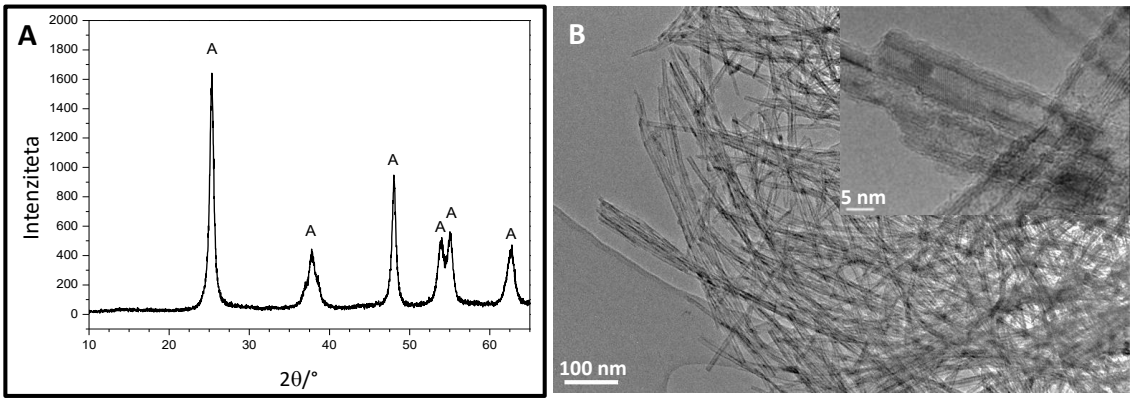
4 Rezultati in razprava

4.1 Karakterizacija TiO_2-NC

Informacije o izbranem materialu, TiO_2-NC, torej o obliki, velikosti, kristaliničnosti, specifični površini ipd., so nujne za razumevanje interakcij omenjenega nanomateriala z biološkimi sistemi.

Najprej smo z rentgensko praškovno difrakcijo vzorca TiO_2-NC potrdili (slika 10A), da gre za anatazno obliko TiO_2 (JCPDS No. 86-1157).

V nadaljevanju smo TiO_2-NC okarakterizirali s presevno elektronsko mikroskopijo (TEM). slika 10B prikazuje TEM posnetek TiO_2-NC, posnet pri nižji in višji povečavi. Sama sinteza nanomateriala ohranja morfologijo nanocevk. Razvidno pa je še, da posamezne nanocevke tvorijo večje skupke, ki so lahko posledica priprave vzorca (sušenje). Iz TEM posnetka pri višjih povečavah se vidi tudi, da so cevke kristalinične. Medmrežna razdalja nanocevk na sliki 10B ustreza anatazni obliki TiO_2, kar je v skladu z XRD analizo (slika 10). Dimenzija posamezne cevke je 10 nm v premeru ter 100–200 nm v dolžini. Specifična površina TiO_2-NC je 97 m^2/g.



Slika 10: *Rentgenski praškovni difraktogram TiO_2-NC*, kjer oznaka A označuje uklone anatazne oblike TiO_2 (A). TEM posnetek TiO_2-NC z dodanim izsekom slike pri večji povečavi (B).

4.2 Funkcionalizacija in fluorescenčno označevanje

Naš cilj je bil spremljati nanocevke v celičnem okolju. Ker je sistem fluorescenčne mikrospektroskopije odličen za preučevanje živih sistemov s krajevno ločljivostjo na mikronski skali ter spektralno resolucijo na nanometrski skali, smo hoteli nanocevke označiti s fluoroforom.

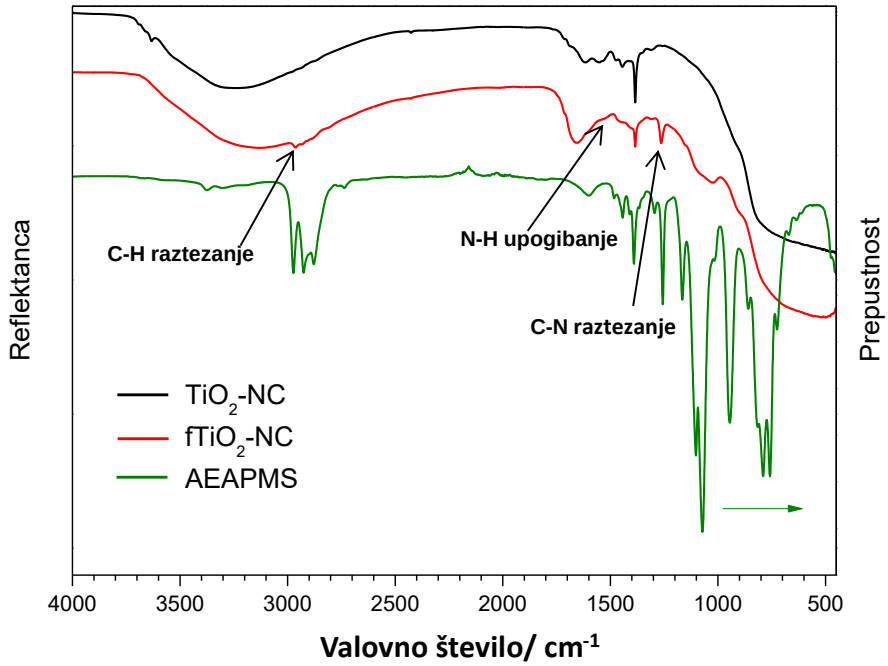
Neposredna vezava fluorescenčnih označevalcev ni bila učinkovita, barvilo se ni adsorbiralo na površino ali pa je bil signal fluorofora, ko smo delce izpostavili celičnemu okolju, nespecifično razporejen po vzorcu, kar je nakazovalo, da je adsorbirani fluorofor s površine cevk difundiral po celici. Tako označene nanocevke bi podajale napačne informacije o njihovi lokaciji [65].

Iz literature je znano, da je mogoče površinske defekte na mestih velike ukrivljenosti same TiO_2 površine uporabiti za vezavo specifičnih organskih molekul[66]. Poleg tega je znano, da imajo kovinski oksidi na površini hidroksilne skupine in ravno te so ključne za

vezavo organskih molekul na površino[67]. Ker neposredna kovalentna vezava fluorofora na površino cevk ni bila mogoča, smo označevanje izvedli v dveh korakih. V prvem koraku smo površino nanocevk TiO_2 funkcionalizirali s 3-(2-aminoetilamino)propiltrimetoksisilan (AEAPMS), ki je igral vlogo t. i. linkerja. Reakcija je potekala v brezvodnem mediju. Pri reakciji med prosto –OH skupino na površini TiO_2-NC in molekulo silana je nastala vez Ti-O-Si. Delce smo poimenovali fTiO_2-NC.

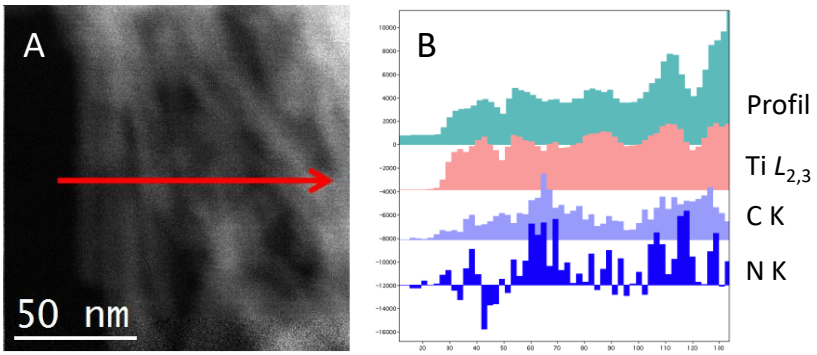
Uspešnost funkcionalizacije površine TiO_2 smo potrdili z dvema analitskima tehnikama, infrardečo spektroskopijo (IR) in spektroskopijo izgub elektronov (EELS).

IR spektroskopija, ki je razmeroma hitra, enostavna metoda in ne potrebuje zahtevnih priprav vzorca, zelo natančno poda informacijo o molekularnih skupinah preko vibracijskih frekvenc. Informacija temelji na interakciji in absorpciji infrardeče svetlobe z vzorcem, svetloba s takšno valovno dolžino pa ima dovolj veliko energijo, da vzbudi vibracijska stanja. Ta so posledica nihanj vezi, molekulam v vzorcu pripadajo značilne vibracijske frekvence, na podlagi katerih jih lahko identificiramo. Tako smo posneli IR spekter osnovnih delcev, torej TiO_2-NC, delcev, na katere smo vezali linker AEAPMS (fTiO_2-NC) ter sam organski linker. Sam spekter osnovnih delcev, TiO_2-NC, kaže pas pod 700 cm^{-1}, ki pripada Ti-O in Ti-O-Ti vezavi titana[67]. V območju med 3700 in 2600 cm^{-1} z vrhom pri 3250 cm^{-1} ter vrh pri 1640 cm^{-1} karakteristično ustreza površinsko absorbirani vodi. Oster vrh pri 3600 cm^{-1}ustreza vibracijam prostih –OH skupin, ki so prisotne na površini nanocevk, ne pa tudi v spektru vzorca fTiO_2-NC. To dokazuje, da so proste –OH skupine na površini zasedene. Dodaten dokaz za uspešno vezavo AEAPMS na TiO_2-NC (fTiO_2-NC) je prisotnost vrha pri 2850 cm^{-1}, ki je značilen za C-H vibracije v alkanih. Prav tako vrh pri 1650 cm^{-1} ustreza upogibanju funkcionalne NH_2 skupine. V območju 1260 cm^{-1} je ozek, šibko intenziven vrh, ki ustreza karakterističnemu raztezanju C-N (slika 11). Vezavo in ne adsorpcijo dokazuje tudi dejstvo, da spekter fTiO_2-NC ni preprosta vsota spektra prostega linkerja in nefunkcionaliziranih nanocevk.



Slika 11: *Infrardeči spektri nanocevk (TiO_2-NC), funkcionaliziranih nanocevk (fTiO_2-NC) in 3-(2-aminoetilamino)propiltrimetoksisilan (AEAPMS).* Spektra TiO_2-NC in fTiO_2-NC sta bila posneta v difuzni refleksiji, medtem ko je bil spekter silana posnet v transmisiji.

HAADF-STEM mikroskopija z EELS spektroskopijo z možnostjo detekcije prisotnih atomov ter elektronskih struktur s pod-nanometrsko ločljivostjo je v vzorcu potrdila prisotnost elementov titana (Ti), ogljika (C) in dušika (N). Prisoten ogljik lepo sledi obliki profila (slika 12B), kar nakazuje, da je to ogljik molekule AEAPMS in ne ogljik, ki bi bil prisoten kot posledica kontaminacije vzorca. V vzorcu je dušika pričakovano malo, vendar lega lepo sovpada z lego ogljika, kar ponovno nakazuje uspešno in enakomerno vezavo molekule AEAPMS na površino cevk.



Slika 12: *(A) HAADF-STEM posnetek skupka nanocevk TiO_2, funkcionaliziranih s 3-(2-aminoetilamino)propiltrimetoksisilan (AEAPMS) in (B) kemijski profil, dobljen iz EELS analize Ti L, C K in N K robov vzdolž puščice na sliki A.*

Namen drugega koraka označevanja je bila kovalentna vezava fluorescenčne molekule na proste amino skupine molekul silana. Izbrani fluorofor, Alexa 488 SDP ester, velja za zelo obstojno fluorescenčno barvilo, ki ne bledi. Ta lastnost zelo dobro ustreza našim poskusnim zahtevam po spremljanju interakcij med nanocevkami in celicami v realnem času na različno dolgih časovnih skalah, predvsem v načinu mikrospektroskopije, ki zahteva daljše osvetlitve vzorca in posledično fluorofore bolj izpostavi bledenju.

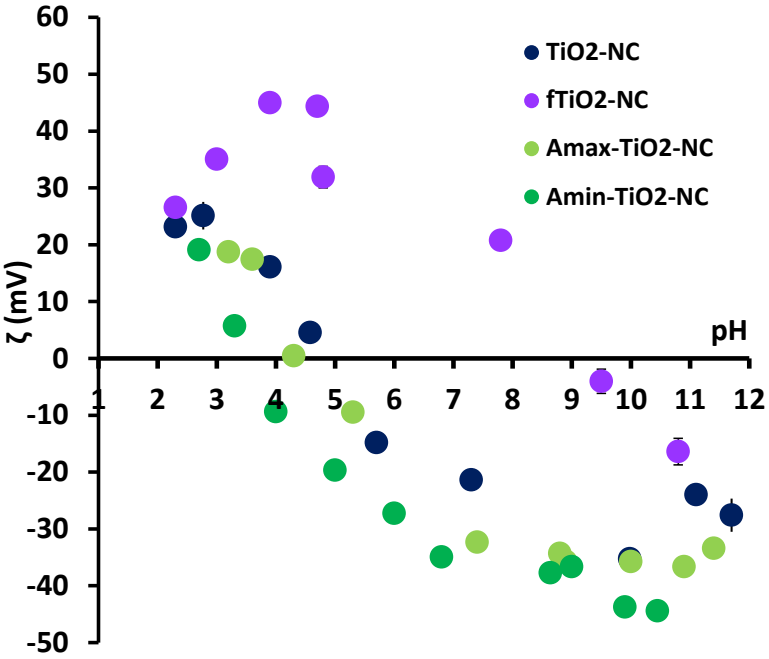
Ker smo v reakcijsko zmes dodali fluorofor v prebitku, je bila potrebna faza čiščenja, ki nam je zagotovila, da v svojem A-TiO_2-NC nimamo prisotnih prostih molekul nevezanega fluorofora. Le-ta bi motil naše meritve, saj bi tako kot vezan fluorofor dajal fluorescenčni signal. Kljub številnim poskusom čiščenja označenih nanocevk, kot je ultracentrifugiranje, gelska kolona, se je dializa izkazala za edini učinkovit in zanesljiv pristop. Potrebno je bilo le pravilno izbrati medij, v katerem se bo dializa izvajala. Prvi korak dialize smo izvedli v etanolu, da bi zagotovili dobro topnost izbranega fluorofora, ki je zaradi svoje majhne molekulske mase v nasprotju z označenimi cevkami lahko prehajal dializno membrano. Da bi učinkovito odstranili etanol, smo to dializirali 4 dni in etanol zamenjali vsak dan. Peti dan smo dializirali še v vodi, da bi se potem lahko približali fiziološkim pogojem, ki so jih narekovali sledeči eksperimenti z nanocevkami na bioloških vzorcih.

Da je Alexa 488 resnično vezana na nanocevke, smo potrdili tudi z meritvijo elektrokinetične mobilnosti na zetametru, iz katere dobimo informacijo o zeta potencialu delca. Delec v raztopini s svojim površinskim nabojem namreč privlači ione nasprotnega naboja, pri čemer se tvori t. i. električna dvojna plast. Nasprotno nabiti ioni, ki se nahajajo v tej dvojni plasti, senčijo naboj delca oz. električno polje daleč stran od delca. Potencial na zunanjem robu električne dvojne plasti imenujemo zeta potencial in ga merimo v mV in je torej odvisen od površinskih lastnosti delcev ter same raztopine, v kateri se delci nahajajo.

Vrednosti zeta potenciala veljajo za indikator stabilnosti, pri čemer višja absolutna vrednost zeta potenciala pomeni bolj nabito površino delca, torej močnejše odbojne sile med posameznimi delci, ki so tedaj lahko večje od privlačnih van der Waalsovih interakcij, in koloidna suspenzija je stabilna. Stabilnost koloidne suspenzije nanodelcev je

v svetu nanoznanosti zaželjena lastnost. Prav nasprotno pa premajhna vrednost zeta potenciala (pod ± 30 mV) privede do agregacije delcev[68], pri kateri so primarne fizikalno-kemijske lastnosti nanodelcev manj izrazite.

Izmerjeni zeta potencial neoznačenih delcev TiO_2-NC v odvisnosti od pH v močno kislem okolju (pH 3–4) oziroma močno bazičnem okolju (pH 10) kaže omejeno stabilnost. V kislem okolju so OH skupine na površini v protonirani obliki (OH_2^+), v bazičnem, pa v deprotonirani obliki (O^-). Izoelektrična točka, ko je koncentracija protoniranih in deprotoniranih skupin izenačena, je pri vrednosti pH 5. Pri vzorcih fTiO_2-NC je pričakovano izoelektrična točka narasla v območje pH 9–10.



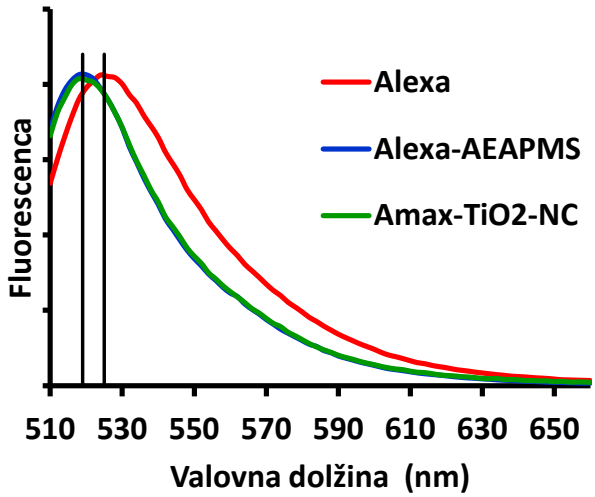
Slika 13: *Odvisnost zeta potenciala osnovnih nanocevk (TiO_2-NC), delcev z linkerjem (f-TiO_2-NC) ter fluorescenčno označenih nanocevk ($A_{min/max}$-f-TiO_2-NC) v vodi od pH vrednosti.*

Zeta potencial fluorescenčno označenih vzorcev, A_{min}-TiO_2-NC (svetlo zelene pike na sliki 13) oziroma A_{max}-TiO_2-NC (temno zelene pike na sliki 13), se ponovno premakne v levo (pH 3–5). To je v skladu z našimi pričakovanji, saj se molekule fluorofora kovalentno vežejo na prosto amino skupino linkerja, posamezna molekula Alexe 488 pa nosi tri SO_3^- skupine, ki v nevtralnem okolju (pH 7) oziroma v fizioloških pogojih delcu dajejo negativni predznak. Posamezna molekula AEAPMS ima eno funkcionalno amino skupino.

Osnovni namen fluorescenčnega označevanja delcev je bil omogočiti sledenje v bioloških vzorcih, celicah, s predpostavko, da osnovno TiO_2 površino čim manj spremenimo. S prilaganjem koncentracij linkerja in fluorofora nam je tako uspelo zagotoviti, da je površina označenih cevk A_{min}-TiO_2-NC glede površinskega naboja zelo podobna osnovnim cevkam TiO_2-NC, cevke A_{max}-TiO_2-NC pa so zaradi večje količine vezanega fluorofora bolj negativne, a zato tudi bolj stabilne in z močnejšim fluorescenčnim signalom.

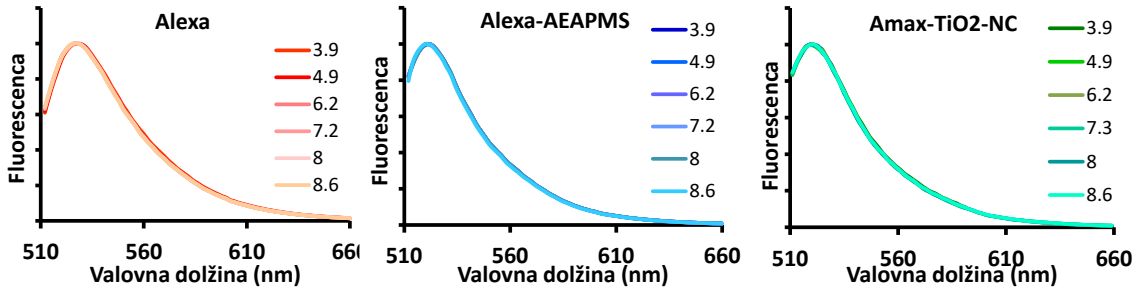
Z upoštevanjem zeta potenciala označenih delcev in velikosti cevk ocenjujemo, da je površina posamezne cevke prekrita s približno 40 molekulami AEAPMS. Ker to pomeni, da je le približno 1/1000 površine prekrite z organskim linkerjem, smo lahko upravičeno predpostavili, da lahko interakcije s preučevanimi sistemi dejansko pripišemo TiO_2 površini (nanocevk).

Intenziteto fluorescence označenih nanocevk smo preverili s FMS sistemom kot tudi na spektrofotometru. Posneli smo emisijski spekter fluorescenčno označenih nanocevk v vodi kot tudi spekter proste Alexe 488 v vodi in spekter kompleksa Alexa-AEAPMS, prav tako v vodi. Izkaže se (slika 14), da se Alexi 488 ob vezavi na linker premakne vrh spektra (λ_{max}) k niž jim valovnim dolžinam za približno 6 nm. Razlikovanja v spektralnem vrhu vezane Alexe 488 na linker oziroma z linkerjem na nanocevko pa nam spektroskopija žal ne razkriva.



Slika 14: *Emisijski spektri proste Alexe 488 (rdeča), Alexe 488, vezane na AEAPMS linker (modra) ter označenih nanocevk A_{max}-TiO_2-NC (zelena) v vodi, pomerjena na spektrofotometru, normirano na 1.*

Zaradi opaženega spektralnega premika smo v nadaljevanju želeli preveriti tudi, ali se oblika spektra oziroma spektralni vrh spreminja v odvisnosti od pH, ki se pričakovano lahko spreminja znotraj celice. To bi bila za nas pomembna informacija za pravilno razlago dobljenih rezultatov. Izkazalo se je, da sprememba pH ne vpliva na obliko in premik spektralnega vrha (slika 15).



Slika 15: Emisijski spektri proste Alexe 488 (rdeča), Alexe 488 vezane na AEAPMS linker (modra) ter označenih nanocevk A_{max}-TiO_2-NC (zelena) v vodi, v odvisnosti od pH, pomerjeno na spektrofotometru, normirano na 1.

4.3 Interakcija TiO_2-NC s celicami *in vitro* – ocena citotoksičnosti in fototoksičnosti nanocevk

4.3.1 Celična viabilnost v odvisnosti od koncentracije TiO_2-NC v temi oziroma v prisotnosti UV svetlobe

Interakcijo med razširjenimi in uporabnimi nanomateriali in biološkimi sistemi na nivoju

celičnih linij smo preučevali na rakavi celični liniji MCF-7. Kot je omenjeno že v uvodu, so namreč TiO_2 nanodelci zaradi svojih antibakterijskih, fotokatalitčnih, superhidrofilnih itd. lastnosti zelo priljubljeni, hkrati pa je njihova nanotoksičnost odvisna od številnih lastnosti nanomateriala, torej od oblike, velikosti, površinskih lastnosti, težnje k agregaciji, dopiranosti, zato je tudi težko predvidljiva. V naši raziskavi smo se usmerili v študij nanotoksičnosti in fototoksičnosti TiO_2 nanocevk, ki smo jih sintetizirali na našem odseku, torej TiO_2-NC, in so vključene tudi v določene razvojne aktivnosti odseka. Takšna informacija je pomembna in nujna pred njihovo nadaljnjo uporabo.

Za preučevanje celičnega odziva, bolj natančno celične viabilnosti, smo uporabili splošno uporabljen test MTS, ki se zelo pogosto uporablja za oceno toksičnosti nanomaterialov[52,69]. Priljubljen je ravno zaradi svoje enostavnosti in hitrosti, deluje pa tako, da podaja informacijo o sami živosti celic oziroma o živosti celične linije na podlagi celične metabolne pretvorbe MTS tetrazolijeve komponente v barvni produkt formazan, ki je topen v celičnem mediju ter močno absorbira pri 490 nm.

Na kratko, celicam v mediju s serumom, nasajenim en dan, smo dodali v različnih koncentracijah TiO_2-NC (1, 5, 50, 100, 500 ali 1000 μg/ml), prav tako v mediju s serumom, ter inkubirali naslednja dva dni. Četrti dan smo dodali MTS reagent, kot je opisano v protokolu proizvajalca ter v točki disertacije 3.2.6. Na spektrofotometru smo izmerili živost celic glede na kontrolo, torej netretiranih celic.

Hkrati pa smo želeli preveriti tudi, ali lahko TiO_2-NC s svojo fotokatalitično sposobnostjo delujejo kot potencialen antitumorski kandidat v terapevtske namene, oz. natančneje, ali so TiO_2-NC prava izbira za namene fotodinamične terapije, kjer bi nanomaterial s svojimi lastnostmi prevzel vlogo fotosenzibilizatorja, ki ob vzbujanju z UV svetlobo proizvaja radikale, oksidativni stres (ROS) pa vodi v celično smrt[70]. Takšno možnost nakazujejo tri dejstva. V literaturi smo namreč zasledili, da izbrani način sinteze TiO_2 nanodelcev oziroma cevk, pri katerih pri spiranju s kislino pride do izmenjave Na^+ z H^+, za seboj pušča strukturne nepravilnosti na sami površini nanocevk, ki jim v isti objavi pripisujejo izvor visoke citotoksičnosti omenjenega TiO_2 nanomaterila[71].

Drugo dejstvo je razmeroma velika specifična površina posamezne nanocevke, ki je vir aktivne površine in je v našem primeru 2x večja od specifične površine tako imenovanega standarda za fotokatalitično aktivnost nanodelcev, P25, Degussa[72]. S tem bi se lahko povečala tudi citotoksičnost. Ob primerjavi smo morali preveriti tudi fotoaktivnost TiO_2-NC v odvisnosti od različne valovne dolžine ter aktivnost primerjati s standardom P25. Izkazalo se je, da so naše nanocevke primerljivo aktivne kot sami delci P25 (Priloga, slika A1).

Nazadnje pa nas je motiviralo tudi opažanje, da lahko injiciranje TiO_2 delcev na tumorsko mesto, čemur sledi UV obsevanje, zmanjša obseg in povzroči smrt tumorskih celic, kar sicer kažejo tudi nekatere *in vitro* raziskave na rakavih celičnih linijah[44,73–75,70]. Fotoaktiviran TiO_2 nanomaterial bi torej pri aplikaciji nanomateriala v tumorsko tkivo povzročil škodo le na mestu obsevanja, zaradi česar bi bila takšna terapija uporabna za vse tumorje, ki so dostopni z endoskopom.

Ob vsem tem pa smo želeli bolje razumeti mehanizem fototoksičnosti. V obstoječi literaturi namreč prihaja do razhajanj v zaključkih fototoksičnega učinka na različnih vrstah celic ter različnih velikostih TiO_2 nanodelcev[48,52,54].

Naši rezultati MTS testa kažejo, da tretiranje celic z nanocevkami, kot je opisano zgoraj, povzroči signifikanten upad viabilnosti glede na kontrolo le pri koncentraciji nanocevk 100 μg/ml in več. Pri zelo nizkih koncentracijah (1 in 5 μg/ml) opazimo celo porast v viabilnosti, ki si jo lahko razlagamo s pojavom hormeze (slika 16A). Po definiciji je to namreč stanje, ko se celica na stresor, prisoten v zelo nizkih koncentracijah (lahko tudi v nM koncentracijah), nanj odzove z rastjo, torej ravno obratno kot pri visokih koncentracijah. V našem primeru torej material pri nižjih koncentracijah deluje

stimulativno[76]. S takšnim odzivom se celice prilagodijo na stres iz okolice in pospešijo metabolizem ter proliferacijo. Takšno opažanje je v skladu z nekaterimi objavami iz preteklosti[77,78].

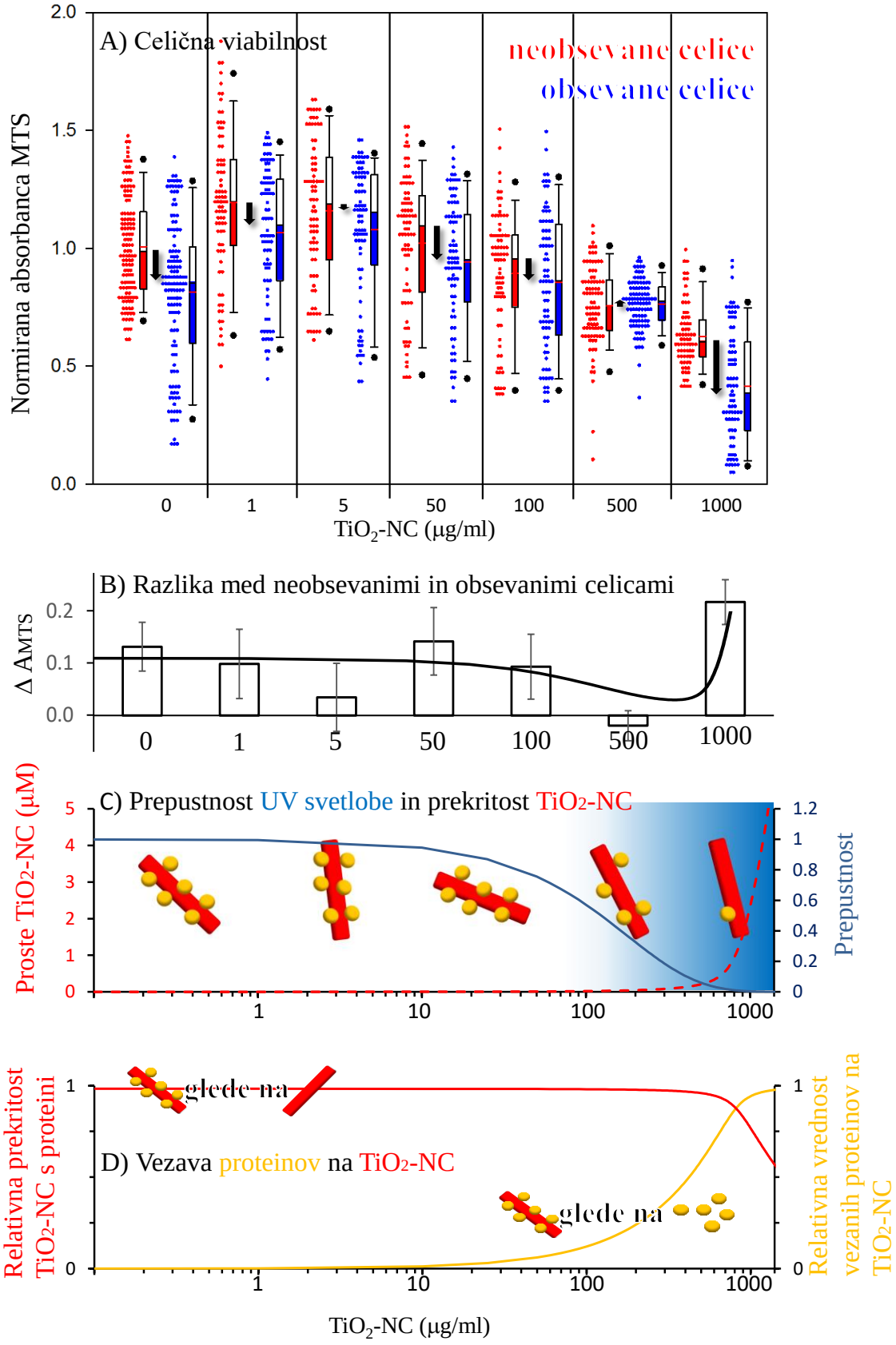
Možen terapevtski učinek fotoaktiviranih TiO_2-NC pa raziščemo tako, da s TiO_2-NC inkubirane celice obsevamo z UV svetlobo valovne dolžine z močjo, ki še fotoaktivira nanomaterial (Priloga, slika A1), pri čemer pa izbrana UV svetloba minimalno prispeva k celični smrti (padec viabilnosti).

V našem eksperimentu sama UV svetloba zniža viabilnost netretiranih celic za 15%, kar je pravzaprav najvišje zaznan upad viabilnosti tudi, ko so celice tretirane z nizkimi koncentracijami TiO_2-NC (slika 16B). Padec viabilnosti obsevane kontrole lahko pojasnimo z znanimi toksičnostnimi vplivi UVA svetlobe, torej povečanim oksidativnim stresom, poškodbami celične membrane kot tudi z neposrednimi poškodbami genetskega materiala (navadno prelomi enoverižne DNA)[79]. Tumor supresor gen p53 namreč regulira celični cikel, tako da se v primeru DNA poškodb prepreči nadaljnjo delitev celice. Poškodba se mora popraviti ali pa je sprožena apoptoza. Ker imajo MCF-7 celice t. i. divji tip (ang. wild tipe) gena p53, ki kodira delujoč p53 protein, obsevanje MCF-7 celic lahko povzroči poškodbe DNA, ki jih celica ne uspe popraviti in zato preide v apoptozno stanje, kar zmanjšuje število celic.

Rezultati viabilnosti MTS testa kažejo, da nizke koncentracije TiO_2-NC ne izražajo fototoksičnega učinka na MCF-7 celice. Pri koncentraciji 500 μg/ml je učinek UV svetlobe na padec viabilnosti izničen. Če upoštevamo lastnost prepustnosti suspenzije TiO_2-NC v odvisnosti od koncentracije (slika 16C, modra črta), vidimo, da sam material do te koncentracije pravzaprav deluje zaščitno, saj so celice manj izpostavljene UV svetlobi.

Če bi bili delci fototoksični, bi pričakovali, da produkcija radikalov izniči ali celo preseže vpliv absorbcije same suspenzije, kar bi morali zaznati kot dodaten padec celične viabilnosti. Nasprotno, tega učinka nismo zaznali, viabilnost obsevanih in neobsevanih celic ostajata primerljivi. Učinka fototoksičnosti TiO_2-NC pri nizkih koncentracijah, vključno z izbrano koncentracijo 500 μg/ml, torej ni. Ker je naš material fotoaktiven (Priloga, slika A1), iz rezultatov MTS testa lahko sklepamo, da je produkcija radikalov ovirana. Edina komponenta celičnega medija, ki bi lahko pri tem igrala pomembno vlogo, je komponenta serumskih proteinov, za katere pa je znano, da zaradi visoke afinitete do površin nanodelcev z njimi zelo radi interagirajo in tvorijo tako imenovano »proteinsko korono«[17,80].

Razliko v celični viabilnosti, prikazani na sliki 16B, lahko opišemo z dvema prispevkoma. Prvi vpliv ima sama UV svetloba, katere vpliv se v vzorcu z dodanimi TiO_2-NC zmanjšuje sorazmerno s prepustnostjo celičnega medija s TiO_2-NC (slika 16C, modra črta). Ta razlika s koncentracijo pada, saj skozi vzorec s koncentriranimi nanocevkami UV svetloba težje prodira (ker se hitreje absorbira). Druga razlika pa izvira iz fotogeneracije radikalov na površini TiO_2-NC, ki je najprej sorazmerna količini preostale svetlobe, ki vzbuja prosto površino TiO_2-NC, hkrati pa tudi sorazmerna površini brez proteinske korone (slika 16C, rdeča črtkana črta), proteini sicer učinkovito prestrezajo radikale. Ta, druga razlika pa pri konstantni množini proteinov v pufrih/medijih narašča s koncentracijo nanodelcev. Na tak način postane tudi proteinska korona pomemben faktor pri fototoksičnosti nanodelcev.



Slika 16: *Viabilnost MCF-7 celic v odvisnosti od koncentracije TiO_2-NC v temi oziroma v prisotnosti UV svetlobe.* Absorbcija MTS testa je bila pomerjena, kot je opisano v odstavku Materiali in metode. A) Diagram prikazuje vse meritve, kjer so vsi podatki neobsevanih vzorcev (rdeči simboli) primerjani z obsevanimi (modri simboli) pri izbrani koncentraciji nanocevk. Razlika v celični viabilnosti neobsevanih in obsevanih celic je prikazana s črno puščico pri izbrani

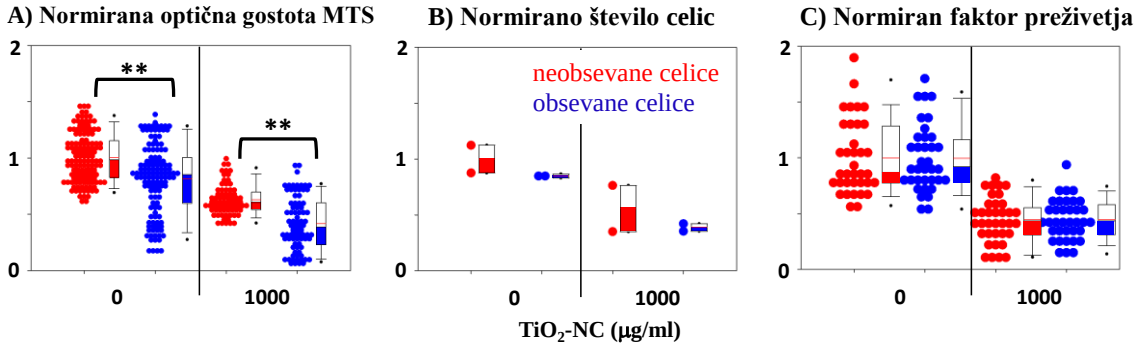
koncentraciji nanocevk. Razlika vrednosti mediane med vzorcem 0 µg/ml ter 1000 µg/ml je signifikantna pri P=< 0,001, razlika vrednosti mediane med vzorcem 0 µg/ml ter 50 µg/ml je signifikantna pri P=< 0,05. B) Bari prikazujejo razliko mediane izmerjene absorbance (MTS test) neobsevanih ter obsevanih vzorcev. Črna črta prikazuje predvideno razliko celične viabilnosti, če upoštevamo vpliv same UV svetlobe ter fototoksičen prispevek nepokritih TiO_2-NC (brez proteinskega plašča). Oba prispevka k celični viabilnosti sta ločeno prikazana na sliki C. C) Modra črta prikazuje prepustnost UV svetlobe v odvisnosti od koncentracije TiO_2-NC (prazni modri krogi so bili določeni eksperimentalno); Črtkana rdeča črta prikazuje koncentracijo prostih TiO_2-NC, izračunanih, kot je prikazano v Prilogi A. D) Relativna vrednost s proteini prekritih TiO_2-NC (rdeča črta) ter relativna vrednost vezanih serumskih proteinov (rumena črta), kot predvideva model v Prilogi A.

Ker pa lahko pri testu MTS sam reagent interagira z nanodelci, prisotnimi v celičnem mediju[81], in bi lahko rezultati močno odstopali od realnega celičnega stanja, smo pri sami izvedbi poskusa upoštevali tudi to možnost in preverili vrednosti interferenc v primeru, ko MTS reagent dodamo nanocevkam v celičnem mediju s serumom, brez prisotnih celic. Lastnost interference smo preverili za vse uporabljene koncentracije TiO_2-NC ter dobljene vrednosti upoštevali pri sami analizi.

4.3.2 Razčlenitev rezultatov MTS testa

Čeprav so kolorimetrični testi MTS hitri in enostavni, pa viabilnost celic podajajo kot zmnožek števila celic in njihove metabolne aktivnosti. Iz rezultatov je torej težko ugotoviti, ali so v vzorcu prisotne številne celice z nizko metabolno aktivnostjo oziroma ali naš vzorec zaseda le majhno število celic, ki pa so močno metabolno aktivne. Dobljeni rezultat je namreč v obeh primerih identičen.

Da bi razjasnili to nejasnost, smo celice tretirali z nanocevkami koncentracije 1000 µg/ml, zadnji dan pa smo namesto dodanega reagenta MTS (slika 17A) celice barvali s Tripan modrim. Celice smo prešteli ter ocenili razmerje med živimi in mrtvimi (slika 17B). V nadaljevanju smo celice nasadili naprej in s klonogeničnim testom ocenili njihovo zmožnost delitve v normalnih pogojih. S tem smo tako za tretirane celice kot za kontrolo ločili kratkotrajen in dolgotrajen vpliv UV svetlobe in nanocevk na zmožnost delitve celic.



Slika 17: *Primerjava rezultatov MTS (A), štetja celic (Tripan modro) (B) ter nadaljnje zmožnosti proliferacije celic (klonogeničen test) (C) pri dodani koncentraciji nanocevk 1000 µg/ml*. Diagram prikazuje vse meritve, kjer leva skupina prikazuje neobsevane vzorce brez dodanih nanocevk (rdeči simboli), desna pa obsevane ter z dodanimi nanocevkami (modri simboli). Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili Mann-Whitney U statistični test, kjer so signifikantne razlike med vrednostmi mediane posameznega vzorca ** P=< 0,001.

Rezultati štetja celic (Tripan modro) se dobro ujemajo z rezultatom MTS testa, kar

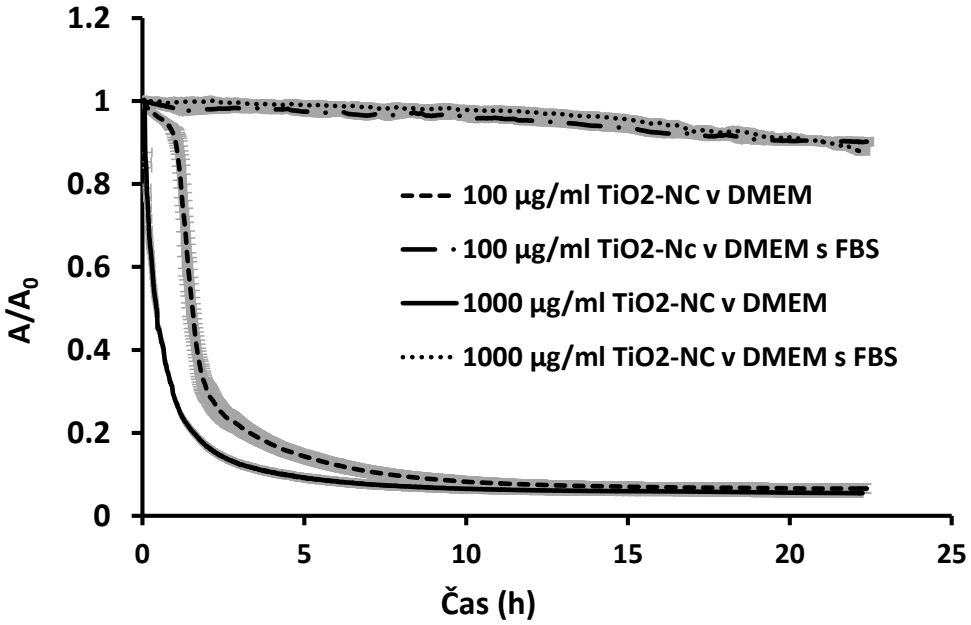
kaže, da v našem primeru MTS test dobro odraža številčnost celic (viabilnost). Prav tako vidimo, da sama UV svetloba kot tudi nanocevke vplivata na zmanjšano število celic.

Zmožnost delitve celic, ki smo jo preučevali s klonogeničnim testom, kaže, da sama UV svetloba izbrane valovne dolžine ne zavre delitve obsevanih celic, stopnja preživetja je identična kontroli, torej neobsevane celice. Nasprotno pa nanocevke zavirajo celično delitev in formacijo nastelih kolonij. Če zaupamo rezultatom vpliva UV svetlobe na celice, dobljene z MTS testom, ter upoštevamo rezultate štetja, lahko sklepamo, da se celice na obsevanje odzovejo z upočasnjeno rastjo ali celo s prekinitvijo, ta odziv pa ob odstranitvi stresorja ni več opazen. Nasprotno pa celice, ki so bile tretirane s TiO_2-NC, koncentracije 1000 μg/ml, nimajo več sposobnosti, da bi se normalno delile, četudi se stresor, v tem primeru nanocevke, odstrani. Opazimo namreč, da se njihova zmožnost delitve zmanjša za polovico. Sam nanomaterial pri tako visoki koncentraciji torej na celice deluje genotoksično, kot je bilo dokazano že v preteklosti[82].

4.3.3 Interakcija TiO_2-NC s serumski proteini

Ker so v serumu (FBS) prisotni serumski proteini (s koncentracijo 57 μM, po podatkih uradnega proizvajalca, Priloga A), smo torej želeli preveriti, ali taisti serumski proteini na površini TiO_2-NC tvorijo proteinsko korono, ki jo sicer lahko najdemo okoli različnih nanodelcev[17,57,83].

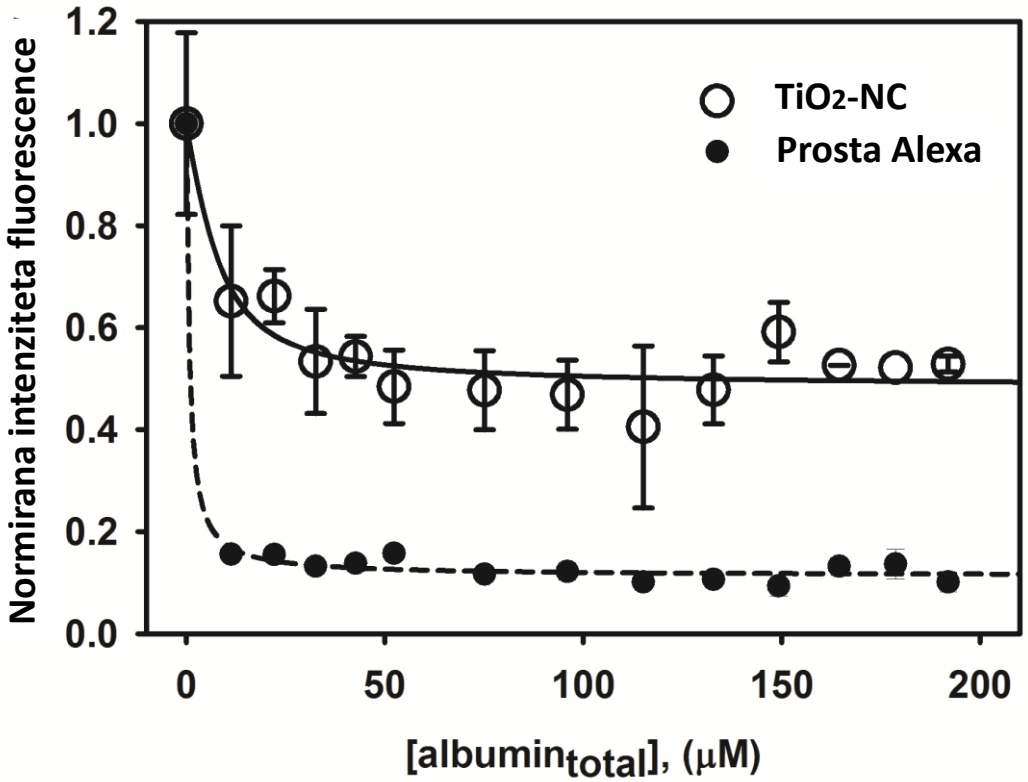
Ker naj bi vezava serumskih proteinov na nanocevke stabilizirala suspenzijo TiO_2-NC, smo le-to preučevali z meritvijo absorpcije UV-VIS v celičnem mediju, ki vsebuje 100 oziroma 1000 μg/ml nanocevk v prisotnosti 10 % FBS ali brez. Absorpcija vzorca nanocevk 1000 μg/ml brez prisotnih serumskih proteinov že takoj na začetku meritve pade za 10 %, kar kaže na hitro posedanje vzorca. Nasprotno, prisotnost serumskih proteinov v celičnem mediju stabilizira nanocevke, saj se absorbcija UV-VIS zmanjša za enak odstotek šele po nadaljnjih 24 urah. Rezultati (slika 18) torej kažejo, da imajo serumski proteini poleg osnovne vloge, torej vezave majhnih molekul (maščobne kisline, vitamini, hormoni, soli, voda,…) in prenosa v celico, stabilizacijsko vlogo, ki s svojo vezavo na samo površino nanocevk preprečujejo njihovo agregacijo. Dobljeni rezultati so v skladu z do sedaj znanimi raziskavami[84]. Naj hkrati poudarimo, da se serumski proteini na površino nanodelcev vežejo z različno afiniteto, sama interakcija je odvisna tako od lastnosti površine nanodelcev kot tudi od vrste prisotnih proteinov. Delci različnih površin imajo v bioloških vzorcih torej različno biološko identiteto, »stanje«, kot ga vidi sama celica. Zavedanje, da so v našem vzorcu nanocevke oplaščene s proteini (proteinska korona), je pomembno dejstvo, ki vpliva tako na stabilnost le-teh, kot tudi na samo interakcijo s celicami.



Slika 18: *Normirana vrednost absorbance TiO_2-NC v celičnem mediju (DMEM) v prisotnosti oziroma brez serumskih proteinov (FBS, 10 %) pri dveh izbranih koncentracijah, 100 in 1000 µg/ml, merjeno z UV-VIS metodo.*

Da bi interakcijo nanocevk s proteini lahko preučevali še podrobneje, smo uporabili z Alexo 488 fluorescenčno označene TiO_2-NC (A-TiO_2-NC) ter interakcijo preverjali z dušenjem fluorescence[45]. Na spektrofotometru smo spremljali fluorescenčni signal serumskih proteinov ter signal označenih nanocevk, ki smo jim postopno dodajali serumske proteine. Pri izbrani koncentraciji 300 µg/ml TiO_2-NC se jasno opazi padec izsevane svetlobe vezane Alexe 488 (slika 19, prazni krogci) kot posledica dušenja fluorescence pri povišani koncentraciji proteinov. Vzrok dušenja so lahko molekularni trki med fluorofori in molekulami, ki dušijo (ang. quencher) (dinamčno dušenje), ali pa nastanek kompleksov fluorofora z dušilcem (statično dušenje)[59]. V obeh primerih morata biti obe molekuli v kontaktu. V našem primeru vlogo dušilca igrajo aminokisline triptofan, tirozin, histidin in metionin, gradniki omenjenih proteinov[85].

Nad koncentracijo serumskih proteinov 50 µM fluorescence ne slabi več, kar kaže na to, da je površina nanocevk popolnoma prekrita s proteini. Nasprotno, signifikantno neprekrito površino nanocevk pri izbrani koncentraciji nanocevk 300 µg/ml lahko dobimo le, če je koncentracija serumskih proteinov nižja od 20 µM. Glede na to, da je pri naših poskusih prisoten 10 % FBS, torej 57 µM raztopina proteinov, lahko učinek neprekrite površine nanocevk opazimo le pri najvišji koncentraciji, torej 1000 µg/ml, kar smo opazili pri MTS testu (slika 16A,B), ki kažejo zaznavni učinek fototoksičnosti le pri najvišji koncentraciji. Naj obenem še omenimo, da kontrolni poskus, pri katerem je prosta Alexa 488 (s koncentracijo 0,6 µM) v interakciji s serumskimi proteini, kaže dušenje fluorescenčnega signala za 80 % že takoj ob minimalnem dodatku serumskih proteinov (10 µM) k vodni raztopini Alexe 488, kar jasno kaže, da se sicer prosta Alexa 488 na proteine veže zelo močno. Primerjava dveh tako različnih titracijskih krivulj več kot očitno kaže, da je v našem primeru fluorofor Alexa 488 močno vezan na površino nanocevk, hkrati pa isti rezultati potrjujejo vezavo serumskih proteinov na nanocevke, kar so kazali tudi naši predhodni poskusi.



Slika 19: *Normirana intenziteta fluorescenčnega signala označenih nanocevk (A-TiO_2-NC) kot potrditev intermolekularne interakcije nanocevk s serumskimi proteini.* Prazne pike prikazujejo padec fluorescenčnega signala fluorofora, vezanega na nanocevke, polne pike prikazujejo padec jakosti fluorescenčnega signala prostega fluorofora v vodi (kontrola). Rezultat je povprečje dveh neodvisnih meritev.

Ocenili smo, da je za popolno prekritje ene nanocevke potrebno približno 50 molekul albumina (albumin predstavlja 74 % vseh serumskih proteinov, podatek proizvajalca, Priloga A). Pri oceni smo upoštevali velikost molekule albumina ter površino posamezne TiO_2-NC, ocenjene iz TEM posnetkov (slika 10B). Z uporabo preprostega modela vezave (natančneje razloženo v Prilogi A) ocenjujemo, da se na nanocevke veže od 1 do 7 molekul albumina z disociacijsko konstanto med 1 in 4 μM. S tem ostane pri koncentraciji nanocevk 1000 μg/ml 10 do 30 % površine neprekrite, kar se odraža kot porast fotogeneriranih radikalov (okoli 10 %) kot tudi same viabilnosti celic (slika 16A). Koncentracija proteinov, pri katerih je izraženo nasičenje površine nanocevk (50 μM), je ravno koncentracija, ki je uporabljena v celičnih poskusih (10 % FBS). Če upoštevamo, da smo z UV-VIS spektroskopijo ocenili koncentracijo označenih nanocevk (A-TiO_2-NC) na 300 μg/ml, rezultat še bolj jasno pojasnjuje, zakaj fototoksičnega učinka na celicah nismo zaznali pri koncentracijah, nižjih od 1000 μg/ml. Pri najnižjih koncentracijah cevk je proteinov več kot dovolj, da je celotna površina cevk prekrita, v mediju pa so še vedno prisotni nevezani proteini. Pri koncentraciji 1000 μg/ml pa določena površina ostaja neprekrita, kljub temu da se vsi proteini vežejo na površino nanocevk (prekritost je seveda dinamična). Tako proste cevke oziroma deli cevk, ki niso prekriti, ob prisotnosti UV svetlobe producirajo radikale, ki lahko spremenijo viabilnosti MCF-7 celic (slika 16).

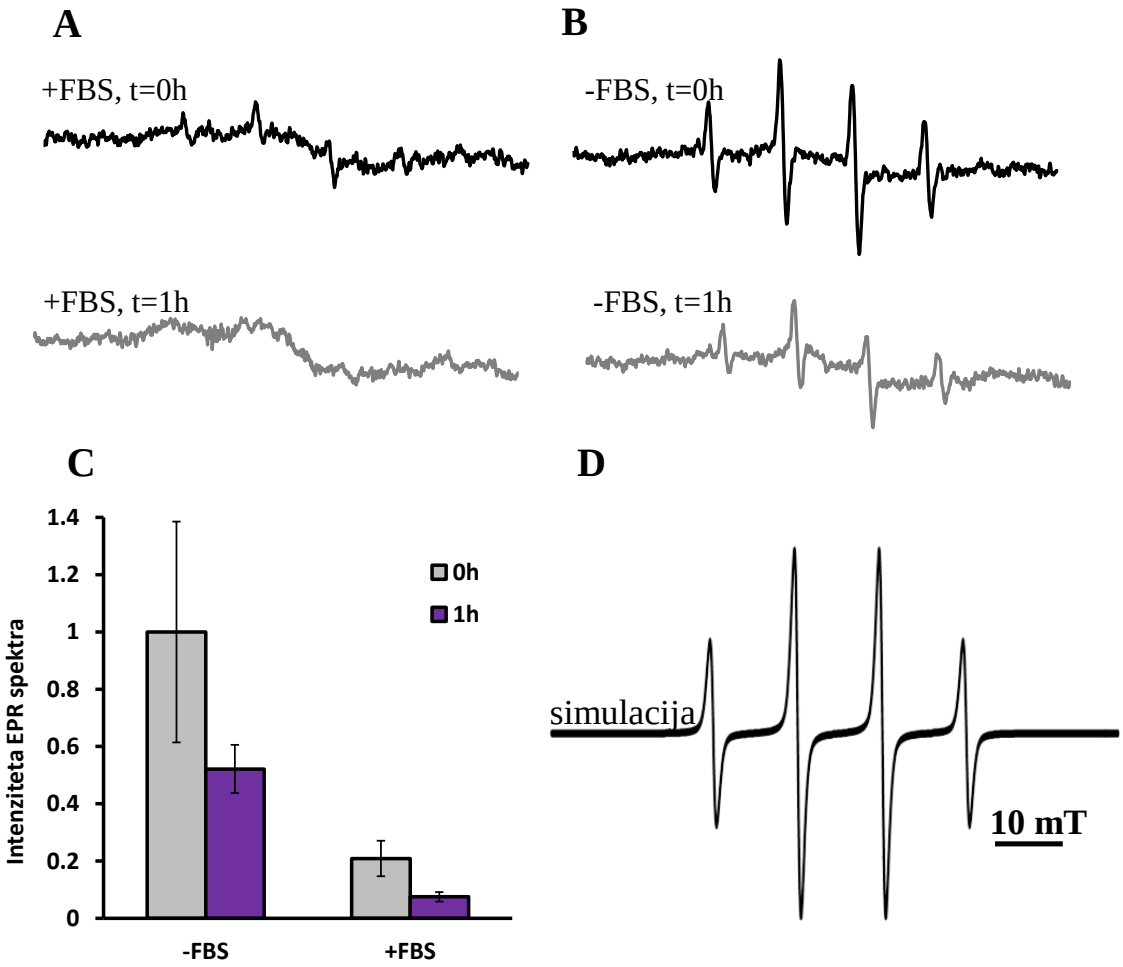
V nadaljevanju smo našo oceno želeli potrditi tudi z metodo spinskega lovljenja radikalov na EPR spektrometru.

4.3.4 Tvorba radikalov prostih ali prekritih TiO_2-NC

Da bi razumeli vpliv proteinske korone na radikalsko tvorbo ob prisotnosti UV svetlobe, smo izmerili produkcijo kratkoživih radikalov TiO_2-NC v pogojih, primerljivih celičnim poskusom. Nanocevke smo razpršili v celičnem mediju v prisotnosti serumskih proteinov (10 % FBS) ter dodali spinski lovilec DMPO (5,5-dimetil-piroline N-oksid). Le-ta kratkožive OH radikale pretvori v stabilen DMPO-OH adukt, ki ga lahko detektiramo na EPR spektrometru. Sama intenziteta EPR spektra je sorazmerna koncentraciji DMPO-OH adukta, ta pa je v približku, ko lovljenje ni krajevno odvisno (»diffusion limited)«, tudi sorazmerna koncentraciji OH radikalov oz. sposobnosti fotogeneracije radikalov.

Posneli smo EPR spekter obsevanih nanocevk, tako v prisotnosti kot odsotnosti serumskih proteinov (slika 20A,B), ter določili njegovo intenziteto. V obeh primerih smo s simulacijami oblike spektrov potrdili, da je izmerjeni spekter karakterističen za DMPO-OH radikale (slika 20D). Padec števila ujetih radikalov v prisotnosti serumskih proteinov na približno 20 % (sivi stolpiči na sliki 20C) se zelo dobro ujema z oceno, da je 10–30 % površine nanocevk neprekrite. Ker pa se neprekrite TiO_2-NC posedajo hitreje kot prekrite (slika 18), smo s časom pričakovali tudi upad signala spinsko ulovljenih radikalov, ki je sorazmeren številu neprekritih, a dispergiranih TiO_2-NC. Ker se slednje posedajo, ne morejo prispevati k EPR signalu, kar jasno opazimo na sliki 20C (vijolični stolpiči). Oboje skupaj zato dobro potrjuje našo hipotezo o proteinski mediaciji radikalske tvorbe.

Ker je produkcija fotovzbujenih radikalov možna le na površini nanocevk, jo lahko detektiramo le, če so spinski lovilci blizu površine nanocevk prisotni v zadostnem številu. V nasprotnem primeru bi lahko upad radikalskega signala pojasnili s pojavi, vezanimi na porazdeljevanje ali kemijo spinskega lovilca, ne pa z vlogo proteinov v neposredni bližini površine nanocevk. Poleg tega, da bi se lahko radikali lokalno anihilirali, pa so spinski lovilci, kot je DMPO, tudi zelo reaktivne molekule in lahko npr. tvorijo nitrokside, podobne DMPO-OH aduktu, tudi po poti mehanizma, ki ne vključuje OH radikalskega lovljenja[86]. V izogib možni napaki smo zato izvedli kontrolni poskus s 30 % etanolom (v/v), ki ga lahko apliciramo v precej višjih koncentracijah, prevzame pa vlogo primarnega lovilca fotogeneriranih OH radikalov, saj jih pretvori v hidroksietil radikal. Slednjega pa DMPO lovi v tipični hidroksietil-DMPO adukt (Priloga, slika A5), ki je vezan izključno na primarno generacijo OH radikalov na površini cevk. S tem dodatnim eksperimentom smo torej potrdili, da smo z DMPO dejansko merili fotoaktivnost nanocevk.



Slika 20: *EPR spektri generiranih hidroksilnih radikalov TiO_2-NC ob obsevanju z UV svetlobo 365 nm.* Vzorec TiO_2-NC v celičnem mediju z 10 % FBS, izmerjen takoj, ter enak vzorec, ki je pred meritvijo v temi stal eno uro (A). Vzorec TiO_2-NC v celičnem mediju brez seruma, pomerjen takoj oziroma pomerjen po eni uri inkubacije v temi (B). Povprečne vrednosti pomerjenih intenzitet EPR signala, prikazani rezultati so prikazani kot povprečje 10 neodvisnih meritev (C). Simulacija izmerjenega EPR spektra (D).

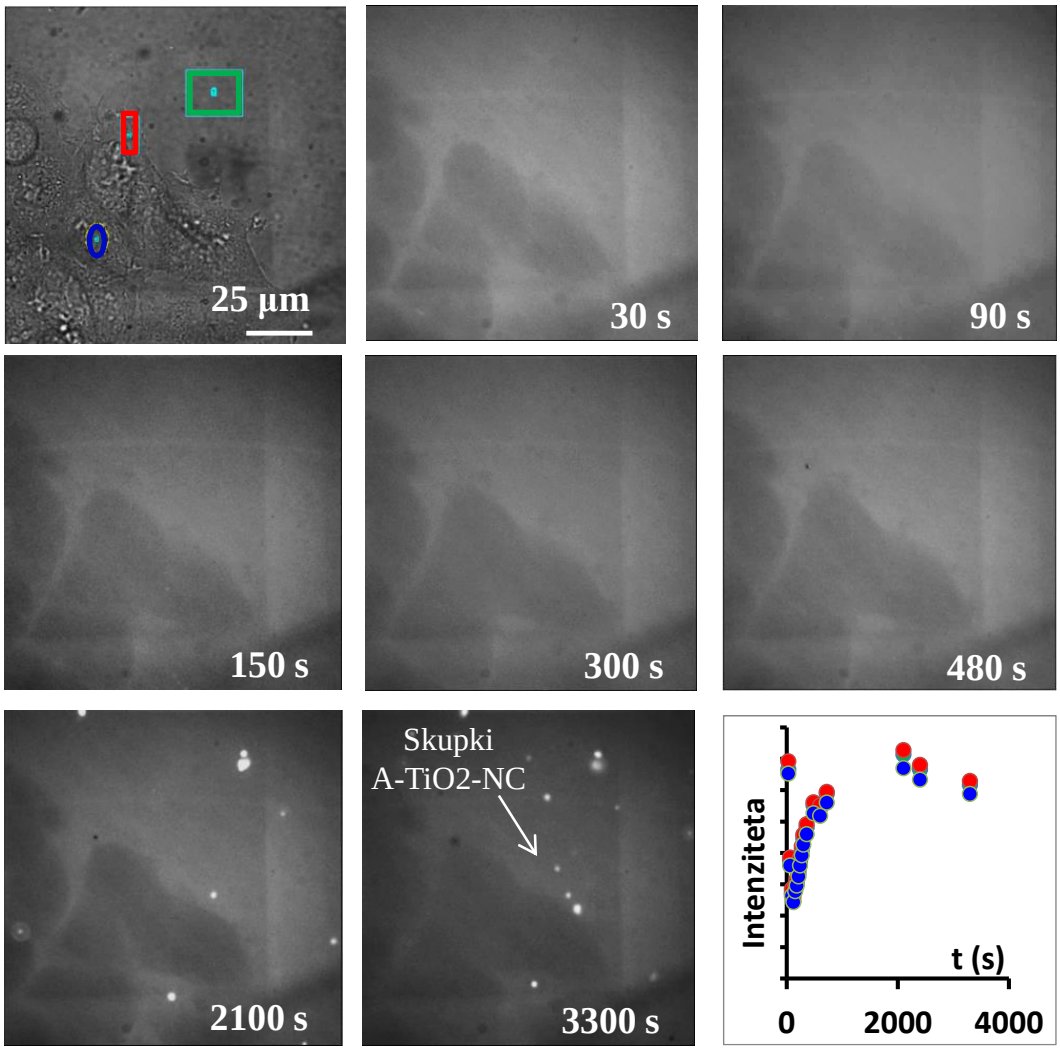
Podporne meritve nam torej dobro razjasnijo, zakaj naše TiO_2-NC kljub svoji odlični fotoaktivnosti pri nizkih koncentracijah nanocevk ne kažejo fototoksičnih lastnosti. Odgovor je interakcija serumskih proteinov s površino nanodelcev, proteini na površini cevk v nadaljevanju namreč prestrežejo generirane radikale. Bolj natančno, odgovor se skriva v razmerju prisotnih serumskih proteinov s površino nanodelcev. Pri tem je potrebno izpostaviti pomembno dejstvo, da albumin, visoko zastopani predstavnik seruma, vsebuje cisteinski ostanek, kar pomeni prisotnost tiolov. Te proste sulfhidrilne skupine igrajo *in vivo* najpomembnejšo vlogo lovilcev prostih radikalov v plazmi[87]. Enako je tudi v našem primeru, kjer albumini s tiolnimi skupinami prestrezajo radikale, zaradi česar slednji ne dosegajo samih celic, fototoksičnost pa je močno zmanjšana.

4.4 Interakcija A-TiO_2-NC s celicami – mikroskopske in mikrospektroskopske meritve

Ob ugotovitvi, da so proteini v koroni ključni za modulacijo fototoksičnosti, nas še toliko bolj zanima, od kod izvira toksičnost nanocevk, torej učinek, ki smo ga potrdili v celičnem poskusu (slika 16A, rdeči stolpiči). Da bi odgovorili na to vprašanje, smo se najprej usmerili v študijo na nivoju posamezne celice, kjer bomo lažje identificirali

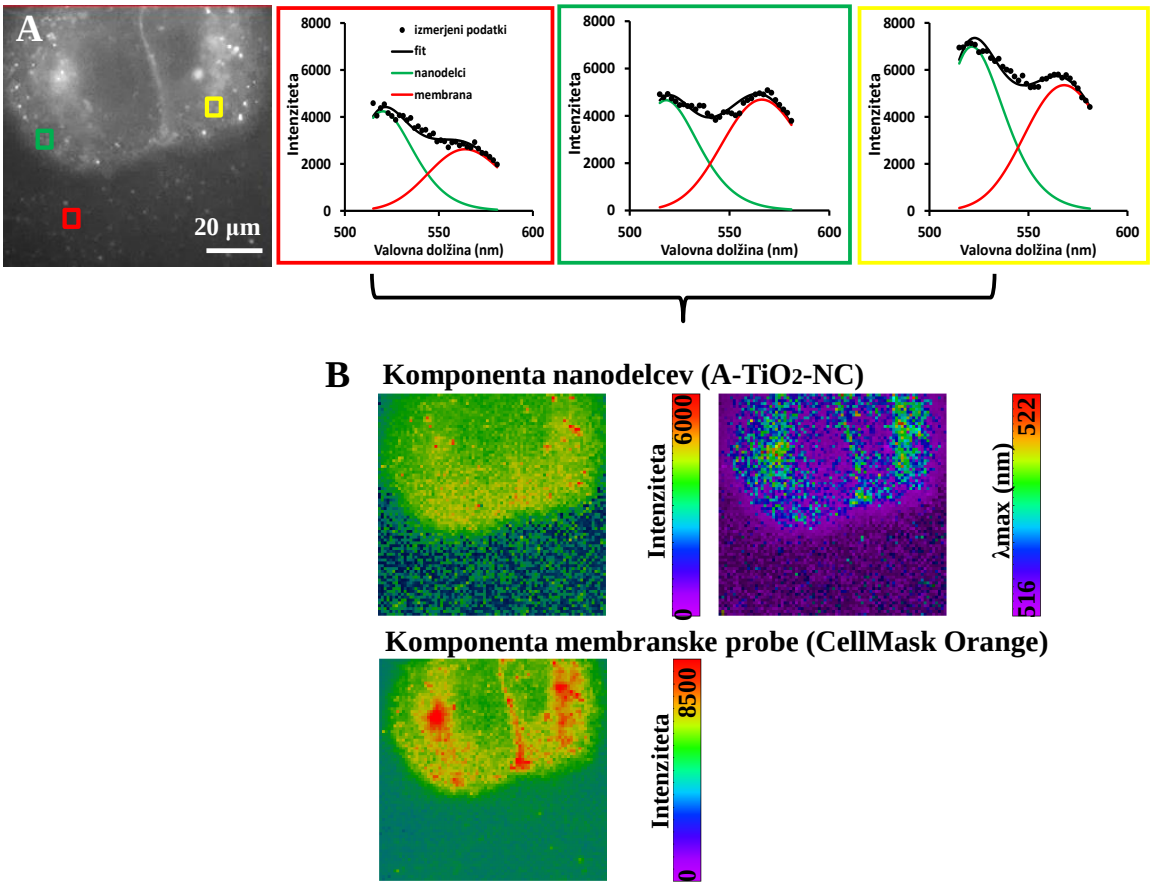
mehanizem toksičnosti kot bi ga na nivoju celotne populacije. Preučevali smo dinamiko prehoda nanocevk čez celično membrano, torej plazmalemo. V ta namen smo fluorescenčno označene nanocevke dodali MCF-7 celicam in tokrat brez dodatnega obsevanja spremljali interakcije v različnih časovnih okvirjih. Pričakovane spremembe smo beležili takoj po dodatku nanocevk kot tudi skozi daljše obdobje enega dne s tipično inkubacijo čez noč. Spremembe v vzorcu smo opazovali s tehniko konfokalne fluorescenčne mikroskopije (FMS) ter v spektralni obliki izsevanega spektra fluorescirajočih nanocevk preko celotnega vidnega polja iskali spremembe molekularnega okolja nanocevk.

Na fluorescenčnem mikroskopu smo fluorescenčno neoznačenim celicam sprva dodali fluorescenčno označene nanocevke A-TiO_2-NC z vezanim fluoroforom Alexa 488 SDP ester. Takoj po dodatku smo v izbranih časovnih presledkih beležili vstop le-teh v celico ter v nadaljevanju tudi prerazporeditev znotraj celice. Predpostavili smo, da so prav časi takoj po dodatku nanocevk celicam, ključni za razumevanje energijsko neodvisnih mehanizmov vstopa. Razmeroma nizek fluorescenčni signal v začetnih časih posameznih nanocevk oziroma skupkov, ki (ne)regulirano prehajajo plazmalemo, pa je bil žal podobno šibak kot signal same avtofluorescence celic, zaradi česar je bila analiza mikrospektroskopskih slik nezanesljiva, saj je še bolj poudarila probleme s sipanjem emisijske svetlobe nanocevk, ki niso v konfokalni ravnini. Pri dobro kontrastnem vzorcu bi bil delež sipane svetlobe zanemarljiv, v našem primeru pa ne prav zaradi majhne koncentracije nanocevk v razmerju s koncentracijo vseh autofluorescirajočih delcev v okolici (slika 21). Edini ponovljivo izmerjen pojav je detekcija skupkov nanocevk v obliki agregatov, velikih nekaj μm.



Slika 21: *Interakcija MCF-7 celic s fluorescenčno označenimi A-TiO₂-NC (100µg/ml) v mediju s serumom pri sobni temperaturi.* Konfokalna fluorescenčna mikroskopija neoznačenih celic takoj po dodatku fluorescenčno označenih nanocevk v odvisnosti od časa. Barvna območja označujejo mesto, od koder smo v vsaki časovni točki beležili intenziteto fluorescenčnega signala nanocevk. Z naraščanjem koncentracije nanocevk v neposredni bližini celic narašča tudi število agregatov.

Ker se je pri zgornjem poskusu izkazalo, da je spremljanje spremembe fluorescenčnega signala nanocevk preko neoznačene plazmaleme problematično, smo v nadaljevanju poskus nadgradili tako, da smo plazmalemo predhodno označili s fluorescenčnim označevalcem *CellMask Orange plasma membrane stain*. V načinu mikrospektroskopije smo posneli stanje celice pred dodatkom nanocevk, torej celice le z označeno plazmalemo. Celicam v mediju s serumom smo previdno dodali označene nanocevke A-TiO₂-NC, inkubirali cca 30 min na mizici mikroskopa (na sobni temperaturi), nato pa vzorec dobro sprali s svežim medijem. Spiranje nam je zagotovilo, da smo nevezane nanocevke, torej tiste, ki niso interagirale s celico, odstranili. S tem smo zagotovili dobro določeno membrano (CellMask Orange), pa tudi boljši krajevni ter mikrospektroskopski kontrast v signalu. Obe stanji, pred dodatkom ter po dodatku nanocevk, smo v nadaljevanju analizirali.



Slika 22: *Fluorescenčno-mikrospektroskopska slika MCF-7 celic, predhodno označenih z membranskim označevalcem CellMask Orange (1,2 µM), temu je sledila 10 min inkubacija fluorescenčno označenih nanocevk (A-TiO₂-NC v cličnem mediju z 10 % FBS).* A) Ob originalni fluorescenčni sliki so prikazani primeri razstavljanja spektrov na treh lokacijah, ki so označene na sliki. Barva roba posamezne spektralne analize ustreza barvam ustreznih lokacij na sliki A (rdeča – zunaj celice, zelena – v bližini plazmalemo, rumena – znotraj celice). Izmerjeni spekter posameznega območja je vsota dveh pripadajočih fluorescirajočih komponent, komponente nanocevk (bolj natančno signal fluorova Alexe 488, vezanega na same TiO_2-NC) ter komponente membranskega označevalca (fluorescenčni signal označevalca CellMask), katerih delež se po območjih neodvisno spreminja. B) Fluorescenčna slika pod A, ki je analizirana preko območij 5x5 pikslov in razstavljena na pripadajoči spektralni komponenti, je kodirana po intenziteti in položaju spektralnega vrha (λmax) komponente nanocevk ter intenzitete komponente membranskega označevalca, kot je prikazano na soležnih legendah.

Fluorescenčno-mikroskopska slika (slika 22A) prikazuje MCF-7 celice, sprva označene z membranskim označevalcem CellMask Orange in v nadaljevanju inkubirane 10 min s fluorescenčno označenimi nanocevkami. Poskus, zastavljen na takšen način, razkriva predvsem to, da je spiranje vzorca po inkubaciji z delci ključnega pomena, saj zmanjšuje signal nevezanih delcev v celičnem mediju, kar ključno izboljša kontrast. V vsaki točki vidnega polja vzorca s FMS načinom snemanja dobimo obliko izsevane svetlobe, ki je vsota prispevka izsevane svetlobe fluorescenčnega membranskega označevalca ter prispevka izsevane svetlobe fluorescenčno označenih nanocevk. V nadaljevanju izmerjeni spekter razstavimo (ang. linear unmixing) na pripadajoče komponente posameznih fluoroforov, tako lahko v vsaki točki vidnega polja določimo spektralno obliko posamezne komponente. Razstavljanje izmerjenega spektra temelji na predhodno znanih spektralnih lastnostih posameznega fluorofora, kot je položaj spektralnega vrha (λmax), asimetrija (a), širina spektra (w), hitrost bledenja (b).

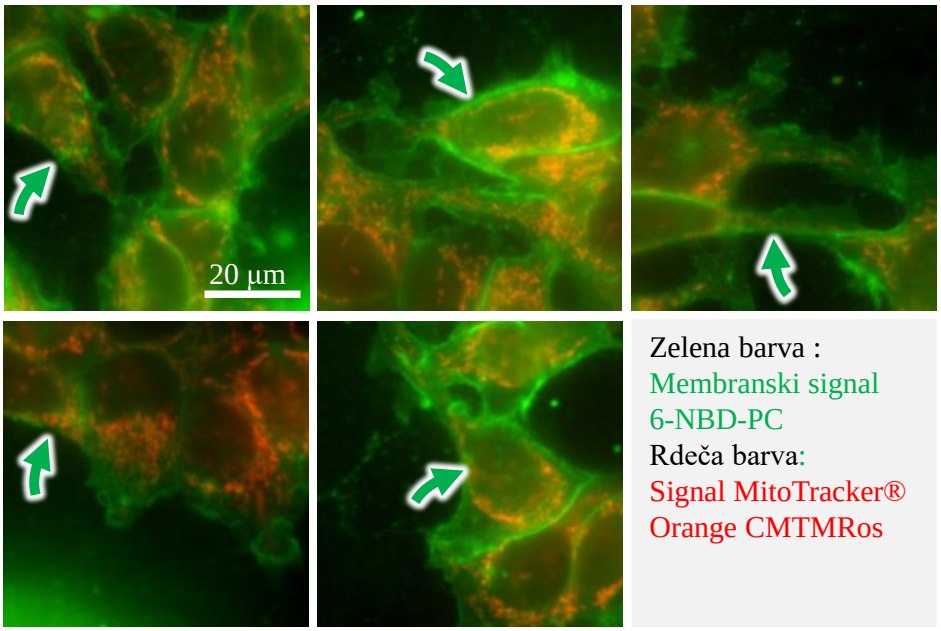
Ker nas zanima intenziteta posameznega fluorescenčnega označevalca ter položaj

spektralnega vrha fluorofora, vezanega na nanocevke, slike ustrezno barvno kodiramo, kot kaže primer (slika 22B). Rezultati kažejo, da po 10 min inkubaciji signal nanocevk zaznamo tako v membrani kot znotraj celice, pri čemer je v obeh primerih več nanocevk znotraj kot zunaj celice. Dodaten rdeči premik spektralnega vrha komponente nanocevk kaže na agregacijo nanocevk, kjer se zaradi pojava homoFRETa kot opaženo premakne vrh fluorescenčnega spektra k višjim valovnim dolžinam (slika 22B)[88,89].

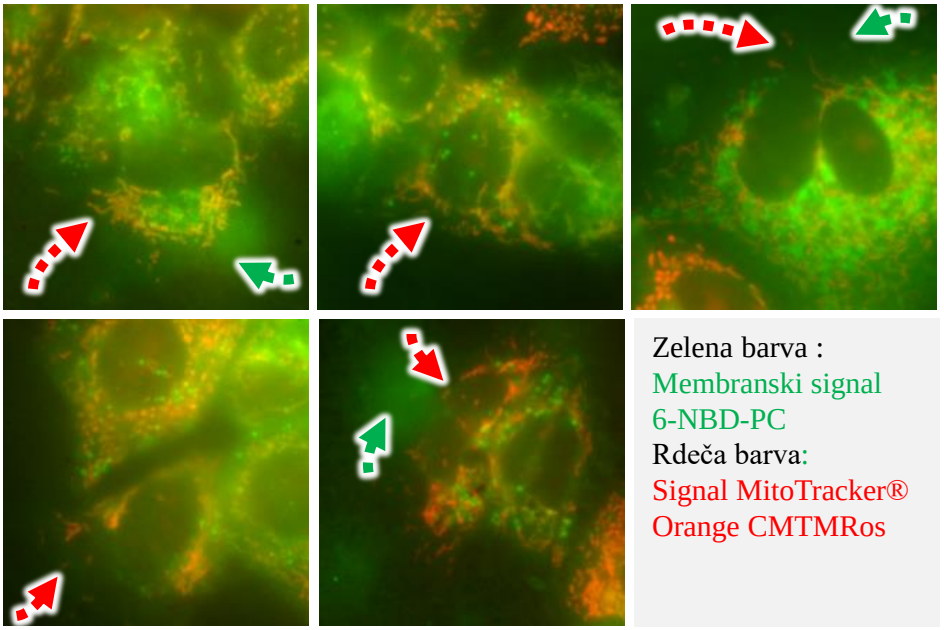
4.5 *In vitro* fluorescenčna mikroskopija MCF-7 celic v prisotnosti TiO_2-NC

V prejšnjem poskusu smo opazili, da je signal nanocevk prisoten povprek preko celotnega dela celice, zaradi česar ni bilo mogoče dovolj dobro opazovati morebitnega spreminjanja membranskih struktur kljub barvanju z ustreznim barvilom. Da bi lahko pridobili informacijo o morebitnih membranskih spremembah, smo prejšnji poskus obrnili in tokrat označili le membrane, ne pa tudi nanocevk.

A MCF-7 celice z intaktno plazmalemo (kontrola)



B MCF-7 celice z razpadlo plazmalemo (celic inkubirane s TiO_2-NC)



Slika 23: *Celice MCF-7 inkubirane s TiO_2-NC (1000 µg/ml)brez prisotnih serumskih proteinov*. Dvobarvni kompozit, kjer zelena barva predstavlja signal membranskega označevalca (6-NBD-PC) in rdeča barva signal fluorescenčnega označevalca, ki specifično barva vitalne mitohondrije (Mitrotracker Orange® CMTMROS). A) Polne zelene puščice označujejo nepoškodovano celično membrano, plazmalemo. B) Prekinjene zelene puščice označujejo mitohondrijski signal, katerega lokacija se nahaja zunaj območja celice. Prav tako prekinjene zelene puščice označujejo meglice membranskega signala, ki ni jasno določen kot v kontrolnem primeru.

Med samo inkubacijo TiO_2-NC s celicami MCF-7 ter spremljanjem celične morfologije že prvi dan po dodatku nanocevk opazimo destabilizacijo celične plazmaleme. Kontrolne celice, katerih plazmalema je označena s fluorescenčnim

označevalcem 6-NBD-PC (slika 23, zeleni signal), kažejo dobro definirano membransko strukturo, ki dobro loči posamezno celico od okolice. Nasprotno pa tretirani vzorci na nekaterih mestih kažejo slabo določeno celično mejo, membranski signal pa kot meglico identificiramo v širšem območju vzorca (slika 23B, zelene prekinjene puščice). Domneva o spremenjeni celični morfologiji tretiranih vzorcev je bila v nadaljevanju še dodatno potrjena z označevanjem mitohondrijskih struktur, s fluorescenčnim označevalcem Mitotracker® (slika 23, rdeči signal). Mitotracker® je permeabilno fluorescentno barvilo, ki barva mitohondrije viabilnih celic, jakost signala posameznega mitohondrija pa je odvisna od napetosti membranskega potenciala, torej od same živosti mitohondrija. Analiza tretiranih vzorcev je namreč kazala na to, da se določeni aktivni mitohondriji posamezne celice nahajajo daleč stran od samega jedra, brez določene organizacije (slika 23B, rdeče prekinjene puščice). Zdi se celo, kot da so naključno raztreseni v prostoru, kar še dodatno podpira našo predpostavko o možni membranski dezintegraciji kot posledici interakcije s TiO_2-NC.

Interakcije s plazemsko membrano v literaturi ni tako enostavno izslediti, drugače pa je v primeru lizosomske membrane. Iz literature je namreč dobro znano, da imajo serumski proteini veliko vlogo pri sami interakciji nanodelcev s celicami, saj se ti zelo radi (v večini) vežejo na površino nanodelcev in tvorijo proteinsko korono[1]. Proteinska korona tako v nadaljevanju zmanjšuje verjetnost neposrednega kontakta nanodelcev s celično membrano, tako oblečeni delci v večini primerov v notranjost celice prehajajo preko reguliranih, energijsko odvisnih poti[57]. Takšni delci preko endosomskih veziklov nadaljujejo do lizosomov, kjer je proteinska korona zaradi lizosomske narave razgrajena[2], gola površina nanodelcev pa končno lahko interagira z lipidnim dvoslojem, tokrat z lizosomsko membrano, ki je tako izpostavljena neposrednemu kontaktu na površini nanodelcev. Lizosomska membrana začne puščati, usoda takšne celice se navadno konča z apoptozo. Do zdaj pa ni bilo jasno, kaj je glavni vzrok puščanja lizosomske membrane. Prav možno bi bilo, da je razgradnja lizosomske membrane posledica neposredne interakcije z nanodelci.

Na drugi strani pa je sama proteinska korona dinamična, saj se na površini nanodelcev izmenjujejo proteini z različno afiniteto[16], zaradi česar vedno obstaja možnost neprekrite površine, ki omogoča neposredni kontakt s plazmalemo, ki prav tako kot lizosomska membrana morda zaradi neposredne interakcije z nanodelci lahko razpade.

Na nivoju celice pa zaradi kompleksnosti membrane mehanizma prehoda nismo mogli pojasniti. Celica se je kot samostojna enota z vsemi komponentami, ki omogočajo lasten obstoj, s sposobnostjo delitve na eni strani ter sposobnostjo odločitve o načrtovani smrti (apoptoza), s selektivnim ter aktivnim vstopom potrebnih snovi iz okolice, v tej točki izkazala za preslabo definiran sistem. Tako smo za nadaljnja preučevanja interakcij nanodelcev z biološkimi membranami ter za razumevanje dinamike prehoda nanodelcev izbrali dobro uveljavljen sistem za preučevanje interakcij, sistem modelnih membran.

4.6 Interakcija TiO_2-NC z modelnimi lipidnimi membranami, preučevana s FRET FMS metodo

Za preučevanje biofizikalnih interakcij z nanodelci je primarna celična membrana s svojo kompleksno sestavo iz množice lipidov in proteinov prezahteven sistem. Zato smo v nadaljevanju za preučevanje izbrali bolje definiran sistem modelnih lipidnih membran[90], orjaške eno ali več lamelarne liposome (GUV). Izbrana gradnika lipidnega dvosloja sta bila dva lipida, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoholin (DOPC) ter nabiti lipid, ki nastalemu lipidnemu dvosloju daje negativno nabitost, 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfo-(1-rac-glicerol) (PG). Mešali smo jih v dveh razmerjih, liposomi z 10 % nabitega lipida (GUV10) ter liposomi s 50 % nabitega lipida (GUV50). V tem sistemu smo poskušali odgovoriti na

vprašanje, ali lahko naše nanocevke interagirajo z lipidnim dvoslojem kot osnovno komponento membrane, neposredno, torej mimo interakcije z membranskimi proteini.

Da bi razumeli mehanizem interakcije TiO_2-NC s čistim lipidnim dvoslojem v realnem času, smo uporabili pojav fluorescenčnega resonančnega prenosa energije (FRET). Slednjega smo zabeležili z uporabo sistema FMS, torej s prostorsko in hkrati spektralno analizo fluorescenčne izsevane svetlobe[64,91] (natančna metodologija je opisana v poglavju materiali in metode). V ta namen smo morali sestaviti par fluorescenčnih označevalcev, prvega kot donorja energije, drugega pa kot prejemnika energije. Tako smo TiO_2-NC fluorescenčno označili s fluoroforom Alexa 488 SDP (A-TiO_2-NC, donor FRET), membrane liposomov pa s fluorescenčnim lipidnim analogom Bodipy 530/550 (PC-Bodipy, prejemnik).

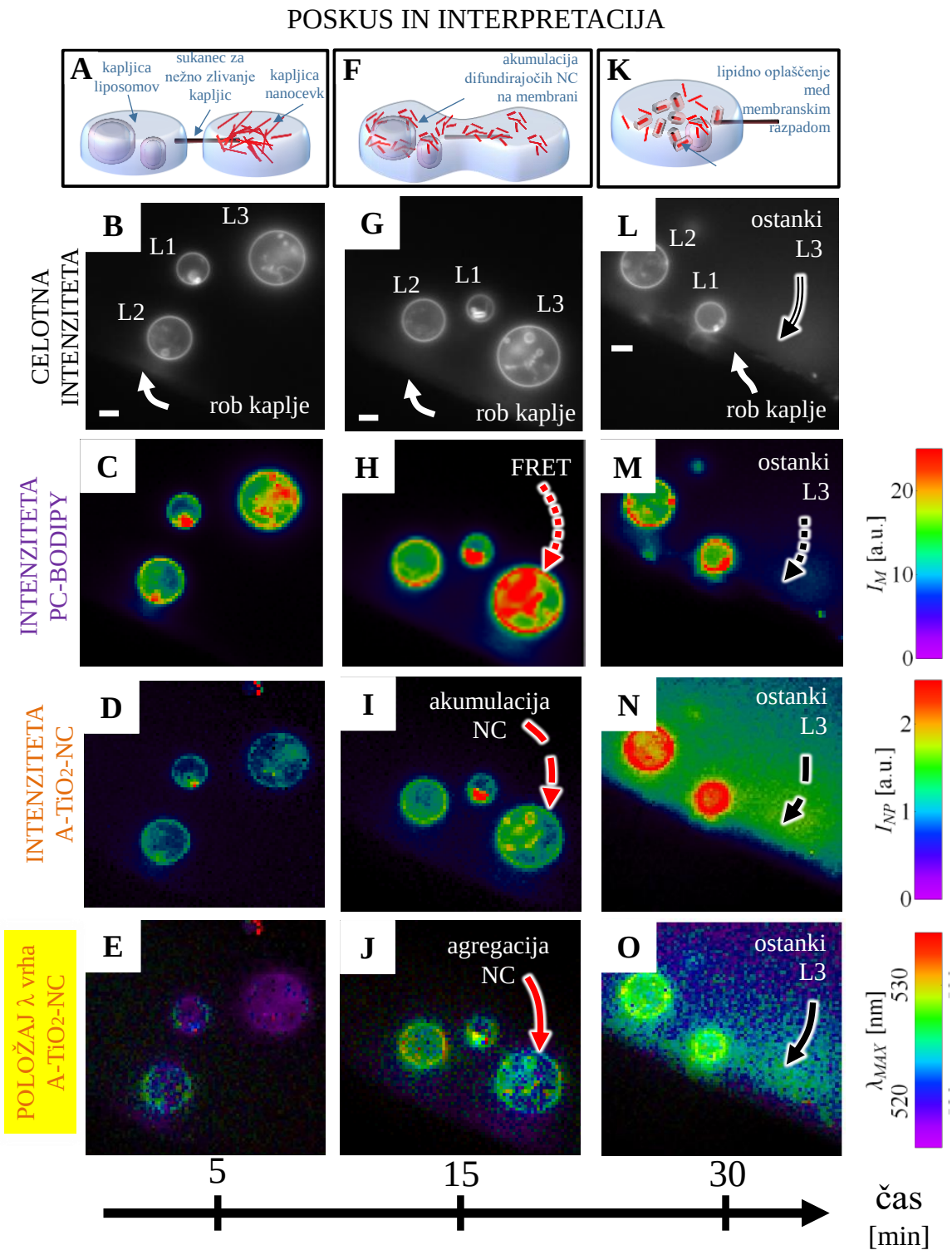
Fluorescenčni resonančni prenos energije (FRET) je tehnika, ki je zaradi močne odvisnosti od medmolekularne razdalje zelo priljubljena v membranski biofiziki, saj na ta način zazna molekularno bližino. Uporabnost se je izkazala v številnih primerih, npr. mapiranje membranskih proteinov, študije o heterogenosti membran (membranske domene), ugotavljanje položaja fluorescentnih označevalcev v sami membrani, študije o proteinsko-lipidni selektivnosti, študije o oligomerizaciji membranskih lipidov. V začetkih je bila tehnika uporabljena zgolj v spektroskopiji, danes pa se vse bolj uporablja kot koncept FRET kontrastiranja v mikroskopiji[89].

Kot rečeno, izbrana fluorofora ustrezata tako imenovanemu FRET paru. Za takšen par velja, da ob razdalji, manjši od nekaj nm, del energije »donorja«, v našem primeru Alexe 488 (ki je vezana na nanocevko), prenese na »prejemnikovo« molekulo, v našem primeru molekulo Bodipy 530/550, ki je porazdeljena v lipidni membrani. Rezultat takšnega prenosa je porast membranskega (PC-Bodipy) signala, ki ga interpretiramo kot neposredno bližino nanocevk ter membranskih lipidov. Če želimo z gotovostjo potrditi FRET, moramo nedvoumno zabeležiti (razklopiti) oba fluorescenčna signala, torej signal A-TiO_2-NC kot tudi signal PC-Bodipy, pri čemer je še najtežje dobiti signal membranskega označevalca brez nanocevk. Ker slednje zahteva hkratno analizo na različnih koncih vzorca, kjer je koncentracija nanocevk različna, smo sestavili posebej prilagojen eksperimentalni sestav. Tako smo na mikroskopu s pomočjo bombažnega sukanca nežno zlili vodno kapljico liposomov z vodno kapljico z nanocevkami (slika 24A), kar je vodilo v počasen porast signala nanocevk v neposredni bližini liposomov. Fluorescenčni emisijski spekter smo v nadaljevanju beležili še kakšno uro s 5 min koraki, temu pa je sledilo razstavljanje[64] posnetih spektrov (slika 25A), s čimer smo lahko določili vrednost intenzitete kot ostale spektralne lastnosti vsakega posameznega fluorofora (kot primer, iz liposoma L1, L2 in L3 na sliki 24C, D in E).

Ko so nanocevke difundirale proti liposomom (slika 24F), je signal A-TiO_2-NC na sami membrani liposomov vedno presegal signal nanocevk iz okolice (slika 24I, slika 25B, E), kar kaže na akumulacijo nanocevk na sami membrani (rdeča prekinjena puščica na sliki 24I ter sliki 25C,F). V nadaljevanju smo opazili tudi spektralni premik A-TiO_2-NC v rdeče (rdeča puščica na sliki 24J in sliki 25D,G), kar kaže na t. i. pojav homo-FRET[88,89], ki je lahko zgolj posledica agregacije in tesnega kopičenja nanocevk na membrani. Koncentriranje in agregiranje nanocevk na membrani torej vzpostavlja potrebne pogoje za FRET. Tega res opazimo v porastu PC-Bodipy signala (rdeča prekinjena puščica na sliki 24H ter na sliki 25F, primer za liposom L3). Porast PC-Bodipy signala lahko razložimo le s FRET pojavom, ki je v našem primeru mogoč le, ko so A-TiO_2-NC nekaj nm oddaljene od membrane liposomov (oz. od PC-Bodipy).

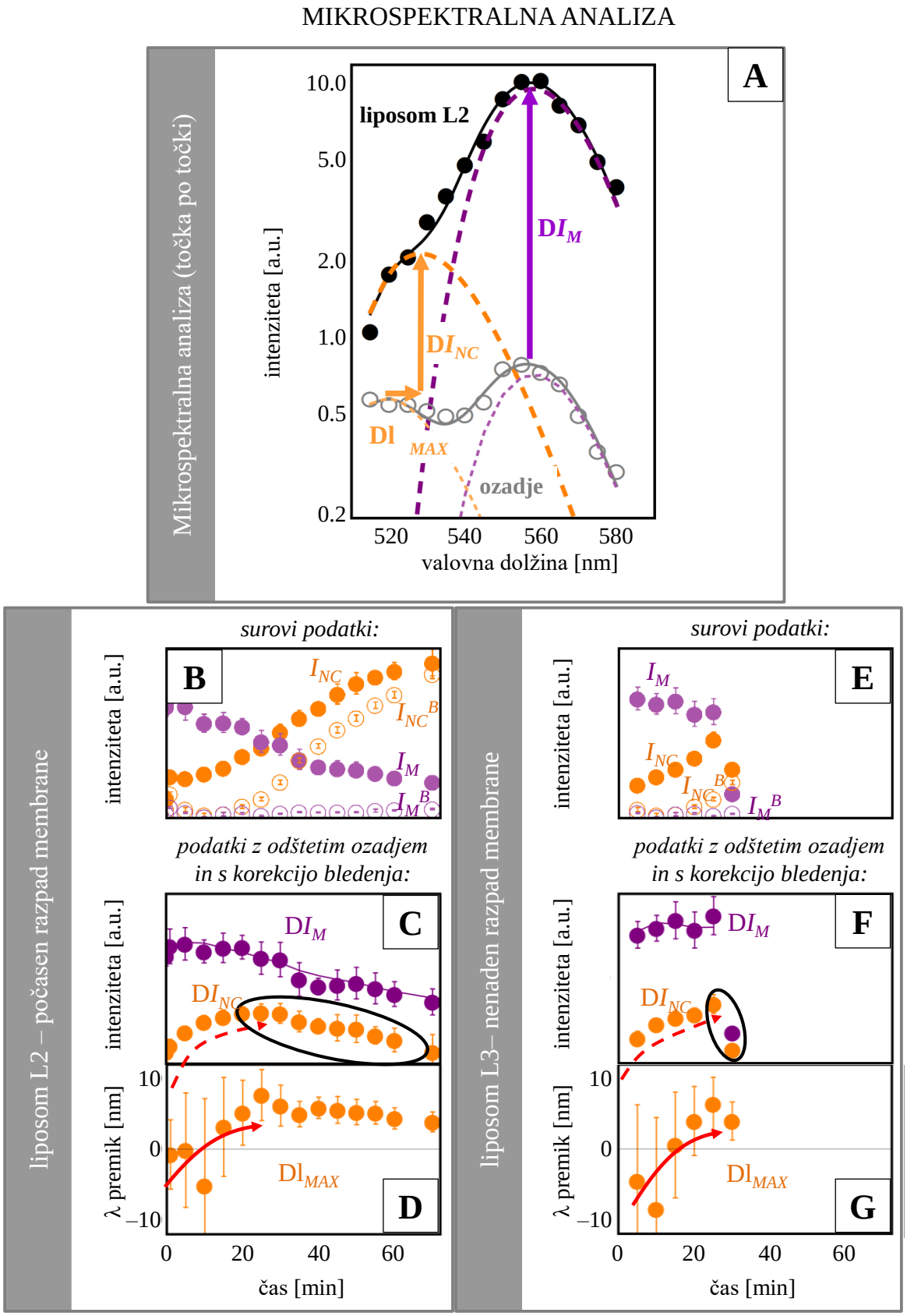
Pozorno sledenje akumulaciji nanocevk na lipidni membrani privede do še bolj dramatičnih opažanj. Kmalu po tem, ko membrana liposoma postane mehka, namreč popolnoma izgine. Za njo ostane le meglica PC-Bodipy signala. Na sliki 24M je prikazan primer izginotja liposoma L3, označeno s črno prekinjeno puščico, kot tudi na sliki 25F

(zadnja vijolična pika). Takšen dogodek očitno pomeni zmanjšanje velikosti membranskih struktur za dva velikostna razreda – nekaj deset mikronov velik liposom torej razpade v mnoge mnogo manjše membranske objekte z velikostjo pod ločljivostjo optičnega mikroskopa (slika 24L). Na mestu razpadlega liposoma poleg membranskega signala še vedno ostaja prisoten tudi visok signal A-TiO_2-NC (črna prekinjena puščica na sliki 24N).



Slika 24: *Destabilizacija modelne lipidne membrane v prisotnosti TiO_2-NC, opažena s fluorescenčno mikrospektroskopijo.* A) Liposomska kapljica je s pomočjo sukanca nežno zlita s

kapljico nanocevk. B) Gruča liposomov je opazovana na robu kapljice, s čimer je zagotovljeno minimalno premikanje liposomov v času opazovanja. Merilo na slikah B, G in L predstavlja 10 μm, nizi slik v odvisnosti od valovne dolžine so posneti vsakih 5 min, celoten čas meritve pa traja dobro uro. C) Intenziteta membranske komponente (PC-Bodipy), D) intenziteta komponente nanocevk (A-TiO_2-NC) ter E) premik spektralnega vrha A-TiO_2-NC 5 minut po zlitju kapljic, F) čemur sledi difuzija nanocevk proti liposomom. G) Slika, nastala z uporabo širokopasovnega emisijskega filtra, ne razkriva razlik med posameznimi liposomi, medtem ko H) spektralno razstavljanje razkriva porast PC-Bodipy signala kot posledico I) akumulacije nanocevk na membrani ter H) FRET med PC-Bodipy in A-TiO_2-NC. J) V nadaljevanju premik spektralnega vrha A-TiO_2-NC kaže na prisotno agregacijo nanocevk na membrani. K) Po 30 min inkubacije membrana liposoma L3 nenadoma razpade kot posledica lipidnega oplaščenja nanocevk. L) Fluorescenčna mikroskopija kaže izgubo geometrije liposoma L3, M) mikrospektroskopija pa razkriva meglico PC-Bodipy signala kot tudi N) še vedno prisoten visok signal A-TiO_2-NC (črna prekinjena puščica) na mestu razpadlega liposoma. O) Spektralni vrh A-TiO_2-NC tudi po razpadu ostaja premaknjen v rdeče (črna puščica), kar nakazuje, da je lipidno oplaščenje bolj verjetno okoli agregiranih nanocevk.

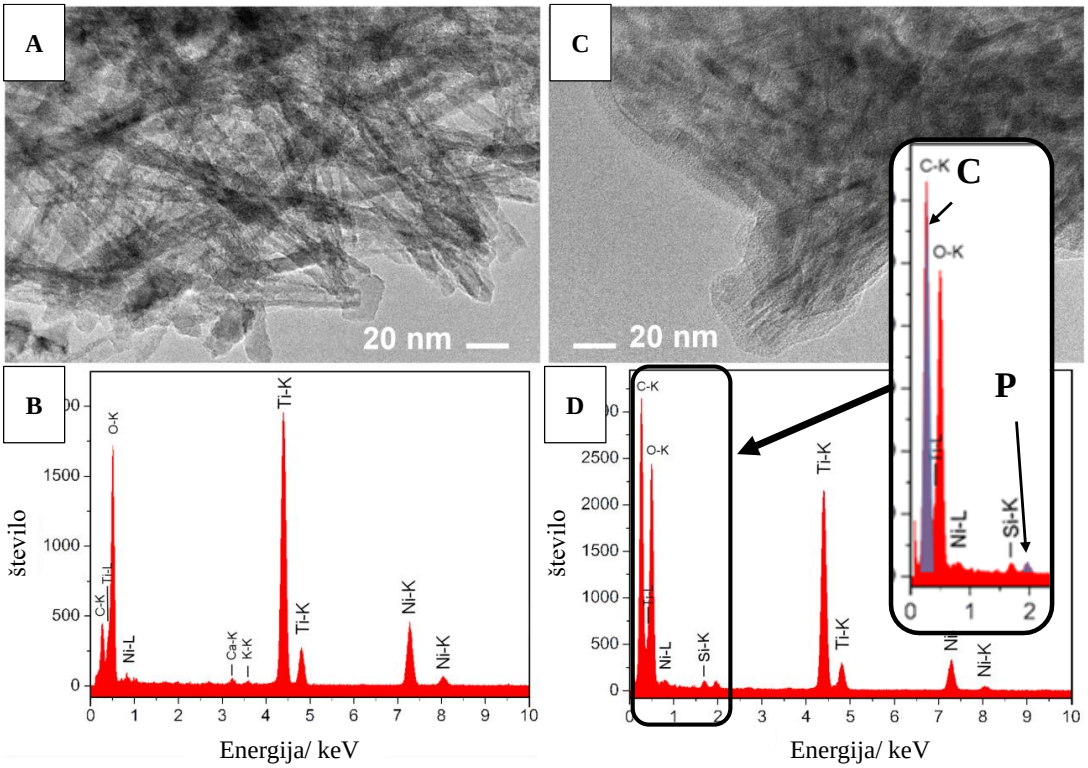


Slika 25: *Mikrospektralna analiza destabilizacije modelne lipidne membrane v prisotnosti TiO_2-NC.* A) Fluorescenčni emisijski spektri so v nadaljevanju razstavljeni na posamezne komponente, membransko komponento (I_M) ter komponento nanocevk (I_{NC}). C, F) Surovi podatki so popravljeni s faktorjem bledenja PC-Bodipy signala, prav tako je odšteto ozadje. Rdeča prekinjena puščica označuje akumulacijo nanocevk na liposomski membrani. D,G) Premik

spektralnega vrha A-TiO_2-NC kaže tudi prisotno agregacijo nanocevk na membrani. E, F) Mikrospektroskopija razkriva meglico PC-Bodipy signala ter še vedno prisoten visok signal A-TiO_2-NC na mestu razpadlega liposoma. D, G) Spektralni vrh A-TiO_2-NC tudi po razpadu ostaja premaknjen v rdeče, kar nakazuje, da je lipidno oplaščenje bolj verjetno okoli agregiranih nanocevk. C) Mikrospektralna analiza liposoma L2 v nadaljevanju razkriva tudi, da razlika v signalu A-TiO_2-NC na membrani ter 10 μm stran od membrane po 30 min inkubacije začne upadati (s črno obkrožene oranžne točke), kar je posledica odnašanja lipidov v obliki oplaščenih nanocevk. Na koncu tudi tako počasen pojav lahko rezultira v popolnem razpadu membrane.

Z upoštevanjem dosedanjega razumevanja možnih interakcij med nanodelci in membrano ter z upoštevanjem lastnosti TiO_2 nanodelcev lahko zgornji eksperiment razložimo z lipidnim oplaščenjem nanocevk, ki so ga deloma opazili pri silikatnih nanodelcih[92] (slika 24K). Takšno hipotezo smo v nadaljevanju potrdili z analizo energijskega disperzijskega spektra (EDS) z lipidi oplaščenih cevk na elektronskem presevnem mikroskopu (TEM). Posnetki kontrolnega vzorca, torej TiO_2-NC, kažejo jasne, kristalinične robove posameznih nanocevk (slika 26A), prav tako EDS analiza vzorca potrjuje le prisotnost tistih elementov, ki so pričakovani v vzorcu TiO_2 oziroma se lahko sproščajo iz stekla med samo TiO_2-NC sintezo (slika 26B). Nasprotno pa je v vzorcu, kjer so bili liposomi izpostavljeni TiO_2-NC, okoli nanocevk prisotna amorfna plast (slika 26C). EDS analiza v takšnem vzorcu razkriva prisotnost tako ogljika kot tudi fosforja. Vir slednjih so lahko le lipidi (slika 26D).

V nadaljevanju smo analizirali večje število TEM posnetkov (Priloga A) in ugotovili, da je lipidni plašč pogosteje prisoten okoli agregiranih nanocevk (slika 26C). Ta rezultat sovpada z opaženim premikom spektralnega vrha A-TiO_2-NC v rdeče, ki ohranja takšno stanje tudi po samem razpadu liposoma. Vse to nakazuje, da je agregacija nanocevk neposredno povezana z lipidnim oplaščenjem (črna puščica na sliki 24O).



Slika 26: *EDS TEM analiza lipidnega plašča okoli TiO_2-NC.* A) TEM posnetek vzorca TiO_2-NC (kontrola) ter B) pripadajoči EDS spekter. C) TEM posnetek oplaščenih nanocevk z lipidnim ovojem, ki nastane po zlitju liposomske kapljice s kapljico nanocevk, kot je prikazano na sliki 24A ter D) pripadajoči EDS spekter s povečanim izsekom, ki označuje ogljikov in fosforjev

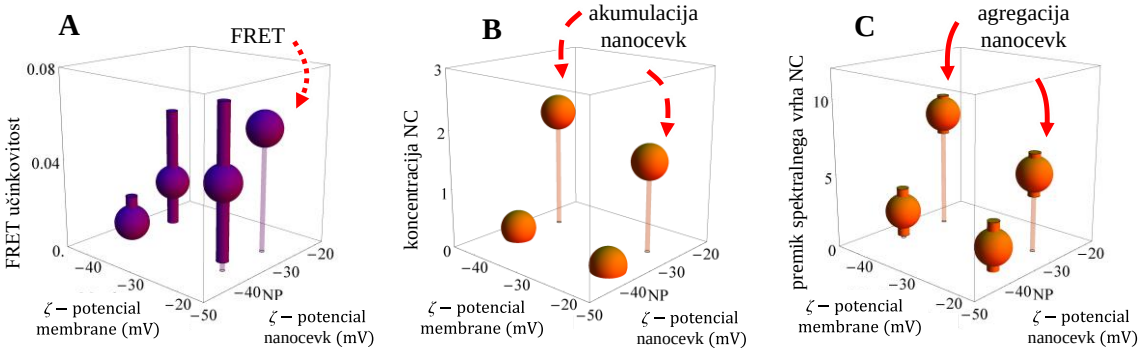
signal, čigar izvor so plaščni lipidi.

Nenadnemu razpadu membrane sledi upad koncentracije nanocevk na membrani, ki je posledica redčenja že oplaščenih nanocevk (ostanki liposoma L3 na sliki 24M in N). V takšnem primeru smo pričakovali zmanjšanje razlike med signalom A-TiO_2-NC na sami membrani ter 10 μm stran (kratko ΔA-TiO_2-NC). Sam poskus dejansko to potrjuje, signal A-TiO_2-NC nemudoma pade na vrednost, primerljivo okolici (slika 25F, obkrožene oranžne točke).

Presenetljivo, v primeru liposoma L2 je opazen počasen, vendar kontinuiran padec ΔA-TiO_2-NC signala (slika 25C, obkrožene oranžne točke). Kljub temu liposom v celotnem času opazovanja ohrani prvotno obliko. Če bi se nanocevke akumulirale na membrani, bi sčasoma dosegle nasičenost, ΔA-TiO_2-NC bi bila po določenem času stanovita. Ker pa opazimo ravno nasprotno, torej padec ΔA-TiO_2-NC, lahko pojav obrazložimo le s počasnim in stalnim odtokom lipidov iz membrane. To lahko interpretiramo kot navidezno-zvezen razpad lipidne membrane. Vzporedno lipidni odtok odnaša tudi PC-Bodipy označevalec, kar pojasni postopno upadanje membranskega signala, ki prevlada nad prisotnim, vendar majhnim porastom PC-Bodipy signala, ki je posledica FRET pojava (vijolične točke na sliki 25C). Zanimivo je, da padec PC-Bodipy signala lahko natančno rekonstruiramo le z upoštevanjem ΔA-TiO_2-NC (podrobnosti modeliranja ter fitanja so obrazložene v poglavju Materiali in metode).

Nedavne numerične simulacije predlagajo elektrostatične, van der Waals DLVO[93] kot tudi hidratacijske sile[94] kot ključno gonilo lipidnega oplaščenja, ki v primeru silikatnih nanodelcev (SiO_2) zelo dobro kompenzirajo energijsko neugodno ukrivljanje membrane za delce velike 20–80 nm[92,95,96]. Dokazano je tudi, da je afiniteta TiO_2 površine do lipidov 20x večja[97] kot v primeru SiO_2, nanodelcev, torej je lipidno oplaščenje še toliko bolj verjetno, tudi za dosti manjše delce. V namen razumevanja vloge afinitete v membranskem razpadu smo spreminjali naboj tako na membrani kot tudi na površini nanocevk ter s tem primerjali elektrostatske sile s privlačnimi.

V primeru močnega elektrostatskega odboja je FRET pojav v primerjavi z vzorci, kjer so odbojne sile zanemarljivo majhne, po pričakovanjih zmanjšan (slika 27A), sama akumulacija nanocevk na membrani je slabo vidna (slika 27B), hkrati je agregacija nanocevk zanemarljiva (slika 27C).



Slika 27: *Elektrostatika igra ključno vlogo pri interakciji nanocevk z modelnimi lipidnimi membranami*. Poskusi zlivanja liposomov različno nabite membrane z različno nabitimi nanocevkami so bili izvedeni in analizirani identično zgornjemu poskusu (slika 9, slika 25). Rezultati posameznih poskusov so prikazani v prilogi A. Povprečne vrednosti treh neodvisnih ponovitev posamezne vrste poskusa so prikazane s kroglicami, standardni odklon pa kot razširitev palic. A) Povprečna FRET učinkovitost, B) povprečna akumulacija ter C) povprečna agregacija nanocevk na membrani je prikazana v odvisnosti od ζ-potencial membrane ter ζ-potenciala nanocevk. Akumulacija je razkrita iz razlik signala A-TiO_2-NC na membrani v primerjavi s signalom iz okolice. Agregacija je potrjena s premikom spektralnega vrha A-TiO_2-NC v rdeče.

5 Zaključki

Nanotehnologija, ustvarjanje novih, uporabnih materialov, je v silnem porastu. Dnevno se sintetizirajo nove oblike, dimenzije in strukture nanomaterialov, z njimi pa se odpirajo nove možnosti uporabe, ki bi lahko občutno izboljšale kvaliteto našega življenja. Ker pa se pregovorno bojimo tistega, česar ne vidimo, s porastom nanotehnologije raste tudi strah pred njo in posledično čedalje glasnejše zahteve po preverjanju varnosti uporabe nanomaterialov. Zavedamo se, da je tako človeško telo kot tudi naše okolje dnevno izpostavljeno različnim nanodelcem, tako naravnim kot umetno sintetiziranim, zaradi česar vse več raziskovalnih skupin svoje raziskovalno delo usmerja prav v razumevanje interakcij biološkega sveta z nanodelci.

Dejstvo je, da letna poraba TiO_2 v nano obliki samo v hrani (E171) presega 300000 ton[98]. Poleg tega pa se povečuje še uporaba nano TiO_2 v povezavi s fotokatalizo. Skupaj z izjemno pogosto uporabo v kozmetiki in barvah vse te uporabe kar kličejo po dobro definirani raziskavi interakcije TiO_2 nanomateriala z biološkimi strukturami. Zato smo se temu problemu posvetili v okviru tega doktorskega dela.

Želeli smo razumeti toksičnost in fototoksičnost TiO_2-NC na modelnih celicah linije MCF-7. Da bi preučili mehanizem toksičnosti, opazovali interakcije TiO_2-NC s celično in modelno membrano v realnem času ter lokalizirali kopičenje nanomateriala glede na različne supramolekularne strukture v *in vitro* pogojih, smo uporabili pred kratkim razvito fluorescenčno mikrospektroskopsko metodo (FMS) za slikanje z visoko spektralno ločljivostjo, z natančnostjo 1 nm in krajevno ločljivostjo do 200 nm[64,91,99,100], in razvili potrebne postopke za stabilno fluorescenčno označevanje TiO_2-NC. S FMS sistemom in FRET tehniko, ki identificira molekularno bližino, v našem primeru med nanodelci in membrano, smo potrdili akumulacijo in agregacijo TiO_2 nanocevk na membrani, njihovo oplaščenje z membranskimi lipidi in posledično destabilizacijo membran, ki je jasno odvisna od elektrostatskega odboja med obema strukturama. Potrdili smo, da razpad membrane ni mogoč le v primeru modelnih membran, temveč tudi v primeru celic MCF-7. Pri slednjih smo ob razpadu ugotovili tudi prerazporeditev mitohondrijev. Identifikacija oplaščenja nanocevk z membranskimi lipidi in posledično od naboja odvisnega odtoka lipidov iz membrane, ki lahko vodita celo v popoln razpad membrane, pa razkrivata, da lahko s površinsko modifikacijo TiO_2 nanocevk zmanjšamo afiniteto do lipidov in posledično tudi citotoksičnost. Tak rezultat vsekakor ne more ostati prezrt tako v ožji raziskovalni sferi kot tudi v širši javnosti[101]. Hkrati pa opozarja, da tako široka uporaba TiO_2 morda ni tako varna, kot smo do sedaj predpostavljali.

Pri raziskavah fototoksičnosti smo razširili monitoring učinka v različnih bioloških sistemih[66,61,50] s študijo vpliva serumskih proteinov. Slednji se namreč vežejo na površino nanocevk, nastala proteinska korona pa lovi fotogenerirane radikale, ki zmanjšujejo fototoksičen učinek UV vzbujenih TiO_2-NC. Če pa je nanomateriala dovolj oz. proteinov premalo, postane fototoksičen učinek znaten. Z nadzorovanim razmerjem cevk in serumskih proteinov lahko torej TiO_2-NC uporabimo pri fotodinamičnih terapijah, saj lahko cevke poljubno injiciramo na tarčno mesto, njihovo fototoksičnost pa »vklopimo« z UVA svetlobo nizke jakosti.

6 Zahvale

Najlepše se zahvaljujem mojemu mentorju prof. dr. Janezu Štrancarju, ki mi je omogočil vstopiti v raziskovalni svet biofizike. Zahvaljujem se za vse mogoče, včasih tudi nemogoče eksperimentalne ideje, številne diskusije in analize rezultatov, predvsem pa se zahvaljujem za podano znanje, kako pristopiti k reševanju znanstvenih problemov, kako razmišljati, predvsem pa, kako nikoli obupati nad svojimi rezultati, temveč jih vzeti kot izziv za raziskovalno prihodnost. Zahvaljujem se za pomoč pri pisanju strokovnih publikacij ter za kritičen pristop k mojemu doktorskemu delu. Predvsem pa bi se rada zahvalila za zaupanje, da nam skupaj lahko uspe pisati čudovite raziskovalne zgodbe.

Prav tako bi se rada zahvalila vsem sodelavcem Laboratorija za biofiziko Oddelka F5 na Institutu »Jožef Stefan«, tako za vso strokovno podporo kot tudi prijateljstvo, ki smo ga v vseh teh letih uspeli stkati in ohraniti. Za vso strokovno pomoč, ki je bila vedno uslišana, se še posebej zahvaljujem Iztoku.

Iskreno bi se zahvalila sodelavcu, prijatelju Tilnu, brez tebe moj IJS svet ne bi bil isti, hvala ti za vse.

Zahvalila bi se tudi vsem ostalim, ki so bili del moje raziskovalne zgodbe, Poloni Umek, Stanetu Pajk in Slavku Kralj.

Zahvalila bi se tudi vsem članom komisije za kritično prebiranje doktorskega dela.

Na koncu se zahvaljujem tudi svoji družini za vso podporo in razumevanje.

Za finančno podporo se zahvaljujem Javni agenciji za raziskovalno dejavnost.

7 Literatura in viri

1. Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol*. 2012;7(12):779-786. doi:10.1038/nnano.2012.207.

2. Wang F, Yu L, Monopoli MP, et al. 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 Nanotechnol Biol Med*. 2013;9(8):1159-1168. doi:10.1016/j.nano.2013.04.010.

3. Nel A, Xia T, Mädler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006;311(5761):622-627. doi:10.1126/science.1114397.

4. Nel AE, Mädler L, Velegol D, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater*. 2009;8(7):543-557. doi:10.1038/nmat2442.

5. Krug HF, Wick P. Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge. *Angew Chem Int Ed*. 2011;50(6):1260-1278. doi:10.1002/anie.201001037.

6. Mailänder V, Landfester K. Interaction of nanoparticles with cells. *Biomacromolecules*. 2009;10(9):2379-2400. doi:10.1021/bm900266r.

7. Verma A, Uzun O, Hu Y, et al. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater*. 2008;7(7):588-595. doi:10.1038/nmat2202.

8. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J*. 2004;377(1):159. doi:10.1042/BJ20031253.

9. Verma A, Stellacci F. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. *Small Weinh Bergstr Ger*. 2010;6(1):12-21. doi:10.1002/smll.200901158.

10. Tenzer S, Docter D, Kuharev J, et al. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. *Nat Nanotechnol*. 2013;8(10):772-781. doi:10.1038/nnano.2013.181.

11. Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA. What the Cell "Sees" in Bionanoscience. *J Am Chem Soc*. 2010;132(16):5761-5768. doi:10.1021/ja910675v.

12. Lundqvist M, Stigler J, Elia G, Lynch I, Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci*. 2008;105(38):14265-14270. doi:10.1073/pnas.0805135105.

13. Albanese A, Walkey CD, Olsen JB, Guo H, Emili A, Chan WCW. Secreted Biomolecules Alter the Biological Identity and Cellular Interactions of Nanoparticles. *ACS Nano*. 2014;8(6):5515-5526. doi:10.1021/nn4061012.

14. Casals E, Pfaller T, Duschl A, Oostingh GJ, Puntes V. Time Evolution of the Nanoparticle Protein Corona. *ACS Nano*. 2010;4(7):3623-3632. doi:10.1021/nn901372t.

15. Monopoli MP, Bombelli FB, Dawson KA. Nanobiotechnology: Nanoparticle coronas take shape. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(1):11-12. doi:10.1038/nnano.2010.267.

16. Cedervall T, Lynch I, Lindman S, et al. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci*. 2007;104(7):2050-2055. doi:10.1073/pnas.0608582104.

17. Dell'Orco D, Lundqvist M, Oslakovic C, Cedervall T, Linse S. Modeling the time evolution of the nanoparticle-protein corona in a body fluid. *PloS One*. 2010;5(6):e10949. doi:10.1371/journal.pone.0010949.

18. Lesniak A, Fenaroli F, Monopoli MP, Åberg C, Dawson KA, Salvati A. Effects of the Presence or Absence of a Protein Corona on Silica Nanoparticle Uptake and Impact on Cells. *ACS Nano*. 2012;6(7):5845-5857. doi:10.1021/nn300223w.

19. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small*. 2008;4(1):26-49. doi:10.1002/smll.200700595.

20. Soenen SJ, Rivera-Gil P, Montenegro J-M, Parak WJ, De Smedt SC, Braeckmans K. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today*. 2011;6(5):446-465. doi:10.1016/j.nantod.2011.08.001.

21. Soenen SJH, De Cuyper M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. *Contrast Media Mol Imaging*. 2009;4(5):207-219. doi:10.1002/cmmi.282.

22. Cooper GM. *The Cell*. Vol 2nd ed. Sinauer Associates; 2000.

23. Panariti A, Miserocchi G, Rivolta I. The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions? *Nanotechnol Sci Appl*. 2012;5:87-100. doi:10.2147/NSA.S25515.

24. Liu X, Huang N, Li H, Jin Q, Ji J. Surface and Size Effects on Cell Interaction of Gold Nanoparticles with Both Phagocytic and Nonphagocytic Cells. *Langmuir*. 2013;29(29):9138-9148. doi:10.1021/la401556k.

25. Chithrani BD, Chan WCW. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett*. 2007;7(6):1542-1550. doi:10.1021/nl070363y.

26. Cho EC, Au L, Zhang Q, Xia Y. The Effects of Size, Shape, and Surface Functional

Group of Gold Nanostructures on Their Adsorption and Internalization by Cells. *Small*. 2010;6(4):517-522. doi:10.1002/smll.200901622.

27. Verma A, Uzun O, Hu Y, et al. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. *Nat Mater*. 2008;7(7):588-595. doi:10.1038/nmat2202.

28. Wang T, Bai J, Jiang X, Nienhaus GU. Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry. *ACS Nano*. 2012;6(2):1251-1259. doi:10.1021/nn203892h.

29. Treuel L, Jiang X, Nienhaus GU. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *J R Soc Interface*. 2013;10(82):20120939. doi:10.1098/rsif.2012.0939.

30. Rothen-Rutishauser BM, Schürch S, Haenni B, Kapp N, Gehr P. Interaction of fine particles and nanoparticles with red blood cells visualized with advanced microscopic techniques. *Environ Sci Technol*. 2006;40(14):4353-4359.

31. Chen X, Mao SS. Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications. *Chem Rev*. 2007;107(7):2891-2959. doi:10.1021/cr0500535.

32. Jacobs JF, van de Poel I, Osseweijer P. Sunscreens with Titanium Dioxide (TiO2) Nano-Particles: A Societal Experiment. *Nanoethics*. 2010;4(2):103-113. doi:10.1007/s11569-010-0090-y.

33. Yang Y, Doudrick K, Bi X, et al. Characterization of Food-Grade Titanium Dioxide: The Presence of Nanosized Particles. *Environ Sci Technol*. 2014;48(11):6391-6400. doi:10.1021/es500436x.

34. Fujishima A, Honda K. Electrochemical photolysis of water at a semiconductor electrode. *Nature*. 1972;238(5358):37-38.

35. Fujishima A, Zhang X, Tryk DA. TiO2 photocatalysis and related surface phenomena. *Surf Sci Rep*. 2008;63(12):515-582. doi:10.1016/j.surfrep.2008.10.001.

36. Pelaez M, Nolan NT, Pillai SC, et al. A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Appl Catal B Environ*. 2012;125:331-349. doi:10.1016/j.apcatb.2012.05.036.

37. Kocbek P, Teskac K, Kreft ME, Kristl J. Toxicological aspects of long-term treatment of keratinocytes with ZnO and TiO2 nanoparticles. *Small Weinh Bergstr Ger*. 2010;6(17):1908-1917. doi:10.1002/smll.201000032.

38. Valant J, Drobne D, Novak S. Effect of ingested titanium dioxide nanoparticles on the digestive gland cell membrane of terrestrial isopods. *Chemosphere*. 2012;87(1):19-25. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.11.047.

39. Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanoparticle Res*. 2012;14(9):1-11. doi:10.1007/s11051-012-1109-9.

40. Rothen-Rutishauser BM, Schürch S, Haenni B, Kapp N, Gehr P. Interaction of Fine Particles and Nanoparticles with Red Blood Cells Visualized with Advanced Microscopic Techniques†. *Environ Sci Technol*. 2006;40(14):4353-4359. doi:10.1021/es0522635.

41. Li N, Ma L, Wang J, et al. Interaction Between Nano-Anatase TiO2 and Liver DNA from Mice In Vivo. *Nanoscale Res Lett*. 2009;5(1):108-115. doi:10.1007/s11671-009-9451-2.

42. Roy SC, Paulose M, Grimes CA. The effect of TiO2 nanotubes in the enhancement of blood clotting for the control of hemorrhage. *Biomaterials*. 2007;28(31):4667-4672. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.045.

43. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:15. doi:10.1186/1743-8977-10-15.

44. Cai R, Kubota Y, Shuin T, Sakai H, Hashimoto K, Fujishima A. Induction of cytotoxicity by photoexcited TiO2 particles. *Cancer Res*. 1992;52(8):2346-2348.

45. Davies MJ. The oxidative environment and protein damage. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1703(2):93-109. doi:10.1016/j.bbapap.2004.08.007.

46. Petković J, Küzma T, Rade K, Novak S, Filipič M. Pre-irradiation of anatase TiO2 particles with UV enhances their cytotoxic and genotoxic potential in human hepatoma HepG2 cells. *J Hazard Mater*. 2011;196:145-152. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.09.004.

47. Conlon KA, Rosenquist T, Berrios M. Site-directed photochemical disruption of the actin cytoskeleton by actin-binding Rose Bengal-conjugates. *J Photochem Photobiol B*. 2002;68(2-3):140-146.

48. Pierzchała K, Lekka M, Magrez A, Kulik AJ, Forró L, Sienkiewicz A. Photocatalytic and phototoxic properties of TiO2-based nanofilaments: ESR and AFM assays. *Nanotoxicology*. 2011;6(8):813-824. doi:10.3109/17435390.2011.625129.

49. Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? *Radiol Oncol*. 2011;45(4):227-247. doi:10.2478/v10019-011-0037-0.

50. Singh N, Manshian B, Jenkins GJS, et al. NanoGenotoxicology: The DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*. 2009;30(23–24):3891-3914. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.04.009.

51. Li N, Duan Y, Hong M, et al. Spleen injury and apoptotic pathway in mice caused by titanium dioxide nanoparticules. *Toxicol Lett*. 2010;195(2–3):161-168. doi:10.1016/j.toxlet.2010.03.1116.

52. Yin J-J, Liu J, Ehrenshaft M, et al. Phototoxicity of Nano Titanium Dioxides in HaCaT Keratinocytes - Generation of Reactive Oxygen Species and Cell Damage. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012;263(1):81-88. doi:10.1016/j.taap.2012.06.001.

53. Xiong S, George S, Ji Z, et al. Size of TiO2 nanoparticles influences their

phototoxicity: an in vitro investigation. *Arch Toxicol*. 2012;87(1):99-109. doi:10.1007/s00204-012-0912-5.

54. Lagopati N, Tsilibary E-P, Falaras P, et al. Effect of nanostructured TiO_2 crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:3219-3230. doi:10.2147/IJN.S62972.

55. Kasuga T, Hiramatsu M, Hoson A, Sekino T, Niihara K. Titania Nanotubes Prepared by Chemical Processing. *Adv Mater*. 1999;11(15):1307-1311. doi:10.1002/(SICI)1521-4095(199910)11:15<1307::AID-ADMA1307>3.0.CO;2-H.

56. Umek P, Bittencourt C, Guttmann P, Gloter A, Škapin SD, Arčon D. Mn2+ Substitutional Doping of TiO2 Nanoribbons: A Three-Step Approach. *J Phys Chem C*. 2014;118(36):21250-21257. doi:10.1021/jp5063989.

57. Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnology*. 2013;11(1):26. doi:10.1186/1477-3155-11-26.

58. Gheshlaghi ZN, Riazi GH, Ahmadian S, Ghafari M, Mahinpour R. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2008;40(9):777-782. doi:10.1093/abbs/40.9.777.

59. Togashi DM, Ryder AG, Mahon DM, Dunne P, McManus J. Fluorescence study of Bovine Serum Albumin and Ti and Sn Oxide Nanoparticles Interactions. In: Schweitzer D and F M, ed. *Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine IV*. Vol 6628. Proceedings of SPIE-OSA Biomedical Optics. Optical Society of America; 2007:6628_61. doi:10.1364/ECBO.2007.6628_61.

60. Finkelstein E, Rosen GM, Rauckman EJ. Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: Practical aspects. *Arch Biochem Biophys*. 1980;200(1):1-16. doi:10.1016/0003-9861(80)90323-9.

61. Reeves JP, Dowben RM. Formation and properties of thin-walled phospholipid vesicles. *J Cell Physiol*. 1969;73(1):49-60. doi:10.1002/jcp.1040730108.

62. Walde P, Cosentino K, Engel H, Stano P. Giant vesicles: preparations and applications. *Chembiochem Eur J Chem Biol*. 2010;11(7):848-865. doi:10.1002/cbic.201000010.

63. Arsov Z, Urbančič I, Garvas M, et al. Fluorescence microspectroscopy as a tool to study mechanism of nanoparticles delivery into living cancer cells. *Biomed Opt Express*. 2011;2(8):2083-2095. doi:10.1364/BOE.2.2083.

64. Urbančič, Arsov Z, Ljubeti? A, Biglino D, Štrancar J. Bleaching-corrected fluorescence microspectroscopy with nanometer peak position resolution. *Opt Express*. 2013;21(21):25291-25306. doi:10.1364/OE.21.025291.

65. Tenuta T, Monopoli MP, Kim J, et al. Elution of Labile Fluorescent Dye from Nanoparticles during Biological Use. *PLoS ONE*. 2011;6(10):e25556. doi:10.1371/journal.pone.0025556.

66. Rabatic BM, Dimitrijevic NM, Cook RE, Saponjic ZV, Rajh T. Spatially Confined

Corner Defects Induce Chemical Functionality of TiO2 Nanorods. *Adv Mater*. 2006;18(8):1033-1037. doi:10.1002/adma.200500988.

67. Chen Q, Yakovlev NL. Adsorption and interaction of organosilanes on TiO2 nanoparticles. *Appl Surf Sci*. 2010;257(5):1395-1400. doi:10.1016/j.apsusc.2010.08.036.

68. Nichols G, Byard S, Bloxham MJ, et al. A review of the terms agglomerate and aggregate with a recommendation for nomenclature used in powder and particle characterization. *J Pharm Sci*. 2002;91(10):2103-2109. doi:10.1002/jps.10191.

69. Kocbek et al. - 2010 - Toxicological Aspects of Long-Term Treatment of Ke.pdf. http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/smll.201000032/asset/1908_ftp.pdf?v=1&t=hltbslkc&s=4624b78dd8c3fde4bb46b34e555fafa5e62b6b13. Accessed September 20, 2013.

70. Zhang H, Shan Y, Dong L. A Comparison of TiO2 and ZnO Nanoparticles as Photosensitizers in Photodynamic Therapy for Cancer. *J Biomed Nanotechnol*. 2014;10(8):1450-1457. doi:10.1166/jbn.2014.1961.

71. Magrez et al. - 2009 - Cellular Toxicity of TiO2-Based Nanofilaments.pdf. http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/nn9002067. Accessed September 20, 2013.

72. Tian G, Fu H, Jing L, Xin B, Pan K. Preparation and Characterization of Stable Biphase TiO2 Photocatalyst with High Crystallinity, Large Surface Area, and Enhanced Photoactivity. *J Phys Chem C*. 2008;112(8):3083-3089. doi:10.1021/jp710283p.

73. Fujishima A, Rao TN, Tryk DA. Titanium dioxide photocatalysis. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev*. 2000;1(1):1-21. doi:10.1016/S1389-5567(00)00002-2.

74. Rozhkova EA, Ulasov I, Lai B, Dimitrijevic NM, Lesniak MS, Rajh T. A High-Performance Nanobio Photocatalyst for Targeted Brain Cancer Therapy. *Nano Lett*. 2009;9(9):3337-3342. doi:10.1021/nl901610f.

75. Lagopati N, Kitsiou PV, Kontos AI, et al. Photo-induced treatment of breast epithelial cancer cells using nanostructured titanium dioxide solution. *J Photochem Photobiol Chem*. 2010;214(2–3):215-223. doi:10.1016/j.jphotochem.2010.06.031.

76. Bell IR, Ives JA, Jonas WB. Nonlinear Effects of Nanoparticles: Biological Variability from Hormetic Doses, Small Particle Sizes, and Dynamic Adaptive Interactions. *Dose-Response*. 2014;12(2):202-232. doi:10.2203/dose-response.13-025.Bell.

77. Iavicoli I, Fontana L, Leso V, Calabrese EJ. Hormetic dose–responses in nanotechnology studies. *Sci Total Environ*. 2014;487:361-374. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.04.023.

78. Drobne D, Jemec A, Pipan Tkalec Ž. In vivo screening to determine hazards of nanoparticles: Nanosized TiO2. *Environ Pollut*. 2009;157(4):1157-1164. doi:10.1016/j.envpol.2008.10.018.

79. Wang Y, Rosenstein B, Goldwyn S, Zhang X, Lebwohl M, Wei H. Differential

regulation of P53 and Bcl-2 expression by ultraviolet A and B. *J Invest Dermatol*. 1998;111(3):380-384. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00319.x.

80. Ge C, Du J, Zhao L, et al. Binding of blood proteins to carbon nanotubes reduces cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(41):16968-16973. doi:10.1073/pnas.1105270108.

81. Kroll A, Pillukat MH, Hahn D, Schnekenburger J. Interference of engineered nanoparticles with in vitro toxicity assays. *Arch Toxicol*. 2012;86(7):1123-1136. doi:10.1007/s00204-012-0837-z.

82. Petković J, Zegura B, Stevanović M, et al. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO2 nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells. *Nanotoxicology*. 2011;5(3):341-353. doi:10.3109/17435390.2010.507316.

83. Marucco A, Fenoglio I, Turci F, Fubini B. Interaction of fibrinogen and albumin with titanium dioxide nanoparticles of different crystalline phases. *J Phys Conf Ser*. 2013;429(1):012014. doi:10.1088/1742-6596/429/1/012014.

84. Allouni ZE, Cimpan MR, Høl PJ, Skodvin T, Gjerdet NR. Agglomeration and sedimentation of TiO2 nanoparticles in cell culture medium. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2009;68(1):83-87. doi:10.1016/j.colsurfb.2008.09.014.

85. Chen H, Ahsan SS, Santiago-Berrios MB, Abruña HD, Webb WW. Mechanisms of Quenching of Alexa Fluorophores by Natural Amino Acids. *J Am Chem Soc*. 2010;132(21):7244-7245. doi:10.1021/ja100500k.

86. Adams GE, Wardman P. CHAPTER 2 - Free Radicals in Biology: The Pulse Radiolysis Approach. In: William Pryor, ed. *Free Radicals in Biology*. Vol Academic Press; 1977:53-95. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125665032500094. Accessed October 14, 2013.

87. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008;582(13):1783-1787. doi:10.1016/j.febslet.2008.04.057.

88. Prieto MJ, Castanho M, Coutinho A, Ortiz A, Aranda FJ, Gómez-Fernández JC. Fluorescence study of a derivatized diacylglycerol incorporated in model membranes. *Chem Phys Lipids*. 1994;69(1):75-85.

89. Loura LMS. Lateral distribution of NBD-PC fluorescent lipid analogs in membranes probed by molecular dynamics-assisted analysis of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) and fluorescence quenching. *Int J Mol Sci*. 2012;13(11):14545-14564. doi:10.3390/ijms131114545.

90. Peetla C, Stine A, Labhasetwar V. Biophysical interactions with model lipid membranes: applications in drug discovery and drug delivery. *Mol Pharm*. 2009;6(5):1264-1276. doi:10.1021/mp9000662.

91. Urbančič I, Ljubetič A, Arsov Z, Štrancar J. Coexistence of Probe Conformations in Lipid Phases—A Polarized Fluorescence Microspectroscopy Study. *Biophys J*.

2013;105(4):919-927. doi:10.1016/j.bpj.2013.07.005.

92. Zhang S, Nelson A, Beales PA. Freezing or Wrapping: The Role of Particle Size in the Mechanism of Nanoparticle–Biomembrane Interaction. *Langmuir*. 2012;28(35):12831-12837. doi:10.1021/la301771b.

93. Li Y, Gu N. Thermodynamics of Charged Nanoparticle Adsorption on Charge-Neutral Membranes: A Simulation Study. *J Phys Chem B*. 2010;114(8):2749-2754. doi:10.1021/jp904550b.

94. Jackman JA, Zan GH, Zhao Z, Cho N-J. Contribution of the hydration force to vesicle adhesion on titanium oxide. *Langmuir ACS J Surf Colloids*. 2014;30(19):5368-5372. doi:10.1021/la404581d.

95. Roiter Y, Ornatska M, Rammohan AR, Balakrishnan J, Heine DR, Minko S. Interaction of lipid membrane with nanostructured surfaces. *Langmuir ACS J Surf Colloids*. 2009;25(11):6287-6299. doi:10.1021/la900119a.

96. Roiter Y, Ornatska M, Rammohan AR, Balakrishnan J, Heine DR, Minko S. Interaction of Nanoparticles with Lipid Membrane. *Nano Lett*. 2008;8(3):941-944. doi:10.1021/nl080080l.

97. Tero R, Ujihara T, Urisu T. Lipid bilayer membrane with atomic step structure: supported bilayer on a step-and-terrace TiO2(100) surface. *Langmuir ACS J Surf Colloids*. 2008;24(20):11567-11576. doi:10.1021/la801080f.

98. Weir A, Westerhoff P, Fabricius L, Hristovski K, von Goetz N. Titanium Dioxide Nanoparticles in Food and Personal Care Products. *Environ Sci Technol*. 2012;46(4):2242-2250. doi:10.1021/es204168d.

99. Arsov Z, Urban?i? I, Garvas M, et al. Fluorescence microspectroscopy as a tool to study mechanism of nanoparticles delivery into living cancer cells. *Biomed Opt Express*. 2011;2(8):2083-2095. doi:10.1364/BOE.2.002083.

100. Urbančič I. Odziv biomembranskih domen na zunanje dražljaje. 2013. http://lbf.ijs.si/Downloads/theses/IztokUrbancic_PhD_2013.pdf.

101. Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol*. 2011;6(5):321-328. doi:10.1038/nnano.2011.41.

102. Ohtani B, Prieto-Mahaney OO, Li D, Abe R. What is Degussa (Evonik) P25? Crystalline composition analysis, reconstruction from isolated pure particles and photocatalytic activity test. *J Photochem Photobiol Chem*. 2010;216(2–3):179-182. doi:10.1016/j.jphotochem.2010.07.024.

Kazalo slik

Slika 1: *Shema mehanizma fotokatalize TiO_2.* Povzeto po[36]. V TiO_2 po absorpciji energije fotona, ki je večja od 3,2 eV, elektron preide iz valenčnega v prevodni pas in ustvari par elektron-vrzel. Slednja interagirata z okolico: elektron reducira kisik v superoksidni radikal ali peroksid, fotoinducirana luknja pa oksidira vodo v hidroksilni radikal. 4

Slika 2: *Reakcija funkcionalizacije površine TiO_2-NC z molekulo AEAPMS.* 11

Slika 3: *Reakcija vezave molekul fluorofora na spremenjeno površino fTiO_2-NC.* 11

Slika 4: *Shema poteka poskusa preživitvenega testa.* 14

Slika 5: *Reakcija spinskega lovilca DMPO s hidroksilnim radikalom.* Rezultat je spinski adukt, DMPO-OH•, ki ga lahko zaznamo s tehniko elektronske paramagnetne resonance. 16

Slika 6: EPR spektrometer, Bruker ELEXSYS E500. 17

Slika 7: *A)Shema ter B)fotografija FMS sistem*. V obeh primerih označeni glavni sestavni deli sistema. 19

Slika 8: *Shema poskusa interakcije nanodelcev z liposomi.* 21

Slika 9: *Pregled metodologije*. Kratek opis in shematski prikaz ključnih korakov: A) izvedba poskusa, B) zajemanje podatkov, C) spektralna analiza, D) prikaz in E) ekstrakcija ujemajočih podatkov, F) natančna analiza in G) razlaga dobljenih rezultatov. 22

Slika 10: *Rentgenski praškovni difraktogram TiO_2-NC*, kjer oznaka A označuje uklone anatazne oblike TiO_2 (A). TEM posnetek TiO_2-NC z dodanim izsekom slike pri večji povečavi (B). 25

Slika 11: *Infrardeči spektri nanocevk (TiO_2-NC), funkcionaliziranih nanocevk (fTiO_2-NC) in 3-(2-aminoetilamino)propiltrimetoksisilan (AEAPMS).* Spektra TiO_2-NC in fTiO_2-NC sta bila posneta v difuzni refleksiji, medtem ko je bil spekter silana posnet v transmisiji. 26

Slika 12: *(A) HAADF-STEM posnetek skupka nanocevk TiO_2, funkcionaliziranih s 3-(2-aminoetilamino)propiltrimetoksisilan (AEAPMS) in (B) kemijski profil, dobljen iz EELS analize Ti L, C K in N K robov vzdolž puščice na sliki A*. 27

Slika 13: *Odvisnost zeta potenciala osnovnih nanocevk (TiO_2-NC), delcev z linkerjem (f-TiO_2-NC) ter fluorescenčno označenih nanocevk ($A_{min/max}$-f-TiO_2-NC) v vodi od pH vrednosti.* 28

Slika 14: *Emisijski spektri proste Alexe 488 (rdeča), Alexe 488, vezane na AEAPMS linker (modra) ter označenih nanocevk A_{max}-TiO_2-NC (zelena) v vodi, pomerjena na spektrofotometru, normirano na 1.* 29

Slika 15: Emisijski spektri proste Alexe 488 (rdeča), Alexe 488 vezane na AEAPMS linker (modra) ter označenih nanocevk A_{max}-TiO_2-NC (zelena) v vodi, v odvisnosti od pH, pomerjeno na spektrofotometru, normirano na 1. 29

Slika 16: *Viabilnost MCF-7 celic v odvisnosti od koncentracije TiO_2-NC v temi oziroma v prisotnosti UV svetlobe.* Absorbcija MTS testa je bila pomerjena, kot je opisano v odstavku Materiali in metode. A) Diagram prikazuje vse meritve, kjer so vsi podatki neobsevanih vzorcev (rdeči simboli) primerjani z obsevanimi (modri simboli) pri izbrani koncentraciji nanocevk. Razlika v celični viabilnosti neobsevanih in obsevanih celic je prikazana s črno puščico pri izbrani koncentraciji nanocevk. Razlika vrednosti mediane med vzorcem 0 µg/ml ter 1000 µg/ml je signifikantna pri P=< 0,001, razlika vrednosti mediane med vzorcem 0 µg/ml ter 50 µg/ml je signifikantna pri P=< 0,05. B) Bari prikazujejo razliko mediane izmerjene absorbance (MTS test) neobsevanih ter obsevanih vzorcev. Črna črta prikazuje predvideno razliko celične viabilnosti, če upoštevamo vpliv same UV svetlobe ter fototoksičen prispevek nepokritih TiO_2-NC (brez proteinskega plašča). Oba prispevka k celični viabilnosti sta ločeno prikazana na sliki C. C) Modra črta prikazuje prepustnost UV svetlobe v odvisnosti od koncentracije TiO_2-NC (prazni modri krogi so bili določeni eksperimentalno); Črtkana rdeča črta prikazuje koncentracijo prostih TiO_2-NC, izračunanih, kot je prikazano v Prilogi A. D) Relativna vrednost s proteini prekritih TiO_2-NC (rdeča črta) ter relativna vrednost vezanih serumskih proteinov (rumena črta), kot predvideva model v Prilogi A. 32

Slika 17: *Primerjava rezultatov MTS (A), štetja celic (Tripan modro) (B) ter nadaljnje zmožnosti proliferacije celic (klonogeničen test) (C) pri dodani koncentraciji nanocevk 1000 µg/ml*. Diagram prikazuje vse meritve, kjer leva skupina prikazuje neobsevane vzorce brez dodanih nanocevk (rdeči simboli), desna pa obsevane ter z dodanimi nanocevkami (modri simboli). Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili Mann-Whitney U statistični test, kjer so signifikantne razlike med vrednostmi mediane posameznega vzorca ** P=< 0,001. 33

Slika 18: *Normirana vrednost absorbance TiO_2-NC v celičnem mediju (DMEM) v prisotnosti oziroma brez serumskih proteinov (FBS, 10 %) pri dveh izbranih koncentracijah, 100 in 1000 µg/ml, merjeno z UV-VIS metodo.* 35

Slika 19: *Normirana intenziteta fluorescenčnega signala označenih nanocevk (A-TiO_2-NC) kot potrditev intermolekularne interakcije nanocevk s serumskimi proteini.* Prazne pike prikazujejo padec fluorescenčnega signala fluorofora, vezanega na nanocevke, polne pike prikazujejo padec jakosti fluorescenčnega signala prostega fluorofora v vodi (kontrola). Rezultat je povprečje dveh neodvisnih meritev. 36

Slika 20: *EPR spektri generiranih hidroksilnih radikalov TiO_2-NC ob obsevanju z UV svetlobo 365 nm.* Vzorec TiO_2-NC v celičnem mediju z 10 % FBS, izmerjen takoj, ter enak vzorec, ki je pred meritvijo v temi stal eno uro (A). Vzorec TiO_2-NC v celičnem mediju brez seruma, pomerjen takoj oziroma pomerjen po eni uri inkubacije v temi (B). Povprečne vrednosti pomerjenih intenzitet EPR signala, prikazani rezultati so prikazani kot povprečje 10 neodvisnih meritev (C). Simulacija izmerjenega EPR spektra (D). 38

Slika 21: *Interakcija MCF-7 celic s fluorescenčno označenimi A-TiO_2-NC (100µg/ml) v mediju s serumom pri sobni temperaturi.* Konfokalna fluorescenčna mikroskopija neoznačenih celic takoj po dodatku fluorescenčno označenih nanocevk v odvisnosti od časa. Barvna območja označujejo mesto, od koder smo v vsaki časovni točki beležili intenziteto fluorescenčnega signala nanocevk. Z naraščanjem koncentracije nanocevk v neposredni bližini celic narašča tudi število agregatov. 40

Slika 22: *Fluorescenčno-mikrospektroskopska slika MCF-7 celic, predhodno označenih z membranskim označevalcem CellMask Orange (1,2 µM), temu je sledila 10 min inkubacija fluorescenčno označenih nanocevk (A-TiO_2-NC v cličnem mediju z 10 % FBS).* A) Ob originalni fluorescenčni sliki so prikazani primeri razstavljanja spektrov na treh lokacijah, ki so označene na sliki. Barva roba posamezne spektralne analize ustreza barvam ustreznih lokacij na sliki A (rdeča – zunaj celice, zelena – v bližini plazmalemo, rumena – znotraj celice). Izmerjeni spekter posameznega območja je vsota dveh pripadajočih fluorescirajočih komponent, komponente nanocevk (bolj natančno signal fluorova Alexe 488, vezanega na same TiO_2-NC) ter komponente membranskega označevalca (fluorescenčni signal označevalca CellMask), katerih delež se po območjih neodvisno spreminja. B) Fluorescenčna slika pod A, ki je analizirana preko območij 5x5 pikslov in razstavljena na pripadajoči spektralni komponenti, je kodirana po intenziteti in položaju spektralnega vrha (λmax) komponente nanocevk ter intenzitete komponente membranskega označevalca, kot je prikazano na soležnih legendah. 41

Slika 23: *Celice MCF-7 inkubirane s TiO_2-NC (1000 µg/ml)brez prisotnih serumskih proteinov.* Dvobarvni kompozit, kjer zelena barva predstavlja signal membranskega označevalca (6-NBD-PC) in rdeča barva signal fluorescenčnega označevalca, ki specifično barva vitalne mitohondrije (Mitrotracker Orange® CMTMROS). A) Polne zelene puščice označujejo nepoškodovano celično membrano, plazmalemo. B) Prekinjene zelene puščice označujejo mitohondrijski signal, katerega lokacija se nahaja zunaj območja celice. Prav tako prekinjene zelene puščice označujejo meglice membranskega signala, ki ni jasno določen kot v kontrolnem primeru. 43

Slika 24: *Destabilizacija modelne lipidne membrane v prisotnosti TiO_2-NC, opažena s fluorescenčno mikrospektroskopijo.* A) Liposomska kapljica je s pomočjo sukanca nežno zlita s kapljico nanocevk. B) Gruča liposomov je opazovana na robu kapljice, s čimer je zagotovljeno minimalno premikanje liposomov v času opazovanja. Merilo na slikah B, G in L predstavlja 10 μm, nizi slik v odvisnosti od valovne dolžine so posneti vsakih 5 min, celoten čas meritve pa traja dobro uro. C) Intenziteta membranske komponente (PC-Bodipy), D) intenziteta komponente nanocevk (A-TiO_2-NC) ter E) premik spektralnega vrha A-TiO_2-NC 5 minut po zlitju kapljic, F) čemur sledi difuzija nanocevk proti liposomom. G) Slika, nastala z uporabo širokopasovnega emisijskega filtra, ne razkriva razlik med posameznimi liposomi, medtem ko H) spektralno razstavljanje razkriva porast PC-Bodipy signala kot posledico I) akumulacije nanocevk na membrani ter H) FRET med PC-Bodipy in A-TiO_2-NC. J) V nadaljevanju premik spektralnega vrha A-TiO_2-NC kaže na prisotno agregacijo nanocevk na membrani. K) Po 30 min inkubacije membrana liposoma L3 nenadoma razpade kot posledica lipidnega oplaščenja nanocevk. L) Fluorescenčna mikroskopija kaže izgubo geometrije liposoma L3, M) mikrospektroskopija pa razkriva meglico PC-Bodipy signala kot tudi N) še vedno prisoten visok signal A-TiO_2-NC (črna prekinjena puščica) na mestu razpadlega liposoma. O) Spektralni vrh A-TiO_2-NC tudi po razpadu ostaja premaknjen v rdeče (črna puščica), kar nakazuje, da je lipidno oplaščenje bolj verjetno okoli agregiranih nanocevk. 46

Slika 25: *Mikrospektralna analiza destabilizacije modelne lipidne membrane v prisotnosti TiO_2-NC.* A) Fluorescenčni emisijski spektri so v nadaljevanju razstavljeni na posamezne komponente, membransko komponento (I_M) ter komponento nanocevk (I_{NC}). C, F) Surovi podatki so popravljeni s faktorjem bledenja PC-Bodipy signala, prav tako je odšteto ozadje. Rdeča prekinjena puščica označuje akumulacijo nanocevk na liposomski membrani. D,G) Premik spektralnega vrha A-TiO_2-NC kaže tudi prisotno agregacijo nanocevk na membrani. E, F) Mikrospektroskopija razkriva meglico PC-Bodipy signala ter še vedno prisoten visok signal A-TiO_2-NC na mestu razpadlega liposoma. D, G) Spektralni vrh A-TiO_2-NC tudi po razpadu ostaja premaknjen v rdeče, kar nakazuje, da je lipidno oplaščenje bolj verjetno okoli agregiranih nanocevk. C) Mikrospektralna analiza liposoma L2 v nadaljevanju razkriva tudi, da razlika v signalu A-TiO_2-NC na membrani ter 10 μm stran od membrane po 30 min inkubacije začne upadati (s črno obkrožene oranžne točke), kar je posledica odnašanja lipidov v obliki oplaščenih nanocevk. Na koncu tudi tako počasen pojav lahko rezultira v popolnem razpadu membrane. 48

Slika 26: *EDS TEM analiza lipidnega plašča okoli TiO_2-NC.* A) TEM posnetek vzorca TiO_2-NC (kontrola) ter B) pripadajoči EDS spekter. C) TEM posnetek oplaščenih nanocevk z lipidnim ovojem, ki nastane po zlitju liposomske kapljice s kapljico nanocevk, kot je prikazano na sliki 24A ter D) pripadajoči EDS spekter s povečanim izsekom, ki označuje ogljikov in fosforjev signal, čigar izvor so plaščni lipidi. 49

Slika 27: *Elektrostatika igra ključno vlogo pri interakciji nanocevk z modelnimi lipidnimi membranami*. Poskusi zlivanja liposomov različno nabite membrane z različno nabitimi nanocevkami so bili izvedeni in analizirani identično zgornjemu poskusu (slika 9, slika 25). Rezultati posameznih poskusov so prikazani v prilogi A. Povprečne vrednosti treh neodvisnih ponovitev posamezne vrste poskusa so prikazane s kroglicami, standardni odklon pa kot razširitev palic. A) Povprečna FRET učinkovitost, B) povprečna akumulacija ter C) povprečna agregacija nanocevk na membrani je prikazana v odvisnosti od ζ-potencial membrane ter ζ-potenciala nanocevk. Akumulacija je razkrita iz razlik signala A-TiO_2-NC na membrani v primerjavi s signalom iz okolice. Agregacija je potrjena s premikom spektralnega vrha A-TiO_2-NC v rdeče. 50

Kazalo tabel

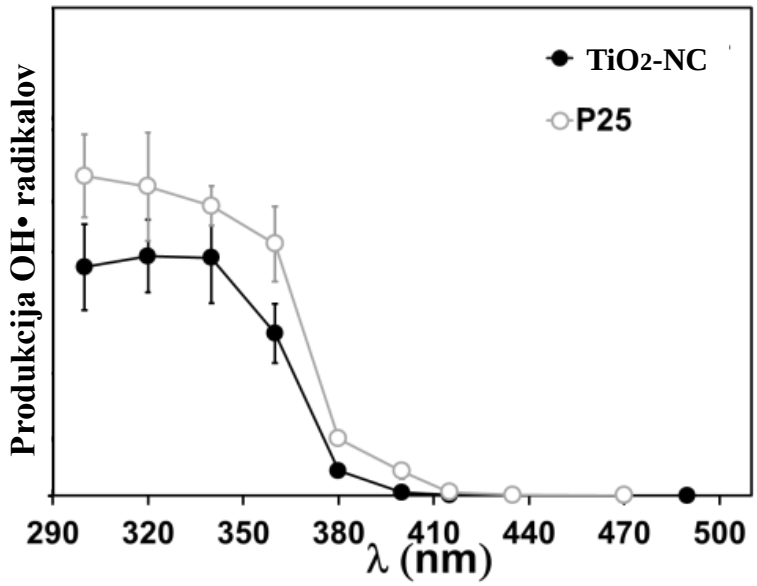
Tabela 1: *Uporabljene kemikalije in materiali tekom raziskovalnega dela.* 9
Tabela 2: *Raziskovalna oprema.*..... 10

Priloga A

Fotokatalitična aktivnost TiO_2-NC

Želeli smo preveriti fotokatalitično aktivnost TiO_2-NC v odvisnosti od valovne dolžine (UV LED) in jo primerjati s fotokatalitsko aktivnostjo dobro znanih nanodelcev, P25, Evonik Degussa. P25 v svetu fotokatalize velja za standard, saj le stežka najdemo bolj učinkovit fotokatalizator, zato se večina fotoaktivnih materialov po učinkovitosti primerja z Degusso. Kristalinična sestava P25 je navadno anataza:rutil 70:30 oziroma 80:20[102]. Kot že napisano, so radikali navadno zelo kratkoživi in hitro reagirajo z okolico, zato smo njihovo sledljivost podaljšali z dodanim nitronskim spinskim lovilcem 5-(Dietoksifosforil)-5-metil-1-piroline-N-oksid (DEPMPO). Da bi izločili možne artefakte, nastale kot posledica nestabilnosti spinskega lovilca oziroma kot posledica ostalih kemijskih reakcij, ki bi lahko posledično prispevale k nastanku OH radikalov, so bile vse meritve narejene v prisotnosti 30 % etanola (v/v). Etanol namreč ujame OH radikal ter ga transformira v etilni radikal, v prisotnosti etanola torej namesto DEPMPO-OH adukt detektiramo adukt etilnega radikala[60].

TiO_2-NC oziroma P25 smo razpršili v 0,1M KOH (pH 11) s potopnim sonikatorjem (15 min, 10 s pulz ON, 10 s pulz OFF, jakost 20–30 W) ter zmešali z etanolom ter spinskim lovilcem 2 % (v/v) do končne koncentracije nanodelcev 1000 μg/ml. Mešanico smo nanesli na dobro oprano polietilen tereftalat (PET) ploščico ter vzorec obsevali z UV svetlobo določene valovne dolžine (λ= 300–490 nm, 5 min (j=0,5 W/m^2, A= 15 mJ). Vzorček je bil takoj po obsevanju posrkan v kapilaro ter pomerjen na EPR spektrofotometru. Po enakem postopku smo pomerili fotoaktivnost P25 nanodelcev. Za izris spodnjega grafa smo primerjali intenzitete EPR signala ter vrednosti normirali na najvišjo vrednost dobljenega signala.



Slika A1: *Produkcija OH• radikalov pri obsevanju TiO_2-NC ter P25*. Pomerjena intenziteta EPR signala, ki je posledica produkcije radikalov. Nanodelci so bili ob dodatku spinskega označevalca DEPMPO in EtOH 5 min obsevani z izbrano valovno

dolžino, temu je takoj sledila meritev EPR signala na spektrometru.

PAA
THE CELL CULTURE COMPANY

Certificate of Analysis

Fetal Bovine Serum; Standard Quality
EU approved

Cat. No: A11-101
A15-101

Lot No: A10110-1631
Expiry Date: 31st July, 2015
Page: 1 / 2

Physical and Chemical Analysis

		Specifications	Results	
pH	[1]	6.8 - 8.2	7.2	
Osmolality	[2]	280 - 340	316	mOsmol/kg
Endotoxin	[3]	value	48.14	EU/ml
Hemoglobin	[4]	< 20	12	mg/dl
Identity	[5]	typical	typical	

Protein Profile

		Specifications	Results	
Total Protein	[6]	3.0 - 4.5	3.8	g/dl
Albumin	[7]	value	2.8	g/dl
α-Globulin	[7]	value	0.5	g/dl
β-Globulin	[7]	value	0.3	g/dl
γ-Globulin	[7]	value	0.2	g/dl
IgG	[8]	< 250	115	µg/ml

Sterility Testing

		Specifications	Results
Aerobic Bacteria	[9]	not detected	not detected
Anaerobic Bacteria	[9]	not detected	not detected
Fungi	[9]	not detected	not detected
Mycoplasma	[10]	not detected	not detected

Virus Testing

		Specifications	Results
Bovine Virus Diarrhoea Virus (BVD-V)	[11]	not detected	not detected
Bovine Herpes Virus1 (BHV-1)	[12]	not detected	not detected
Parainfluenza Type 3 (PI-3)	[12]	not detected	not detected

Antibody Testing

		Specifications	Results
BVD-1 Antibody Titre	[13]	value	1:2
BVD-2 Antibody Titre	[13]	value	1:3

WAIVER OF LIABILITY: THE USER OF THIS PRODUCT HAS SOLE RESPONSIBILITY FOR ITS USE, THE SUITABILITY OF THAT USE AND ANY OUTCOMES OF THE PROCESSES WITHIN WHICH THE PRODUCT IS USED.

PAA Laboratories GmbH | PAA-Strasse 1 | 4061 Pasching | Austria | Tel: +43 7229 64865

PAA
THE CELL CULTURE COMPANY

Certificate of Analysis

Cat. No:	A11-101 A15-101	Lot No: Expiry Date: Page:	A10110-1631 31st July, 2015 2 / 2

Cell Culture Tests

		Cell Line	MRC-5 (Human Lung Fibroblasts)	
		Specifications	Results	
Number of Measurements		4	4	
Relative Growth Promotion	[14]	> 75	90	%

References

[1] Potentiometric Determination; Current Edition EP
[2] Freeze-Point Depression; Current Edition EP
[3] Kinetic-Turbidimetric; Current Edition EP
[4] Spectophotometric Method
[5] Electrophoresis; Current Edition EP
[6] Determination by Biuret, Current Edition EP
[7] Electrophoresis; Current Edition EP
[8] ELISA
[9] Membrane Filtration; Current Edition EP
[10] Current Edition EP
[11] Cytopathic Effect in Cell Culture and Immunofluorescence
[12] Cytopathic Effect in Cell Culture
[13] SNT (Serum-Neutralisation-Test)
[14] Growth Promotion by Acid Phosphatase Activity

These signatures indicate the material mentioned above has met specifications and has been reviewed by the quality unit.

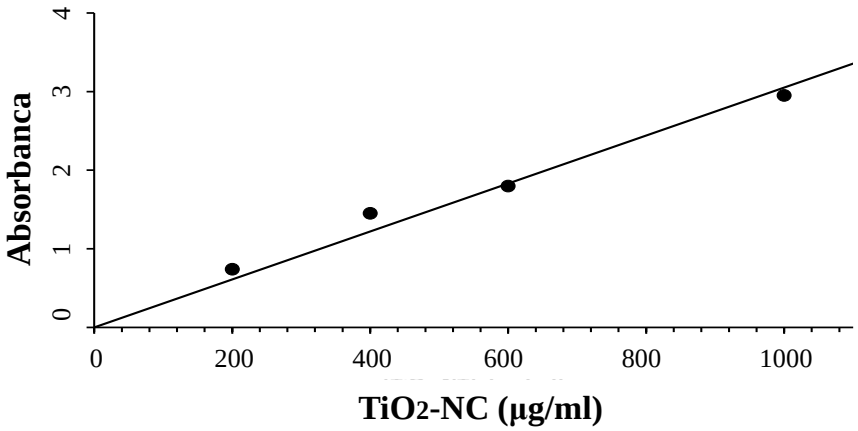
Signature:	Meier Flaviu	Signature:	Krawinkler Daniela
Name:	Flaviu Meier	Name:	Daniela Krawinkler
Position:	Quality Control	Position:	Quality Assurance
Issue date:	16th September, 2010	Document release date:	16th September, 2010

WAIVER OF LIABILITY: THE USER OF THIS PRODUCT HAS SOLE RESPONSIBILITY FOR ITS USE, THE SUITABILITY OF THAT USE AND ANY OUTCOMES OF THE PROCESSES WITHIN WHICH THE PRODUCT IS USED.

PAA Laboratories GmbH | PAA-Strasse 1 | 4061 Pasching | Austria | Tel: +43 7229 64865

Slika A2: *Sestava FBS, uporabljenega pri poskusih, posredovana s strani proizvajalca.*

Optične lastnosti suspenzije TiO_2-NC



Slika A3: *Absorbanca diperzije TiO_2-NC v odvisnosti od koncentracije nanocevk.* TiO_2-NC prah smo razpršili v KOH (0,1 M), sonicirali ter v destilirani vodi pripravili ustrezne koncentracije med 200 in 1000 µg/ml. Absorbanca je bila pomerjena pri 400 nm na UV-VIS spektrometru.

Model vezave albumina na TiO_2-NC

Preprosti model vezave albumina na TiO_2 nanocevke (TiO_2-NC) temelji na predpostavki, da se N molekul albumina veže na nanocevko. Opazovana intenziteta fluorescence (FI) fluorescenčno označenih TiO_2-NC (A-TiO_2-NC) je torej vsota fluorescenčnih intenzitet le dveh prispevkov:

$$FI = \left[TiO_2NC_{proste}\right] \cdot F_{TiO_2NC} + [albTiO_2NC] \cdot F_{albTiO_2NC} \quad (1)$$

kjer je [TiO_2NC_{proste}] koncentracija prostih TiO_2-NC, na katerih albumin ni vezan, [albTiO$_2$NC] pa predstavlja koncentracijo nanocevk, oblečenih z N molekulami albumina. F_{TiO2NC} in $F_{albTiO2NC}$ predstavljajo intrinzično fluorescenco prostih ter intrinzično fluorescenco nanocevk, oblečenih z N molekulami albumina.

Ker s poskusom merimo normalizirano intenziteto fluorescence, je pametno normirati intenziteto fluorescence, ko še ni prisotnega nič albumina:

$$FI_{norm} = \frac{[TiO_2NC_{proste}]F_{TiO_2NCproste}}{[TiO_2NC_{celoten}]F_{TiO_2NCceloten}} + \frac{[albTiO_2NC]F_{albTiO_2NC}}{[TiO_2NC_{celoten}]F_{TiO_2NC\ celoten}} \quad (2)$$

Normalizirana vrednost intenzitete fluorescence FI_{norm} je odvisna od relativne koncentracije prostih oziroma nanocevk z vezanim albuminom ter njune relativne intenzitete fluorescence glede na intenziteto fluorescence prostih nanocevk:

$$FI_{norm} = \frac{[TiO_2NC_{proste}]}{[TiO_2NC_{celoten}]} f_{TiO_2NC_{proste}} + \frac{[albTiO_2NC]}{[TiO_2NC_{celoten}]} f_{albTiO_2NC} \quad (3)$$

$$FI_{norm} = \frac{[TiO_2NC_{proste}]}{[TiO_2NC_{celoten}]} + \frac{[albTiO_2NC]}{[TiO_2NC_{celoten}]} f_{albTiO_2NC} \quad (4)$$

Ker poznamo celotno koncentracijo TiO_2-NC, so neznani parametri le relativna koncentracija prostih oziroma vezanih nanocevk ter relativna intenziteta fluorescence

nanocevk, ki so prekrite z albuminom. Neznanke v našem modelu so obravnavane kot prilagodljivi parametri, s katerimi dosežemo najboljše prilagajanje modela eksperimentalnim podatkom.

Neznani koncentraciji smo določili tako, da smo predpostavili proces vezave molekul albumina na posamezno TiO_2-NC kot reakcijo:

$$TiO_2NC_{proste} + albumin_{prosti} \leftrightarrow albTiO_2NC \quad (5)$$

Kjer TiO_2NC_{proste} predstavlja proste nanocevke, alb_{prosti} predstavlja prosti albumin, $albTiO_2NC$ pa predstavlja nanocevke, na katere je vezan albumin. Predvidevali smo, da je ravnovesje hitro vzpostavljeno ter da so členi v reakciji med meritvijo v ravnovesju. Tako je disociacijska konstanta procesa naslednja:

$$K_d = \frac{[TiO_2NC_{proste}][alb_{prosti}]}{[albTiO_2NC]} \quad (6)$$

Ker se celotna koncentracija $[TiO_2NC_{celotna}]$ in $[albumin_{celoten}]$ ohranja, lahko zapišemo dve ohranitveni enačbi:

$$[TiO_2NC_{celoten}] = [TiO_2NC_{proste}] + [albTiO_2NC]$$
$$[albumin_{celoten}] = [albumin_{prost}] + N[albTiO_2NC] \quad (7)$$

Preprosto se da videti, da lahko izrazimo koncentracijo nanocevk z vezanim albuminom tako:

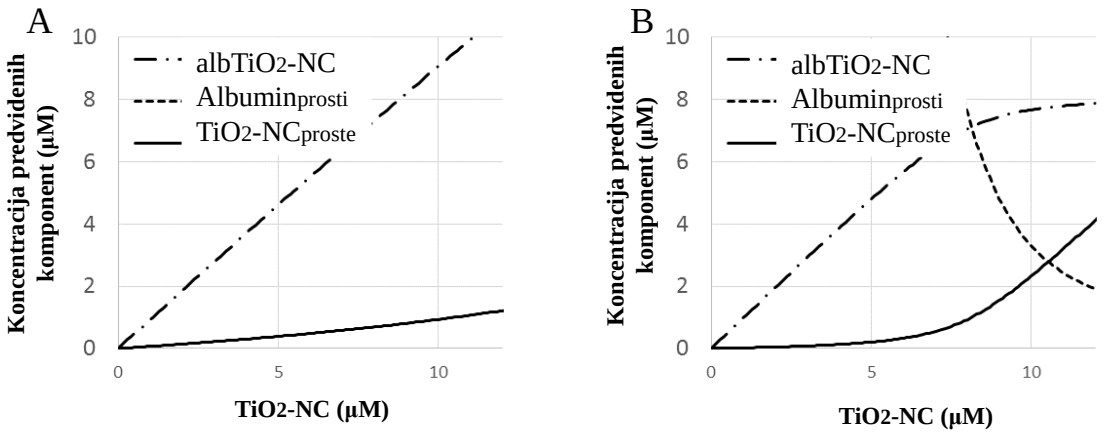
$$[albTiO_2NC] = \frac{1}{2N}\left([alb_{celoten}] + N[TiO_2NC_{celoten}] + K_d - \sqrt{([alb_{celoten}] + N[TiO_2NC_{celoten}] + K_d)^2 - 4N[alb_{celoten}][TiO_2NC_{celoten}]}\right) \quad (8)$$

Z znanimi koncentracijami vseh komponent, enačba 1 podaja intenziteto fluorescence, ki jo lahko primerjamo z eksperimentalnimi podatki in dobimo neznane parametre: število N vezanih molekul albumina na nanocevke ter disociacijsko konstanto vezave albumina (*Kd*). Ta dva parametra smo določili z minimalizacijo kvadratov odmika intenzitete fluorescence FI, ki jo je predvidel naš model, od eksperimentalnih vrednosti FI_{exp}. Parametri z najboljšim ujemanjem in njihove napake so prikazani v spodnji tabeli. Ujemanje opisanega modela je prikazano v doktorski disertaciji na sliki 16C (prekinjena črta).

Tabela A1: *Parametri z najboljšim ujemanjem*.

K_d (μM)	N	$f_{albTiO2NC}$
4±5	2±5	0,52±0,07

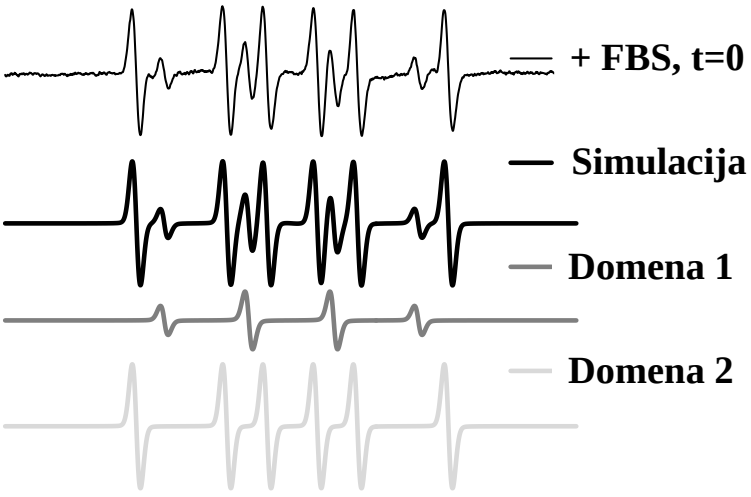
Z uporabo zgoraj dobljenih parametrov lahko narišemo koncentracijo prostih ter nanocevk z vezanim albuminom, ki jo predvidi naš preprost model. Opazimo, da koncentracija prostih cevk narašča od 0,4 do 1 μM, medtem ko celotna koncentracija nanocevk naraste od 5 do 10 μM (to ustreza od 500 do 1000 μg/ml).



Slika A4: *Koncentracija različnih komponent, kot jih predvideva model vezave albumina na TiO_2-NC.* Koncentracija nanocevk, ki so prekrite z albuminom (albTiO_2-NC), proste nanocevke brez vezanih molekul albumina (TiO_2-NC_{proste}) ter prosti albumin ($albumin_{prosti}$) v odvisnosti od koncentracije nanocevk. Koncentracija je bila določena na podlagi modela vezave, ki predpostavlja, da se N molekul albumina lahko veže na posamezno nanocevko. A) predvidene koncentracije s parametri, dobljenimi z najboljšim ujemanjem (fit) (prikazano na sliki 16C, črtkana črta): N=2, *Kd*=4 µM. B) predvidene koncentracije z izbranimi parametri znotraj meje napak najboljšega ujemanja (fit): N=7, Kd=1 µM.

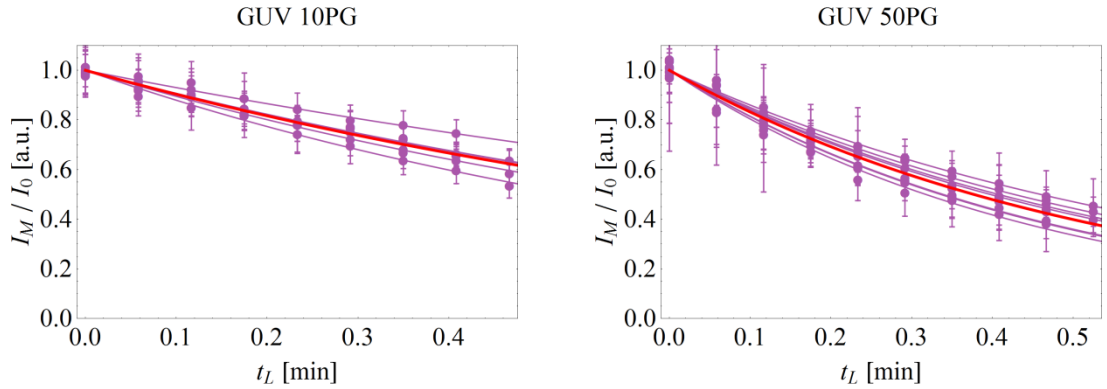
DMPO-OH adukt izvira iz primarnih OH radikalov TiO_2-NC ob prisotnosti UV svetlobe

Da bi potrdili, da je detektirani DMPO-OH adukt rezultat ulovljenih hidroksilnih radikalov, smo predhodno naredili poskus z etanolom. Namreč, če OH radikali reagirajo z etanolom, tvorijo hidroksietil radikal, le-tega ujame spinski lovilec DMPO, rezultat je hidroksietil radikal, razpoznaven v razstavljenem, simuliranem EPR spektru (Slika A 5 domena 2). Majhen delež DMPO-OH radikala kaže na to, da je med samim obsevanjem vzorca prisotna tudi dekompozicija DMPO molekul.



Slika A 5: *EPR spekter TiO_2-NC v celičnem mediju (1000 µg/ml) z 10 % FBS, DMPO spinskim lovilcem ter 30 % etanolom potrjuje tvorbo α-hidroksietil radikala.* Spekter kaže prisotnost dveh vrst radikalskih aduktov. Simulacija hiperfinega razcepa kaže, da je domena 1 tipična za OH adukt, domena 2 pa tipična za hidroksietil radikal adukt.

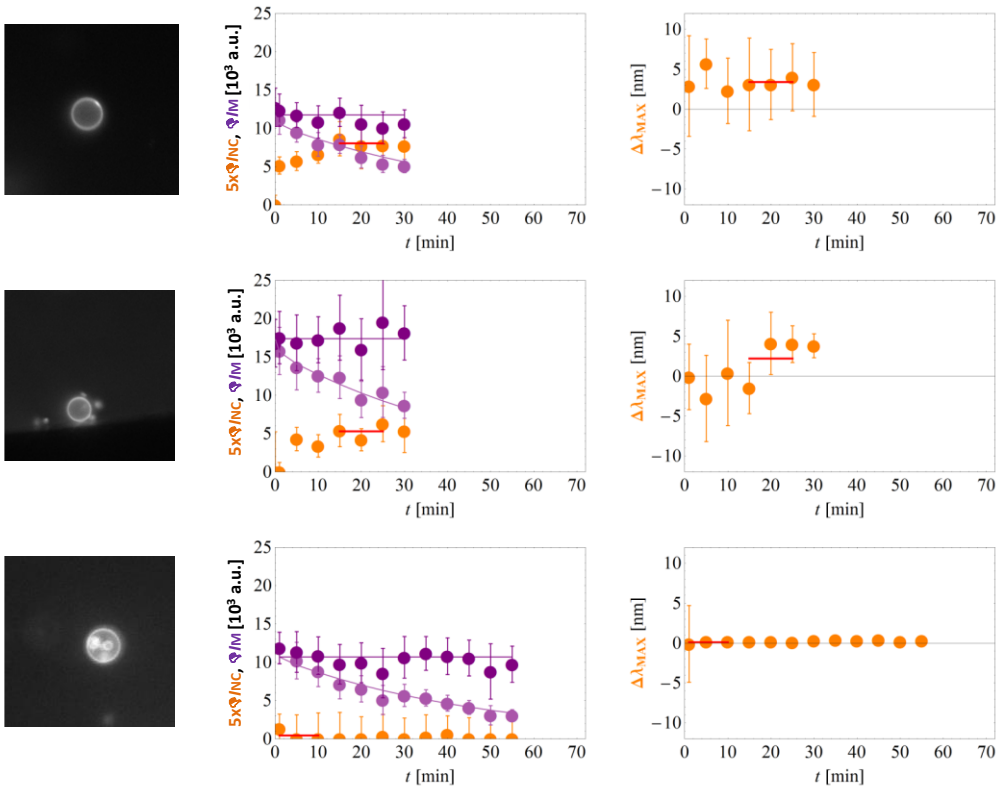
Bledenje membranskega fluorofora – referenčni poskusi



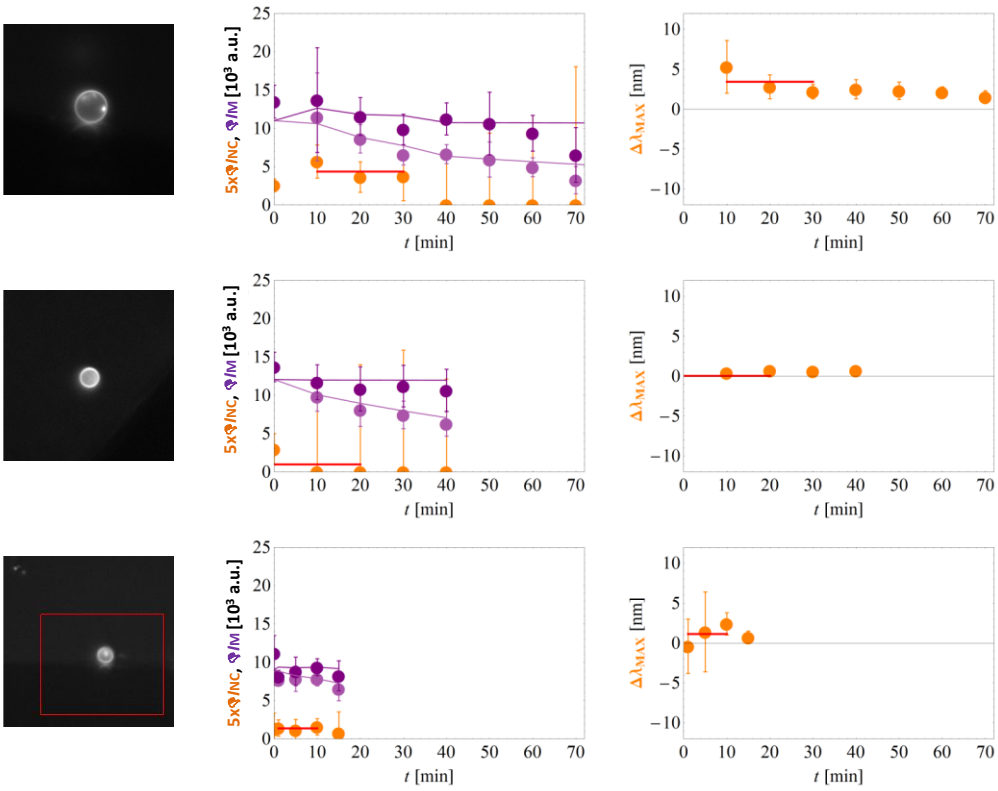
Slika A 6: *Rezultati referenčnih poskusov dveh vrst liposomov: 10 % negativnega lipida PG (GUV 10PG) ter 50 % negativnega lipida PG (GUV 50PG).* Povprečna intenziteta signala PC-Bodipy, vzeta iz oboda liposoma (I_M) v odvisnosti od osvetlitve vzorca (t_L). 6–8 ponovitev za posamezno vrsto liposomov. Rezultat vsakega posameznega liposoma je bil fitani z enokomponentnim modelom (vijolične linije) ter normiran na začetno intenziteto (I_0). Povprečna vrednost bledenja posamezne vrste liposoma (rdeča linija) je bila v nadaljevanju uporabljena za popravek rezultatov, dobljenih pri interakciji liposomov z nanocevkami.

Vpliv naboja na interakcije nanocevk z modelnimi lipidnimi membranami

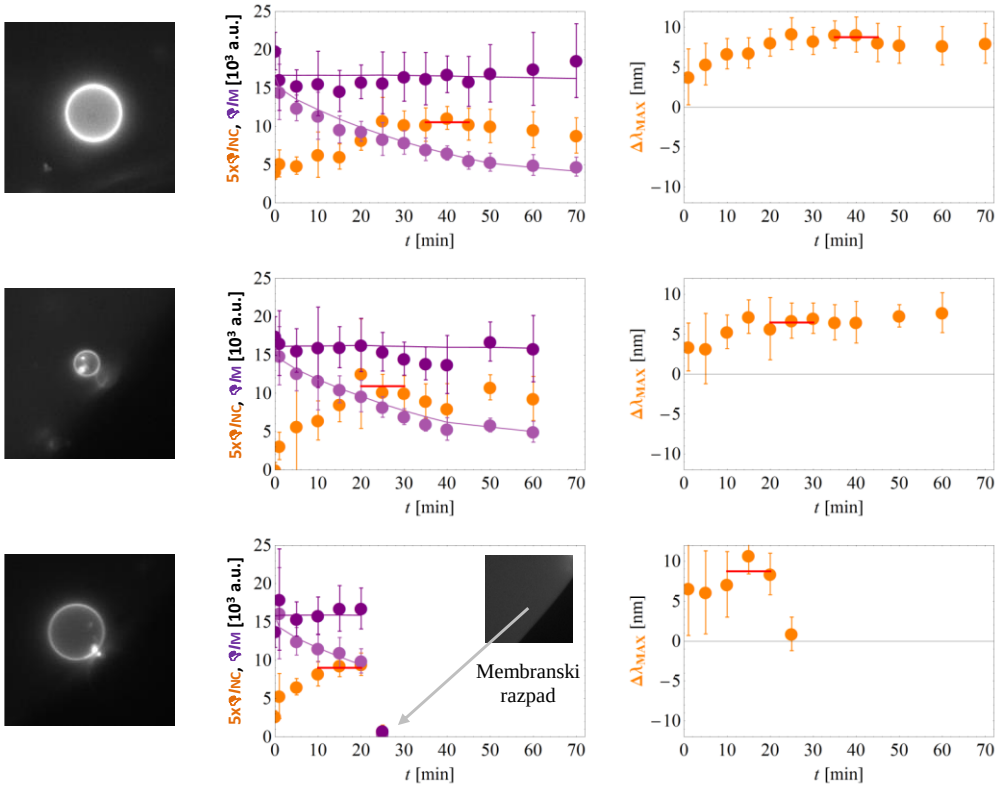
Poskusi so bili izvedeni v štirih različnih kombinacijah. Liposomi z manj (10 %) oziroma več (50 %) negativnega lipida PG v membrani v interakciji s fluorescenčno označenimi nanocevkami, katerih površinski naboj smo variirali s samo količino vezanega fluorofora tekom označevanja (torej A_{min}-TiO_2-NC oziroma A_{max}-TiO_2-NC, natančno opisano v poglavju materiali in metode). Za vsako kombinacijo v nadaljevanju predstavljamo tri prezentativne primere, prikazana je izmerjena intenziteta posamezne komponente (I_{NP} predstavlja jakost signala fluorofora Alexe 488 na nanocevkah, I_M predstavlja jakost signala membranskega označevalca PC-Bodipy) ter položaj spektralnega vrha označevalca nanocevk po zlitju dveh kapljic.



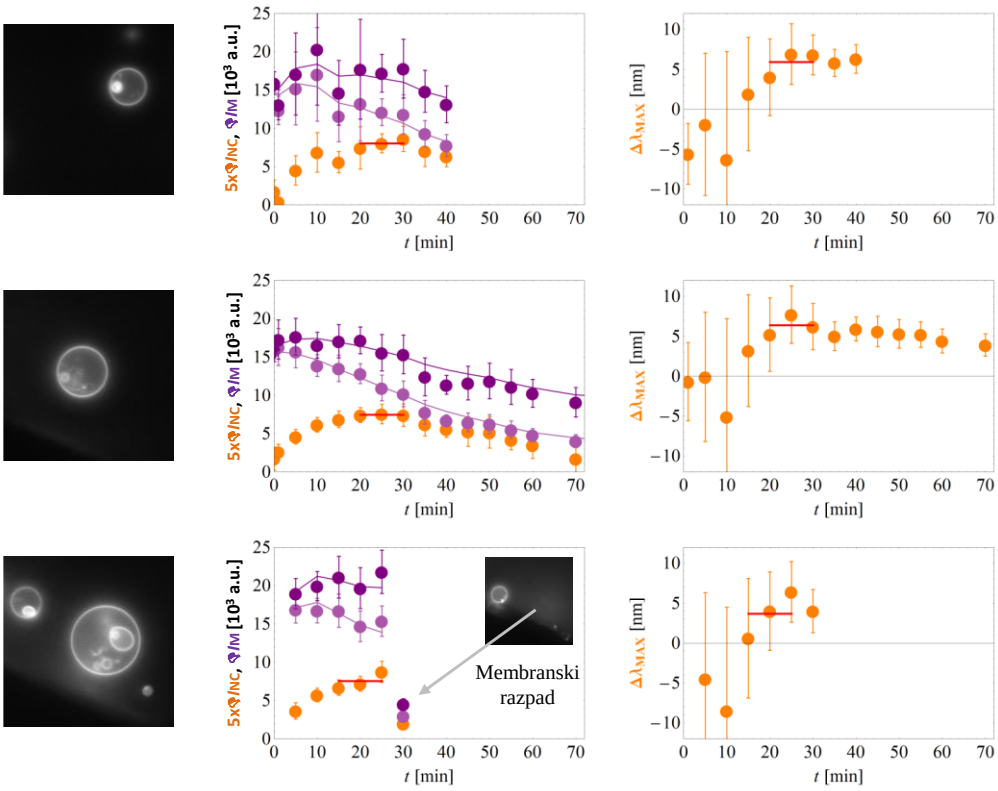
Slika A 7: *Interakcija GUV 50PG z A_{max}-TiO_2-NC.* Prikazana je fluorescenčna slika posameznega poskusa (levo). Srednja kolona predstavlja razlike intenzitet povprečnih vrednosti signala, vzetih iz oboda posameznega liposoma relativno glede na signal iz okolice. Rezultat smo dobili z razstavljanjem FMS podatkov. Za komponento nanocevk A-TiO_2-NC (ΔI_{NC}, oranžni simboli), za membransko komponento PC-Bodipy (ΔI_M, svetlo-vijolični simboli). Vrednosti slednjega so v nadaljevanju zaradi lastnosti bledenja (temno-vijolični simboli) popravljene (Slika A 6). Polne črte predstavljajo rezultat matematičnega modela molekularnega kontakta (natančno opisano v poglavju Materiali in metode). Desni grafi prikazujejo premik spektralnega vrha signala A-TiO_2-NC na sami membrani liposoma glede na položaj vrha istega signala v okolici. Vrednosti rdečih, horizontalnih linij so uporabljene za izris rezultatov slike slika 27 v glavnem tekstu.



Slika A 8: *Interakcija GUV 10PG z A_{max}-TiO_2-NC.* Prikazana je fluorescenčna slika posameznega poskusa (levo). Srednja kolona predstavlja razlike intenzitet povprečnih vrednosti signala, vzetih iz oboda posameznega liposoma relativno glede na signal iz okolice. Rezultat smo dobili z razstavljanjem FMS podatkov. Za komponento nanocevk A-TiO_2-NC (ΔI_{NC}, oranžni simboli), za membransko komponento PC-Bodipy (ΔI_M, svetlo-vijolični simboli). Vrednosti slednjega so v nadaljevanju zaradi lastnosti bledenja (temno-vijolični simboli) popravljene (Slika A 6). Polne črte predstavljajo rezultat matematičnega modela molekularnega kontakta (natančno opisano v poglavju Materiali in metode). Desni grafi prikazujejo premik spektralnega vrha signala A-TiO_2-NC na sami membrani liposoma glede na položaj vrha istega signala v okolici. Vrednosti rdečih, horizontalnih linij so uporabljene za izris rezultatov slike slika 27 v glavnem tekstu.

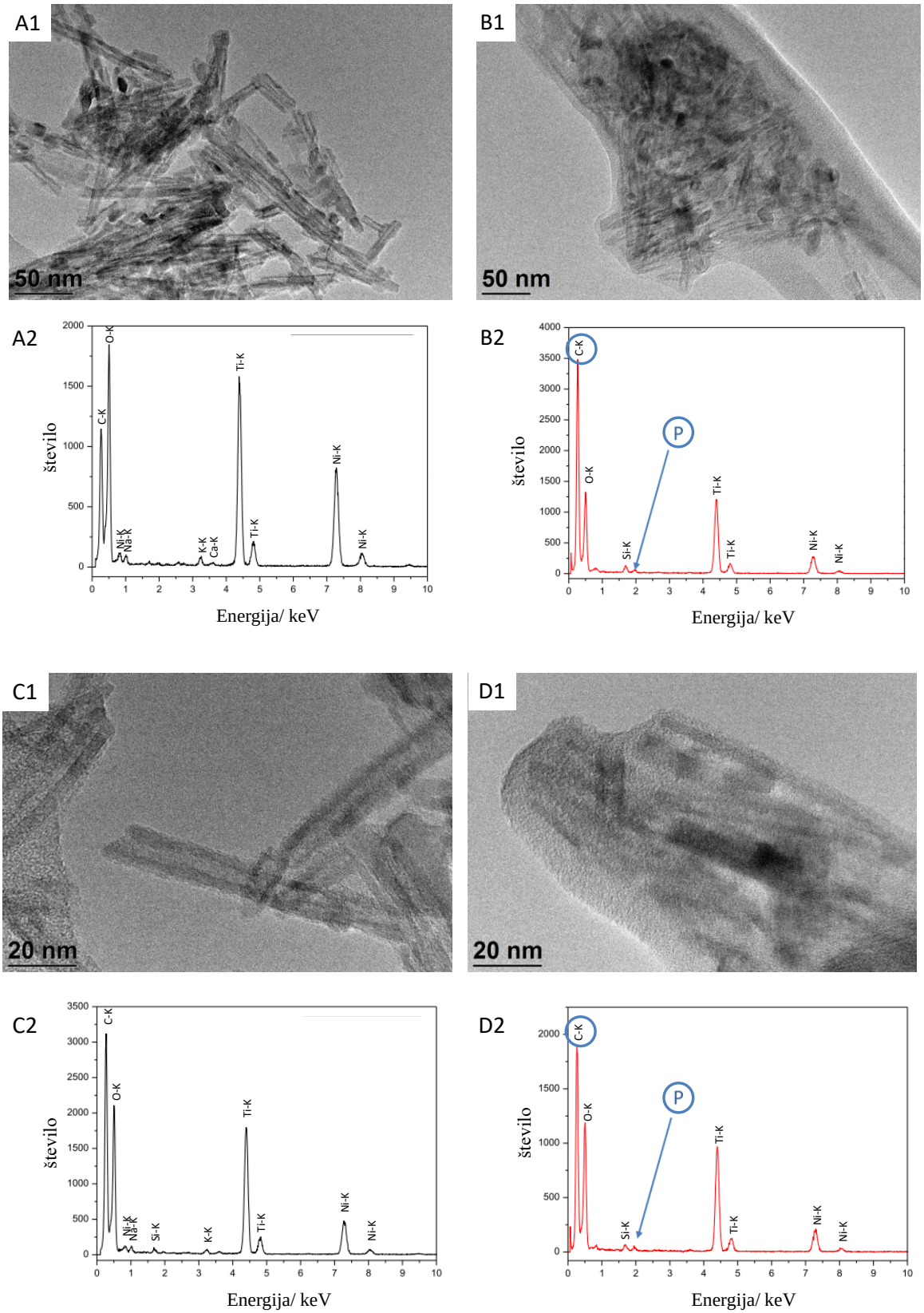


Slika A 9: *Interakcija GUV 50PG z A_{min}-TiO_2-NC.* Prikazana je fluorescenčna slika posameznega poskusa (levo). Srednja kolona predstavlja razlike intenzitet povprečnih vrednosti signala, vzetih iz oboda posameznega liposoma relativno glede na signal iz okolice. Rezultat smo dobili z razstavljanjem FMS podatkov. Za komponento nanocevk A-TiO_2-NC (ΔI_{NC}, oranžni simboli), za membransko komponento PC-Bodipy (ΔI_M, svetlo-vijolični simboli). Vrednosti slednjega so v nadaljevanju zaradi lastnosti bledenja (temno-vijolični simboli) popravljene (Slika A 6). Polne črte predstavljajo rezultat matematičnega modela molekularnega kontakta (natančno opisano v poglavju Materiali in metode). Desni grafi prikazujejo premik spektralnega vrha signala A-TiO_2-NC na sami membrani liposoma glede na položaj vrha istega signala v okolici. Vrednosti rdečih, horizontalnih linij so uporabljene za izris rezultatov slike slika 27 v glavnem tekstu.



Slika A 10: *Interakcija GUV 10PG z A_{min}-TiO_2-NC.* Prikazana je fluorescenčna slika posameznega poskusa (levo). Srednja kolona predstavlja razlike intenzitet povprečnih vrednosti signala, vzetih iz oboda posameznega liposoma relativno glede na signal iz okolice. Rezultat smo dobili z razstavljanjem FMS podatkov. Za komponento nanocevk A-TiO_2-NC (ΔI_{NC}, oranžni simboli), za membransko komponento PC-Bodipy (ΔI_M, svetlo-vijolični simboli). Vrednosti slednjega so v nadaljevanju zaradi lastnosti bledenja (temno-vijolični simboli) popravljene (Slika A 6). Polne črte predstavljajo rezultat matematičnega modela molekularnega kontakta (natančno opisano v poglavju Materiali in metode). Desni grafi prikazujejo premik spektralnega vrha signala A-TiO_2-NC na sami membrani liposoma glede na položaj vrha istega signala v okolici. Vrednosti rdečih, horizontalnih linij so uporabljene za izris rezultatov slike slika 27 v glavnem tekstu.

EDS TEM analiza lipidnega plašča okoli TiO2-NC



Slika A 11: *EDS TEM analiza lipidnega plašča okoli TiO_2-NC*. A1, C1) TEM posnetek vzorca TiO_2-NC (kontrola) ter A2, C2) pripadajoči EDS spekter. B1, D1) TEM posnetek oplaščenih nanocevk z lipidnim ovojem, ki nastane po zlitju liposomske kapljice s kapljico nanocevk, kot je prikazano na sliki 24A ter B2, D2) pripadajoči EDS spekter s

povečanim izsekom, ki označuje ogljikov in fosforjev signal, čigar izvor so plaščni lipidi.

Priloga B

Objave

Izvirni znanstveni članki

- Arsov Z, Urbančič I, Garvas M, Biglino D, Ljubetič A, Koklic T, Štrancar J. Fluorescence microspectroscopy as a tool to study mechanism of nanoparticles delivery into living cancer cells. *Biomedical optics express*, 2011; vol. 2(8): 2083-2095.
- Pajk S, Garvas M, Štrancar J, Pečar S. Nitroxide-fluorophore double probes: a potential tool for studying membrane heterogeneity by ESR and fluorescence. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2011; 9(11): 4150-4159.
- Rebolj K, Bakrač B, Garvas M, Ota K, Šentjurc M, Maček P, Sepčić K, et al. EPR and FTIR studies reveal the importance of highly ordered sterol-enriched membrane domains for ostreolysin activity. *Biochimica et biophysica acta, Biomembranes*, 2010; 1798 (5): 891-902.
- Batista U, Garvas M, Nemec M, Schara M V, Veranič P, Koklic T. Effects of different detachment procedures on viability, nitroxide reduction kinetics, and plasma membrane heterogeneity of V-79 cells. *Cell biology international*, 2010; l34 (6):. 663-668.
- Garvas M, Testen A, Umek P, Koklic T, Gloter A, Štrancar J. Protein corona prevents TiO_2 phototoxicity. *Plos One*, sprejeto v objavo.

Objavljeni znanstveni prispevki na konferenci

- Pajk S, Garvas M, Štrancar J, Pečar S. Design and synthesis of new fluorophore - nitroxide double probes for membrane spectroscopy. V: *4th BBBB-Bosphorus International Conference on Pharmaceutical Sciences: New trends in drug discovery, delivery systems and laboratory diagnostics*, Bled, Slovenia, 2011.
- Garvas M, Umek P, Štrancar J. Single nanoparticle detection in live cell by fluorescence microspectroscopy. V: *3. študentska konferenca Mednarodne podiplomske šole Jožefa Stefana*, Ljubljana, Slovenija, 2011.

Objavljeni povzetek znanstvenega prispevka na konferenci

- Garvas M, Urbančič I, Testen A, Arsov Z, Umek P, Koklic T, Štrancar J. Lipid bilayer explosion driven by titan-oxide nanparticles. V: *9th Christmas Biophysics Workshop, XBW*, Buzet, Croatia, 2014.
- Garvas M, Testen A, Koklic T, Štrancar J. Albumin attenuates phototoxicity of titanium oxide based nanotubes by intercepting photoinduced hydroxyl radicals. V: *SLONANO 2012*, Ljubljana, Slovenia, 2012.
- Garvas M, Urbančič I, Biglino D, Koklic T, Štrancar J. New method of detection of nanoparticles. V: *XIII. Annual Linz Winter Workshop*, Linz, Austria, 2011.
- Garvas M, Pajk S, Umek P, Štrancar J. Nanoparticle - cell interaction. V: *Risks*

associated with nanoparticles and nanomaterials : INRS Occupational Health Research Conference, Nancy, France, 2011.

- Garvas M, Batista U, Koklic T, Nemec M, Žuvić-Butorac M, Schara M V. Effects of different detachment procedures on viability, nitroxide reduction kinetics, and membrane heterogeneity of V-79 cells. V: *Regional biophysics conference 2009*, Linz, Austria, 2009.
- Garvas M, Kure S, Urbančič I, Koklic T, Arsov Z, Biglino D, Šentjurc M, Štrancar J. Searching the interactions of nanoparticles and biological systems. V: *Tenth International Summer School of Biophysics*, Rovinj, Croatia, 2009.
- Garvas M, Rebolj K, Sepčić K, Maček P, Šentjurc M. Influence of cholesterol on the membrane domain structure of sphingomyelin liposomes as studied by EPR. V: *15th International Symposium Spectroscopy in Theory and Practice*, Nova Gorica, Slovenija, 2007.

Samostojni znanstveni sestavek ali poglavje v monografski publikaciji

- Koklič T, Podlipec R, Mravljak J, Garvas M, Šentjurc M, Zeisig R. Interaction of alkylphospholipid formulations with breast cancer cells in the context of anticancer drug development. V: *GUNDUZ, Mehmet (ur.), GUNDUZ, Esra (ur.). Breast cancer - focusing tumor microenvironment, stem cells and metastasis*. Rijeka: InTech, 2011: 361-384.

Prispevki na konferenci brez natisa

- Garvas M, Koklic T, Umek P, Štrancar J. Fluorescence labeling and detecting nanoparticles inside livel cell : presented at *NanoImactNet-QNano Conference*, Dublin, Ireland. 2012.
- Garvas M. Koliko so protimikrobni nanomateriali res le protimikrobni? : *Konferenca SEMTO 2011: Napredni materiali s tehnologijami prihodnosti*, Institute Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija, 2011.