

UNIVERZA V NOVI GORICI  
FAKULTETA ZA ZNANOSTI O OKOLJU

**TOKSIČNOST IN GENOTOKSIČNOST NANODELCEV  
TiO<sub>2</sub> V TESTNEM SISTEMU Z ZARODKI RIB CEBRIC**

DIPLOMSKO DELO

Sara KVENDERC

Mentorica: doc. dr. Metka Filipič

Nova Gorica, 2009



## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici, doc. dr. Metki Filipič, za ves trud in pomoč pri nastajanju tega diplomskega dela. Še zlasti se zahvaljujem dr. Tini Eleršek, mentorici, za ves njen trud, pomoč pri delu v laboratoriju in številne koristne nasvete, ki mi jih je nudila v času nastajanja celotnega diplomskega dela. Hkrati bi se zahvalila še Jani Petković za pomoč pri določanju velikosti agregiranih nanodelcev.



## POVZETEK

Nanotehnologija je mlado in zelo perspektivno področje znanosti. Nanodelci  $\text{TiO}_2$  se uporabljajo v številnih vejah industrije. Kljub temu, da prihajamo ljudje v stik z njimi zelo pogosto, je o njihovih učinkih na ljudi in okolje znano zelo malo. S testom strupenosti in testom komet (gelsko elektorforezo posamezne celice) na zarodkih rib vrste *Danio rerio* smo raziskali toksičnost in genotoksičnost anataznih nanodelcev  $\text{TiO}_2$  deklarirane velikosti 5 nm in rutilnih nanodelcev  $\text{TiO}_2$  deklarirane velikosti 10 nm x 40 nm. Naši rezultati so pokazali, da nanodelci  $\text{TiO}_2$  obeh izbranih kristalnih oblik in velikosti ne povzročajo akutnih in subakutnih toksičnih učinkov, vendar pa so zelo genotoksični.

**Ključne besede:** nanodelci,  $\text{TiO}_2$ , anatazni, rutilni, test na zarodkih rib (FET), genotoksičnost

## ABSTRACT

Nanotechnology is a young and very perspective field of science. Nanoparticles of  $\text{TiO}_2$  are used in numerous areas of industry. Despite the fact that people very often come into contact with them, very little is known about their effects on humans and the environment. With the toxicity test and comet assay with zebrafish (*Danio rerio*) embryos we studied the toxicity and genotoxicity of anatase  $\text{TiO}_2$  nanoparticles, with a declared size of 5 nm, and rutile  $\text{TiO}_2$  nanoparticles, with a declared size of 10 nm x 40 nm. The results showed that none of the crystal shapes and sizes of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles caused acute or subacute toxic effects, whereas both types were highly genotoxic.

**Key words:** nanoparticles,  $\text{TiO}_2$ , anatase, rutile, fish embryo test (FET), genotoxicity

## SEZNAM SLIK

- Slika 1:** Razlika med nanodelci, agregati nanodelcev ter makrodelci.
- Slika 2:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 0 do 0.75 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))
- Slika 3:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 0.75 do 2 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))
- Slika 4:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 2.25 do 5.3 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))
- Slika 5:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 5.3 do 10 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))
- Slika 6:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 11 do 22 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))
- Slika 7:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 25 do 42 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))
- Slika 8:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 48 do 72 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))
- Slika 9:** Tipična slika kometa (posneta s programsko opremo Comet Assay IV).
- Slika 10:** Testna (mikrotitrna) plošča za test na zarodkih rib.
- Slika 11:** Mikrotitrne plošče na ogrevalni plošči (A) in opazovanje zarodkov z mikroskopom (B).
- Slika 12:** Opazovani znaki razvoja zarodka glede na čas izpostavitve testni raztopini.
- Slika 13:** Shema izvedbe testa komet.
- Slika 14:** Agregati: (A) malih nanodelcev, (B) velikih nanodelcev TiO<sub>2</sub>, posneta z vrstičnim elektronskim mikroskopom (JEOL-JSM-639OLV Japonska) (vir: Inštitut tehničnih znanosti Srbske akademije znanosti in umetnosti, 2008).
- Slika 15:** Grafični prikaz porazdelitve dejanske velikosti nanodelcev TiO<sub>2</sub> (particle size distribution analysis) po tretiranju z ultrazvokom: (A) mali delci - UZ kopel, (B) mali delci - UZ sonda, (C) veliki delci - UZ kopel, (D) veliki delci - UZ sonda (vir: IJS, 2008).
- Slika 16:** Pokritost ovojnice zarodkov z delci TiO<sub>2</sub> pri koncentracijah 10, 50 in 100 mg/L po 48 h razvoja (pred postopkom prepihanja).
- Slika 17:** Zarodki rib cebric po 48 h razvoja: (A) normalen razvoj (bočno), (B) normalen razvoj (od zgoraj), (C) razvoj somit in pigmenta na repu (od zadaj), (D) razvoj edema (bočno), (E) mrtev oz. zakrknjen zarodek. Merilo v spodnjem kotu predstavlja 500 µm.
- Slika 18:** Rezultati testiranja akutne strupenosti malih TiO<sub>2</sub> nanodelcev (deklarirane velikosti 5 nm) po 24 in 48 h razvoja zarodkov rib cebric.
- Slika 19:** Rezultati testiranja akutne strupenosti velikih TiO<sub>2</sub> nanodelcev (deklarirane velikosti 10 nm x 40 nm) po 24 in 48 h razvoja zarodkov rib cebric.
- Slika 20:** Hitrost srčnega utripa (udarci na min) po 48 h razvoja zarodkov, izpostavljenih suspenziji malih nanodelcev TiO<sub>2</sub> (deklarirane velikosti 5 nm).
- Slika 21:** Hitrost srčnega utripa (udarci na min) po 48 h razvoja zarodkov, izpostavljenih suspenziji velikih nanodelcev TiO<sub>2</sub> (deklarirane velikosti 10 nm x 40 nm).
- Slika 22:** Krivulje smrtnosti zarodkov v odvisnosti od izpostavitve: (A) malim delcem po 24 h, (B) malim delcem po 48 h, (C) velikim delcem po 24 h, (D) velikim delcem po 48 h. Na grafih so prikazane srednje vrednosti s standardno napako.
- Slika 23:** Fotografije celic, posnete s fluorescentnim mikroskopom: (A) nepoškodovane, (B) rahlo poškodovane, (C) in (D) posamezne celice, ki niso v stiku z ostankom zarodka v desnem spodnjem kotu, (E) ovojnica zarodka.

**Slika 24:** Fotografije celic, posnete s fluorescentnim mikroskopom v programu Comet Assay IV: (A) nepoškodovana celica, (B) srednje poškodovana celica, (C) bolj poškodovana celica (komet).

**Slika 25:** Primerjava kometov med: (A) posameznimi kontrolami (ISO- voda, BaP, MMS in NaCl), (B) izbranimi koncentracijami malih nanodelcev TiO<sub>2</sub>, (C) izbranimi koncentracijami velikih nanodelcev TiO<sub>2</sub>. Statistično značilne razlike (ANOVA) med poškodbami DNA, izolirane iz celic kontrolnih ( ISO-voda) in tretiranih zarodkov cebric, so označene z \*.

**Slika 26:** Variabilnost med posameznimi poskusi (mediane ± SD): (A) med izbranimi kontrolami, (B) med izbranimi koncentracijami malih nanodelcev in (C) med izbranimi koncentracijami velikih nanodelcev. \* predstavlja statistično značilno (P<0.05) razliko med kontrolnimi in tretiranimi zarodki (n=6).

## SEZNAM TABEL

**Tabela 1:** Stadiji razvoja vrste *Danio rerio* pri  $26\pm 1^\circ\text{C}$  (povzeto po Kimmel in sod., 1994).

**Tabela 2:** Splošni podatki o testiranih nanodelcih  $\text{TiO}_2$ .

**Tabela 3:** Podatki o srednjih vrednosti (medianah) dejanske velikosti testiranih nanodelcev  $\text{TiO}_2$ .



## KAZALO VSEBINE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1 UVOD .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 NAMEN NALOGE.....  | 2         |
| <b>2 TEORETIČNE OSNOVE.....</b>  | <b>3</b>  |
| 2.1 NANOTEHNOLOGIJA IN NANODELCI.....                                  | 3         |
| 2.2 NANODELCI TiO <sub>2</sub> .....                                   | 5         |
| 2.3 TEST NA ZARODKIH RIB .....   | 6         |
| 2.4 TEST KOMET.....  | 11        |
| <b>3 EKSPERIMENTALNI DEL – MATERIALI IN METODE.....</b>                | <b>14</b> |
| 3.1 TITANOV DIOKSID (TiO <sub>2</sub> ).....                           | 14        |
| 3.2 DOLOČANJE DEJANSKE VELIKOSTI NANODELCEV TiO <sub>2</sub> .....     | 14        |
| 3.2.1 Fotografiranje delcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom ..... | 14        |
| 3.2.2 Analiza velikosti in porazdelitve delcev .....                   | 14        |
| 3.3 PRIPRAVA ZALOŽNIH IN TESTNIH KONCENTRACIJ .....                    | 15        |
| 3.4 TEST NA ZARODKIH RIB CEBRIC (FET) .....                            | 15        |
| 3.4.1 Vzdrževanje cebric .....   | 15        |
| 3.4.2 Nastavitev FET .....   | 15        |
| 3.4.3 Mikroskopski pregled zarodkov .....                              | 16        |
| 3.5 TEST KOMET.....  | 18        |
| 3.5.1 Priprava zarodkov in raztopin.....                               | 18        |
| 3.5.2 Izvedba testa .....  | 18        |
| 3.5.3 Barvanje in mikroskopiranje preparatov .....                     | 19        |
| 3.6 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....                                | 19        |
| <b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>                                    | <b>21</b> |
| 4.1 DOLOČITEV DEJANSKE VELIKOSTI NANODELCEV TiO <sub>2</sub> .....     | 21        |
| 4.2 REZULTATI FET .....  | 24        |
| 4.2.1 Testiranje odziva zarodkov na prepričevanje .....                | 24        |
| 4.2.2 Rezultati mikroskopskega pregleda zarodkov .....                 | 24        |
| 4.2.3 Letalni učinki po 24 in 48 h.....                                | 26        |
| 4.2.4 Hitrost srčnega utripa po 48 h.....                              | 26        |
| 4.2.5 Subletalni učinki po 24 in 48 h.....                             | 31        |
| 4.2.6 Prilegajoče krivulje smrtnosti izpostavljenih zarodkov .....     | 32        |
| 4.3 REZULTATI TESTA KOMET .....  | 33        |
| 4.3.1 Mikroskopski pregled preparatov .....                            | 33        |
| 4.3.2 Primerjava poškodovanosti DNA.....                               | 34        |
| 4.4 POVEZOVANJE REZULTATOV FET IN TESTA KOMET.....                     | 38        |
| <b>5 ZAKLJUČKI .....</b>   | <b>40</b> |
| <b>6 VIRI.....</b>   | <b>41</b> |

## 1 UVOD

Nanotehnologija je multidisciplinarno področje uporabe nanomaterialov na različnih področjih širše industrije, medicine (Garnett in Kallinteri, 2006) in drugod, ki se še zlasti v zadnjem desetletju hitro razvija. Uporaba številnih materialov v obliki nanodelcev velikosti od 1 do 100 nm je pokazala veliko prednosti pred uporabo enakih materialov v obliki delcev večjih velikosti. Hiter razvoj nanotehnologije in njihove uporabe pa zahteva hkratno oceno potencialnega tveganja za zdravje ljudi in okolja (Oberdörster s sod., 2005a; Valiyaveettil, 2008).

Nove izsledke nanotehnike izkoriščajo tako v različnih industrijah kot tudi na drugih področjih, kot sta kemija in medicina. Novi nanomateriali so že zavzeli pomembno mesto v industriji premazov, kot antibakterijska zaščita, v letalstvu zaradi manjše teže materiala, kozmetični industriji kot manj toksično alternativno sredstvo v zaščitnih sončnih kremah, v elektroniki in industriji gospodinjstev zaradi antibakterijske zaščite, samočistilnih ter antikorozijskih lastnosti, celo v prehranjevalni industriji kot dodatki in konzervansi ter na številnih drugih področjih (Heath in Vasić, 2004).

Vendar pa se kljub številnim pozitivnim lastnostim, ki jih prinaša nanotehnika, vse pogosteje pojavlja vprašanje varnosti nanodelcev in njihovega potencialnega vpliva na naše zdravje ter okolje. Kljub številnim raziskavam do sedaj še ni mogoče zaključiti, ali imajo nanodelci prav zaradi svoje majhnosti škodljiv vpliv na okolje in zdravje ljudi. Velikost delcev ni edina pomembna lastnost delcev. Dosedanje raziskave kažejo na pomembnost oblike, površinskega naboja in drugih lastnosti nanodelcev, ki naj bi imele velik vpliv na njihov potencialno toksičen učinek (Sayes s sod., 2006). Področje raziskovanja nanodelcev in njihovih učinkov na okolje in organizme je postalo predmet intenzivnih znanstvenih raziskav po vsem svetu. Potrebno je izvesti toksikološke teste posameznih vrst delcev na testnih organizmih, da bi ugotovili, kakšni so vplivi le-teh na ljudi in ostale organizme ter ekotoksikološke teste za ugotavljanje vplivov nanodelcev in njihove usode v okolju (Valiyaveettil, 2008).

Nanodelci kovin ter kovinskih oksidov so eni izmed najbolj uporabljenih proizvedenih nanodelcev na različnih področjih. Ker je veliko kovin, ki se uporabljajo za tvorbo kovinskih nanodelcev, toksičnih, še zlasti za vodne organizme, se je pozornost v zadnjem času usmerila prav nanje. Nekatere študije (Zhu s sod., 2008; Griffitt s sod., 2008) so že potrdile toksičnost nekaterih kovinskih nanodelcev, kot so npr. nanodelci srebra in bakra, vendar pa so različni testni organizmi različno občutljivi nanje. Nanodelci TiO<sub>2</sub> po nekaterih raziskavah spadajo med netoksične nanodelce za izbrane testne organizme (Zhu s sod., 2008; Griffitt s sod., 2008), vendar to še ne pomeni, da so ti delci povsem brez učinkov.

Pomembno je, da za testiranje ekotoksičnosti nanodelcev izberemo sistem, ki odraža stanje v naravi in vključuje žive sisteme, ki so neposredno povezani z vodnim okoljem (Moore, 2006). S toksikološkimi testi, kot je test na zarodkih rib ali FET (Fish Embryo Test), lahko ugotovimo negativne posledice izpostavitve posameznim testnim snovem. Ta metoda predstavlja alternativo metodi določanja akutne toksičnosti na odraslih ribah. Poleg tega je z njo možno določiti posledice kratkoročnih (akutnih) učinkov ter dobiti informacije o morebitnih dolgoročnih (kroničnih) učinkih testnih snovi. Kot dopolnilo osnovnemu testu smo v tej raziskavi izbrali test komet (elektroforeza posamezne celice), ki nam pokaže nastanek poškodb DNA na posameznem zarodku in s tem potencialno genotoksičnost.

## 1.1 Namen naloge

V okviru diplomskega dela smo želeli raziskati škodljive učinke nanodelcev TiO<sub>2</sub> v vodnem okolju na modelu zarodkov rib cebric.

Cilji diplomskega dela so:

- določiti dejansko velikost nanodelcev v vodni raztopini (zaradi agregacije),
- pridobiti rezultate o toksičnosti nanodelcev TiO<sub>2</sub> s pomočjo testa z zarodki rib cebric,
- primerjati toksičnost dveh različnih velikosti in različnih kristalnih oblik – anataznih delcev deklarirane velikosti 5 nm in rutilnih delcev deklarirane velikosti 10 nm x 40 nm,
- določiti obliko krivulje smrtnosti zarodkov v odvisnosti od koncentracije nanodelcev obeh izbranih velikosti,
- iz krivulje smrtnosti zarodkov določiti oz. izračunati vrednosti LOEC, NOEC, LC<sub>50</sub> in jih med seboj primerjati,
- pridobiti podatke o genotoksičnosti nanodelcev obeh velikosti s pomočjo testa komet.

## 2 TEORETIČNE OSNOVE

### 2.1 Nanotehnologija in nanodelci

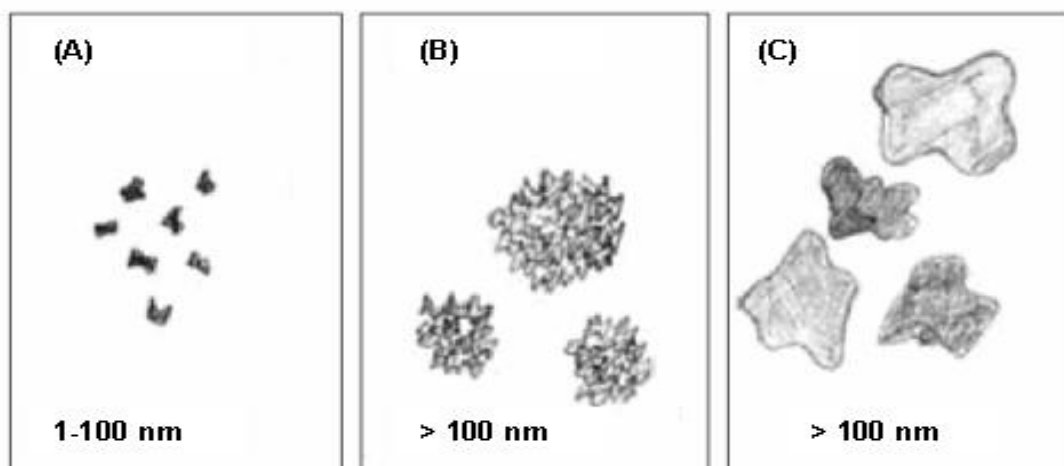
Nanotehnologija je skupno ime za skupino tehnologij, tehnik in procesov, ki se uporabljajo pri manipulaciji snovi na ravni nanometrskih dimenzij, in se pojavlja na vseh področjih obstoječe industrije: od kemijske, tekstilne, prehranske, kozmetične, računalništva in informatike, transporta, energetike, avtomobilske, še posebej pa farmacevtske in obrambne industrije.

Obstajajo številne definicije nanotehnologije, vendar pa izhaja glavna težava iz vsesplošne opredelitve dejstva, da ta znanstvena panoga ne izhaja le iz ene, temveč več znanstvenih vej. Skupna značilnost vseh teh področij je sicer zmožnost spreminjanja materialov na nanometrski ravni (1–100 nm), vendar pa je ta definicija po mnenju nekaterih preveč splošna in nekoliko zastarela (Miller in Senjen, 2008).

Koncept nanotehnologije pripisujemo Nobelovemu nagrajencu Richardu Feynmanu, ki ga je podal v svojem predavanju leta 1959, v katerem je nakazal možnosti za manipuliranje s posameznimi atomi. Prvi pa je izraz nanotehnologija uporabil Norio Taniguchi l. 1974, ki jo je definiral kot "proizvodno tehnologijo, s katero dosežemo izredno natančnost in ultramajhne dimenzije" (Wilson s sod., 2002).

Nanomateriali (nanodelci, nanoceevke) imajo vsaj eno dimenzijo, manjšo od ene desetine mikrometra. V grobem jih delimo na nanodelce, nanostrukturne materiale in nanokompozite. Večine nanomaterialov ni v partikularni obliki, temveč so vgrajeni v strukturirane mreže, ki jim preprečujejo prosto gibanje in kontakt z organizmi ali izpust v okolje. Nasprotno pa imajo nanodelci velik potencial prehajanja v okolje ter prevzema v organizme (Buzea s sod., 2007).

V nanotehnologiji je delec definiran kot »mali predmet, ki se v smislu premikanja in lastnosti, obnaša kot celotna enota«. Glede na velikost so delci razvrščeni po premeru, in sicer na fine delce (angl. fine particles) z velikostjo od 100 do 2500 nm ter ultrafine delce (angl. ultrafine particles) z velikostjo od 1 do 100 nm. Nanodelci so, podobno kot ultrafini delci, tisti, pri katerih dve ali tri dimenzije merijo od 1 do 100 nm. Značilnost delcev v nanometrskih dimenzijah je, da zelo radi agregirajo – se kopičijo in združujejo ter tvorijo agregate. To so ločene skupine delcev, pri katerih so posamezne individualne komponente močno povezane med seboj in jih je tako težko razbiti. Takšne tvorbe imenujemo tudi nanoprah. Makrodelci (večja količina surovega materiala), v angleščini imenovani bulk materials, naj bi imeli konstantne fizikalne lastnosti, ne glede na svojo velikost, kar pa ne velja za nanodelce (Slika 1). Lastnosti nanodelcev se lahko, zaradi razlike v velikosti, močno razlikujejo od lastnosti makrodelcev, zaradi česar so nanodelci tudi tako zaželeni (Joner s sod., 2007).



**Slika 1:** Razlika med nanodelci, agregati nanodelcev ter makrodelci.

Glede na izvor poznamo tri vrste nanodelcev: naravne (angl. natural) nanodelce, ki nastajajo pri naravnih procesih, npr. vulkanskih pepel, magnetotaktične bakterije ali mineralni sestavi, slučajne (angl. incidental) nanodelce, ki nastajajo kot odpadni material pri industrijskih procesih, ter planirane (angl. engineered) nanodelce, ki nastajajo načrtno skozi procese planirane proizvodnje in izdelave, npr. kovinski oksidi ( $\text{ZnO}$ ,  $\text{TiO}_2$ ). Nanodelce pa lahko razvrščamo tudi po njihovi sestavi na kovinske (Au, Ag, Ni idr.), anorganske ( $\text{SiO}_2$ , feriti, nanocevkice iz  $\text{MoS}_2$ , glina in drugi alumosilikati) in organske (celulozna in hitinska vlakna). Skoraj vsak material lahko obstaja v nanodimenzijah.

Pri razbijanju delcev na nanodelce se izredno poveča njihova površina. Medtem ko je pri makrodelcih večina atomov ali molekul v jedru delca, pa so pri nanodelcih skoraj vsi atomi ali molekule na površini. Ker je s tem večina atomov postavljena v drugačno okolje, imajo tudi drugačne lastnosti. Spremenijo se jim tako kemijske kot tudi mehanske, optične in magnetne lastnosti. Nekateri materiali postanejo izredno trdi, trdni in žilavi, izredno se jim lahko poveča kemijska reaktivnost. Tako ima npr. nanokristalinični baker petkrat večjo trdoto od običajnega, nanokroglice iz silicijevega dioksida velikosti 40–100 nm pa se po trdoti uvrščajo med diamant in safir.

Razlike v lastnostih nanodelcev v primerjavi z makrodelci niso vedno želene. Feroelektrični materiali (električne zlitine z železom), manjši od 10 nm, lahko spremenijo smer magnetičnosti s pomočjo terične energije prostora, zaradi česar postanejo neuporabni za shranjevanje podatkov. Nanodelci lahko pogosto ustvarjajo nepredvidljive vizualne posebnosti, saj imajo zaradi svoje majhnosti sposobnost omejevanja svojih elektronov in ustvarjanja številnih učinkov. Tako npr. nanodelce zlata v raztopini vidimo obarvane od temno rdeče do črne, nasprotno od makrodelcev, ki so rumeni, zlati. Uporaba nanomaterialov pa kljub nekaterim neželenim lastnostim vidno narašča in prehaja v splošno uporabo, saj so prednosti njihove uporabe številne. Razlogi so kombinacije lastnosti (npr. veliko razmerje med površino in volumnom, vpliv velikosti in kvantni vpliv), posledice pa večja trdota in žilavost nanostrukturiranih kovin in zlitin, izboljšana razteznost in oblikovnost keramike, superplastičnost in drugo (Heath in Vasić, 2004).

Številne koristne lastnosti nanodelcev lahko predstavljajo tudi nevarnost za ljudi in okolje (Lubick, 2008). Zaradi svoje majhnosti imajo nanodelci večji dostop do našega telesa (znano kot biorazpoložljivost) kot večji delci, kar se kaže kot večji privzem v

posamezne celice, tkiva in organe (Hagens s sod., 2007). Posamezne celice lahko privzamejo materiale, ki merijo manj kot 300 nm (Garnett in Kallinteri, 2006), medtem ko nanomateriali v velikosti do 70 nm vstopijo celo v jedro celic, kjer lahko povzročijo veliko škodo (Chen in von Mikecz, 2005). Zaradi tega so lahko nanomateriali prav zaradi svoje velike kemijske reaktivnosti in biorazpoložljivosti v primerjavi z enako enoto mase velikih delcev iste kemijske strukture veliko bolj toksični (Oberdörster s sod., 2005b). Na toksičnost nanodelcev poleg velikosti vplivajo tudi druge lastnosti, kot so kemična struktura, oblika, površinska struktura in napetost, katalitično obnašanje, stopnja agregacije nanodelcev ali njihova disociacija ter prisotnost ali odsotnost drugih funkcionalnih skupin, pritrjenih na nanodelce (Sayes s sod., 2006).

Oblika, naboj in velikost različnih nanodelcev lahko vplivajo na kinetiko (privzem, porazdelitev, metabolizem in izločanje iz telesa) in toksikološke lastnosti posameznih nanodelcev (Hagens s sod., 2007). Zaradi tega imajo lahko celo nanodelci enake kemijske zgradbe, a različnih oblik ali velikosti, popolnoma drugačne toksikološke lastnosti (Sayes s sod., 2006). Čeprav imamo že nekoliko boljše predstavo o biološkem obnašanju nanodelcev v laboratorijskih pogojih, še vedno ne moremo predvidevati, kakšne so toksikološke nevarnosti katere koli vrste nanodelcev v naravnem okolju. Zato je treba opraviti toksikološke raziskave za vsako vrsto nanodelcev posebej, najbolje še preden preidejo v komercialno uporabo (Oberdörster s sod., 2005a).

Nanodelci, kot so Ag, Zn in ZnO, ki se danes uporabljajo v prehrabni industriji, so že pokazali toksične učinke na celicah in tkivih v *in vitro* ter *in vivo* poskusih na živalih (Zhu s sod., 2008; Griffitt s sod., 2008). Ker pa imajo nanodelci tako različne lastnosti in način obnašanja, je težko predvidevati toksični in genotoksični učinek vseh obstoječih nanodelcev ali vpliv na okolje ter zdravje ljudi na podlagi obstoječih (maloštevilnih) študij (Oberdörster s sod., 2005b; Klaine s sod., 2008).

Ljudje smo skozi ves obstoj izpostavljeni (naravnim) nanodelcem, vendar pa se je strah pred njihovim učinkom pojavil šele po industrijski revoluciji z intenzivno proizvodnjo (npr. varjenjem, brušenjem in drobljenjem materialov) in povečanim prometom (nepopolno zgorevanje) ter z dejstvom, da industrija iz dneva v dan vnaša v okolje večje količine in nove vrste potencialno nevarnih nanodelcev kljub nepoznavanju njihovega učinka na zdravje ljudi in okolje (Miller in Senjen, 2008). Zaradi tega je postal glavni cilj številnih raziskav razumevanje vloge in načina delovanja nanodelcev v živih sistemih, predvsem dogajanje na nivoju DNA ter ugotavljanje (eko)toksičnosti obstoječih in novih nanodelcev (Valiyaveettil, 2008).

## 2.2 Nanodelci TiO<sub>2</sub>

Titanov dioksid ali titanov(IV) oksid je naravni oksid titana s kemijsko formulo TiO<sub>2</sub>. V naravi nastaja v treh različnih oblikah: brookit, anatas in rutil. Najbolj pogosta oblika je rutilni TiO<sub>2</sub>, ki je hkrati tudi najbolj stabilna. Brookit in anatas se ob visokih temperaturah spremenita v rutilno obliko. Koordinacijsko število vseh treh kristalnih oblik je 6/3, kar pomeni, da je v vseh oktaedrih, ki so med seboj povezani preko ogljišč in robov, vsak ion titana povezan s šestimi ioni kisika, vsak kisik pa s tremi ioni titana.

Uporaba TiO<sub>2</sub> je zelo široka. Najpogosteje se uporablja kot pigment, ki daje snovem izrazito belino zaradi svojih UV-apsorpcijskih lastnosti. Zato ga pogosto najdemo v barvah in premazih, plastiki, papirju, prehrabnih izdelkih (kot aditiv z oznako E171), kot tudi v zdravilih in v večini zobnih past. Nanodelce TiO<sub>2</sub> najdemo v skoraj vsaki sončni kremi z zaščitnim faktorjem zaradi visokega lomnega količnika, močne

absorpcijske lastnosti ter sposobnosti ohranjanja barve pod vplivom UV-svetlobe. Kot tanek film ga industrija zaradi reflektivnih lastnosti uporablja za zrcala in za povečanje sijaja nekaterih dragih kamnov. V kozmetiki se uporablja ne samo kot pigment, temveč tudi kot zgoščevalec. Zaradi svojih absorpcijskih lastnosti se TiO<sub>2</sub>, še zlasti anatazni, uporablja tudi kot fotokatalizator. Ko izpostavimo TiO<sub>2</sub> UV-svetlobi, postane ta zelo hidrofilen, zaradi česar se pogosto uporablja kot samočistilna prevleka (npr. za okna) ter prevleka proti megljenju. TiO<sub>2</sub> vgrajujejo tudi v gradbene materiale, elektronska vezja, uporablja se kot antibakterijsko sredstvo, za čiščenje odpadnih voda, v medicini za povezavo umetnih vsadkov in kosti ter v številne druge namene.

Prav zaradi te izredno široke uporabnosti nanodelcev TiO<sub>2</sub> prihajamo ljudje v stik z njimi vsak dan. Zaradi tega je nujno potrebno razumeti njihove učinke tako na ljudi kot na okolje. Na eni strani številne študije (Zhu s sod., 2008; Griffitt s sod., 2008; Kahru s sod., 2008) kažejo na netoksičnost nanodelcev TiO<sub>2</sub>, na drugi pa so tu nekatere raziskave in znanstveniki, ki trdijo drugače (Donaldson s sod., 1996; Adams s sod., 2006; Long s sod., 2006; Sayes s sod., 2006; Federici s sod., 2007; Wang s sod., 2007a; Reeves s sod., 2008).

Zaradi obstoja večih različnih oblik nanodelcev TiO<sub>2</sub>, od katerih ima vsaka svoje značilne lastnosti, je primerjava študij med seboj izredno težka. Kar stvari še otežuje pa je, da je lahko toksičnost golih nanodelcev zelo odvisna od okolja, v katerem se nahajajo. Tako npr. povzročajo nanodelci TiO<sub>2</sub> z ustvarjanjem prostih radikalov pod vplivom svetlobe smrt alg, medtem ko se v odsotnosti svetlobe vežejo v prst (zaradi agregacije) in ne povzročajo toksičnih učinkov (Lubick, 2008).

IARC (International Agency for Research on Cancer) je kljub nesoglasjem glede toksičnosti nanodelcev TiO<sub>2</sub> pred kratkim klasificirala prah nanodelcev TiO<sub>2</sub> v skupino kancerogenosti 2B: možno kancerogen za ljudi. Študije na miših in podganah (Warheit s sod., 2007) namreč kažejo na to, da vdihavanje prahu nanodelcev TiO<sub>2</sub> povzroča pri testnih živalih nastanek raka na dihalih. Znake, ki so jih opazovali pri tej študiji, so opazili tudi pri ljudeh, predvsem tistih, ki delajo v zaprašenih okoljih. Zaradi tega so te raziskave, po mnenju IARC, relevantne za ljudi, ki opravljajo dela, povezana z izpostavitvijo prahu nanodelcev TiO<sub>2</sub>, čeprav študije na ljudeh še niso pokazale omenjene povezave (Baan s sod., 2006).

### 2.3 Test na zarodkih rib

Test na zarodkih rib ali FET (angl. Fish Embryo Test) je alternativna metoda ugotavljanja akutne strupenosti stabilnih, nehlapnih in v vodi topnih snovi, ki v Evropski Uniji že nadomešča testiranje na odraslih ribah. Prednosti FET so, da testiranje toksičnosti snovi poteka v najbolj občutljivejšem stadiju osebka, da se prozorne zarodke enostavno opazuje s pomočjo mikroskopa in da je potrebno za testiranje določene snovi bistveno manj testnih osebkov v primerjavi z do sedaj uveljavljeni testi na odraslih živalih. Poleg tega je testiranje na zarodkih bolj etično od testiranja na živih, odraslih živalih (Lange s sod., 1995; Nagel, 2002; Hill s sod., 2005), kar je v skladu z direktivo REACH (396, 30/12/2006) in direktivo o zaščiti poskusnih živali v znanstvene namene (86/609/EEC).

Primarno je OECD (Organizacija za gospodarsko sodelovanje in razvoj) za uporabo FET predpisala vrsto *Danio rerio* oz. cebrice (Suttner, 1996; Gutjahr, 2007), vendar pa se test lahko tudi prilagodi nekaterim drugim vrstam, kot so črnoglavi pisanec

(*Pimephales promelas*), japonska medaka (*Oryzias latipes*) in druge relevantne vrste (Braunbeck in Lammer, 2006).

*Danio rerio* je vrsta, ki jo v naravi najdemo v vodotokih jugovzhodnih regij Himalaje, v regijah Gangesa in vzhodnih delih Indije ter drugod. Navadno naseljuje reke, kanale, jarke, ribnike in počasi tekoča in mirujoča vodna telesa, vključno z riževimi polji (Westerfield, 2000). Cebrice so zelo priljubljene kot testni organizem in imajo zaradi svojih lastnosti prednost pred drugimi vretenčarji. Ker imajo cebrice zelo podoben set genov kot ljudje ter podobno tarčno mesto za zdravljenje človeških bolezni, jih znanstveniki vse pogosteje uporabljajo tudi kot testni model za reševanje genetskih vprašanj. Na ta način se v procesu raziskovanja uporablja manjše število miši, podgan in drugih modelnih testnih živali. Cebrice so zelo primerne za živalske študije med drugim tudi zaradi svoje majhnosti, nezahtevnosti pri vzgoji ter velike produkcije robustnih zarodkov. Razvoj zarodka cebrice se konča v štirih dneh z dobro karakteriziranimi razvojnimi stadiji. Zarodki, ki se v velikem številu razvijejo izven mater, so transparentni, kar omogoča direktno opazovanje in detekcijo bolezenskih znakov zarodkov, njihove smrti, slabega razvoja fenotipov in proučevanje transporta v realnem času ter učinkov testiranih snovi *in vivo* (Westerfield, 2000; Spitsbergen in Kent, 2003; Hill s sod., 2005; Scholz s sod., 2008; ZFIN). Zaradi vseh teh karakteristik zarodki cebric ponujajo edinstvene priložnosti za raziskovanje vplivov snovi, ki lahko prehajajo skozi ovoj zarodka ter v telo zarodkov, kot so npr. nanodelci (Scholz s sod., 2008).

Princip FET je izpostavitve oplojenih zarodkov rib testni raztopini do končane embriogeneze, ki pri zarodkih cebric traja le 72–96 h, pri japonski medaki in črnoglavemu pisanču pa nekoliko dlje. Zarodki izbrane vrste so tako od oploditve do končanega embrionalnega razvoja posamično izpostavljeni različnim koncentracijam testne raztopine na mikrotitrskih ploščah. Največkrat izberemo pet različnih koncentracij testne snovi, ki jo zaradi zahtev zarodkov raztopimo v sveže pripravljene ter prepihane vodi ISO (vodi s specifično koncentracijo soli, ki je sprejeta s strani Mednarodne organizacije za standardizacijo – ISO 7346-3:1998) in seveda kontrolno raztopino – vodo ISO. Posamezni FET z izbranimi koncentracijami testne snovi zaradi reprezentativnosti večkrat (vsaj trikrat) ponovimo. Pri posameznem testu je po deset zarodkov izpostavljenih posamezni koncentraciji testne snovi, ki jih po 24 in 48 urah primerjamo z zarodki iz kontrolne raztopine. Pri tem se določijo letalni, subletalni ter teratogeni učinki testne snovi (Schulte in Nagel, 1994; Nagel, 2002). Na podlagi letalnih učinkov v primerjavi s kontrolami se izračuna  $LC_{50}$  (koncentracija, pri kateri 50 % testnih zarodkov ne kaže letalnih znakov) po 24 ter 48 h (Braunbeck in Lammer, 2006), NOEC (najvišja koncentracija, pri kateri še ni opaznih učinkov testne snovi) in LOEC (najnižja koncentracija, pri kateri se že opazijo učinki testne snovi).

Med letalne učinke prištevamo koagulacijo zarodka, nepritrjenost repa zarodka na rumenjaki, odsotnost somit (mase mezoderme porazdeljene vzdolž obeh strani živčnega kanala, ki se razvije pri odraslih osebkih v dermis, skeletne mišice in vretenca) ter odsotnost srčnega utripa. Med subletalne učinke štejemo zavrto epibolijo (obraščanje, preraščanje celih celičnih slojev), nedokončan razvoj oči, odsotnost spontanega premika, odsotnost krvnega obtoka, edem (nakopičenje tekočine v tkivu v medceličnem prostoru na poljubnem mestu v telesu), odsotnost pigmentacije in nenormalno hitrost srčnega utripa (pri cebricah je normalen utrip okoli 45 udarcev na 20 sekund) (Schulte in Nagel, 1994; Nagel, 2002). Posamezni razvojni stadiji normalnega razvoja cebric so prikazani v Tabeli 1 in na Slikah od 2 do 8.

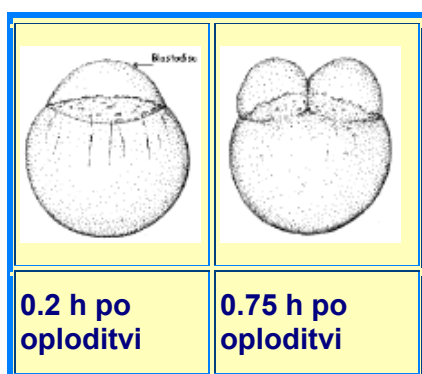
Na začetku ter na koncu posameznega FET je potrebno izmeriti tudi pH ter delež kisika v mikrotitrskih ploščah pri kontroli in dveh najvišjih koncentracijah testne snovi, da



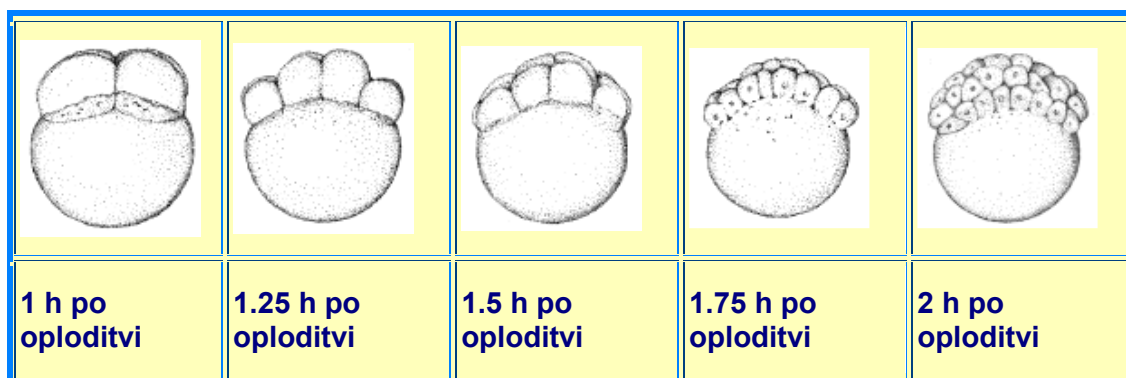
izločimo vpliv pH in kisika na preživetje in razvoj zarodkov. V primeru, da vrednosti pH in kisika niso v okviru predpisanih, test in rezultati niso zanesljivi.

**Tabela 1:** Stadiji razvoja vrste *Danio rerio* pri  $26 \pm 1^\circ \text{C}$  (povzeto po Kimmel in sod., 1994).

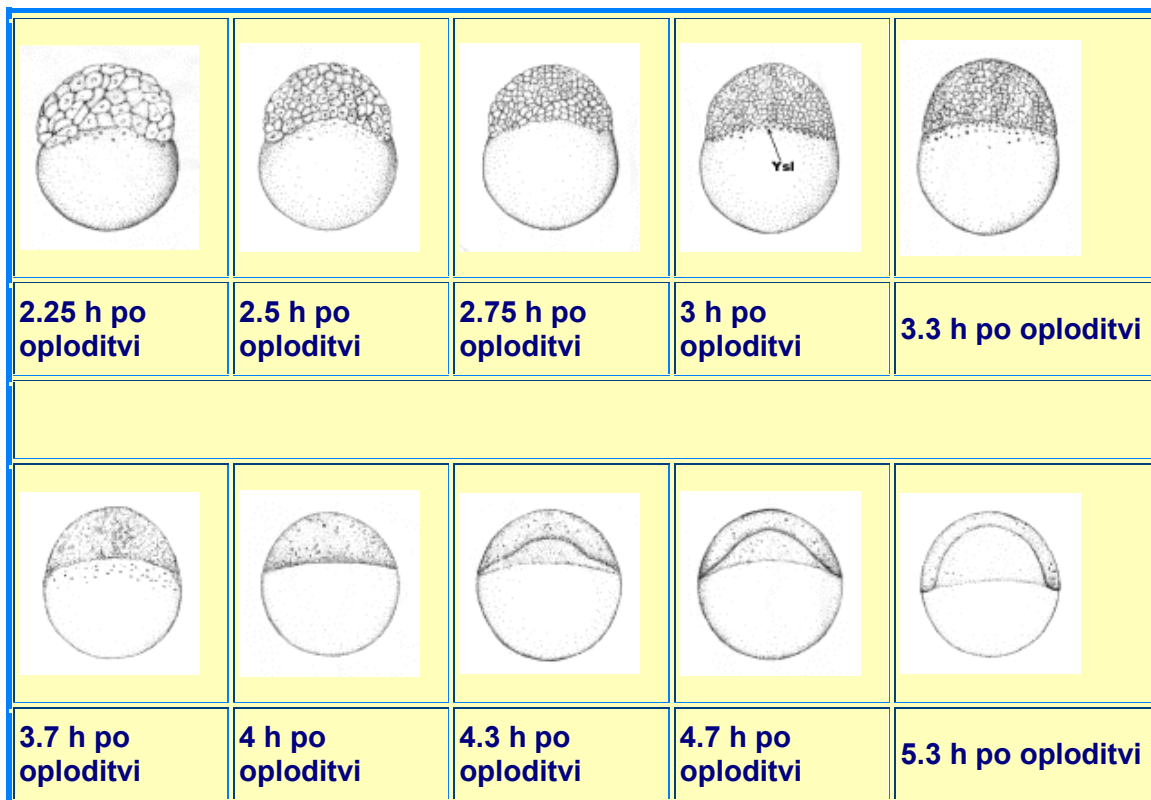
| Čas (h) | Stadij                   | Karakterizacija   |
|---------|--------------------------|---|
| 0       | Oploditev                | Tvorba zigote   |
| 0       | Zigota                   | Akumulacija citoplazme na animalnem polu, 1-celični stadij  |
| 0.75    | Cepitev                  | Razvoj od 2-celičnega do 16-celičnega stadija   |
| 2       | Blastulacija (brazdanje) | Razvoj blastule iz didkoblastule  |
| 5.25    | Gastrulacija             | Tvorba treh zarodnih plasti: zunanji in notranji ektoderm ter mezoderm                                  |
| 10.5    | Segmentacija             | Tvorba prvih vreten somit   |
| 24      | Faringula                | Pojav spontanega gibanja, zgodnje pigmentacije in ločitev repa od rumenjaka                             |
| 30–36   |                          | Zaviranje spontanega gibanja, pojav pigmentacije repa, močnega krvnega obtoka, pojav srčnega utripa ... |
| 72–96   | Izvalitev                | Reden srčni utrip, izrabljanje rumenjaka ...  |



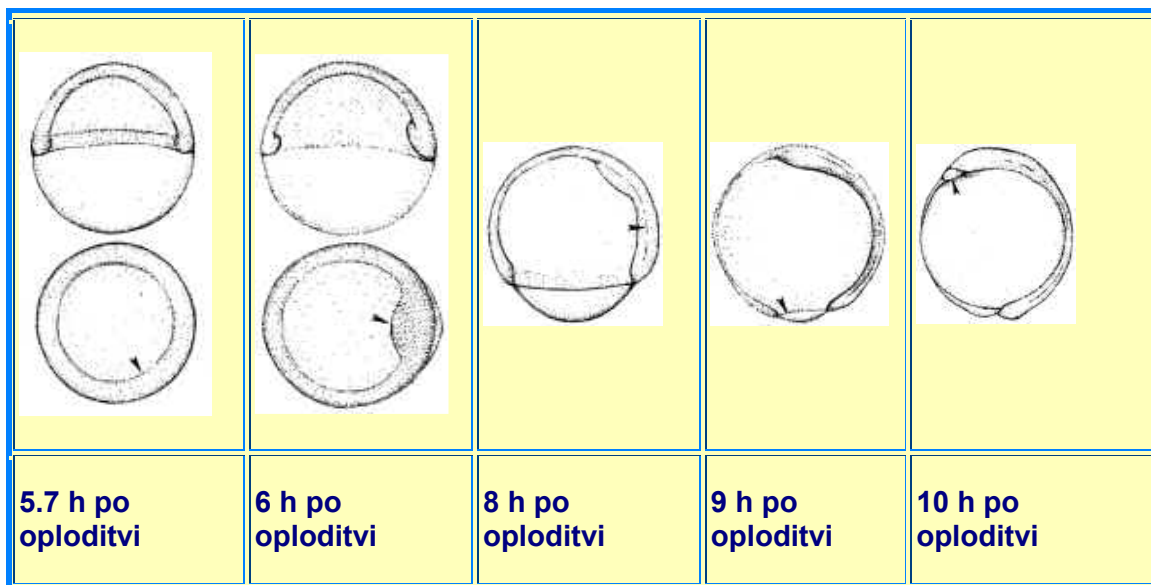
**Slika 2:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 0 do 0.75 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))



**Slika 3:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 0.75 do 2 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))



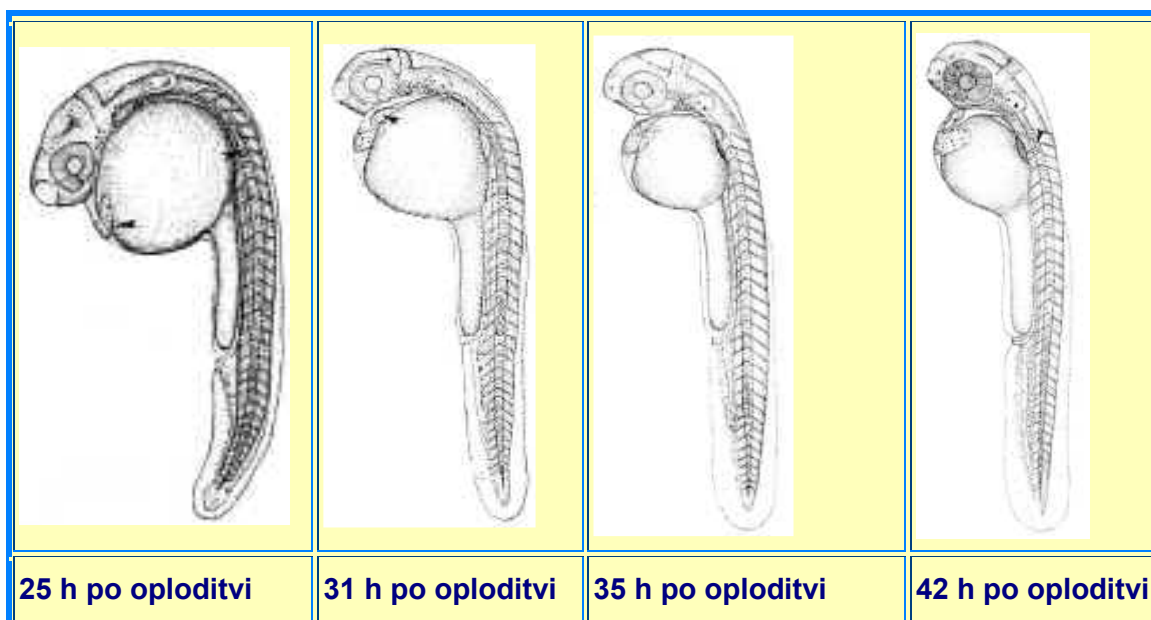
**Slika 4:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 2.25 do 5.3 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))



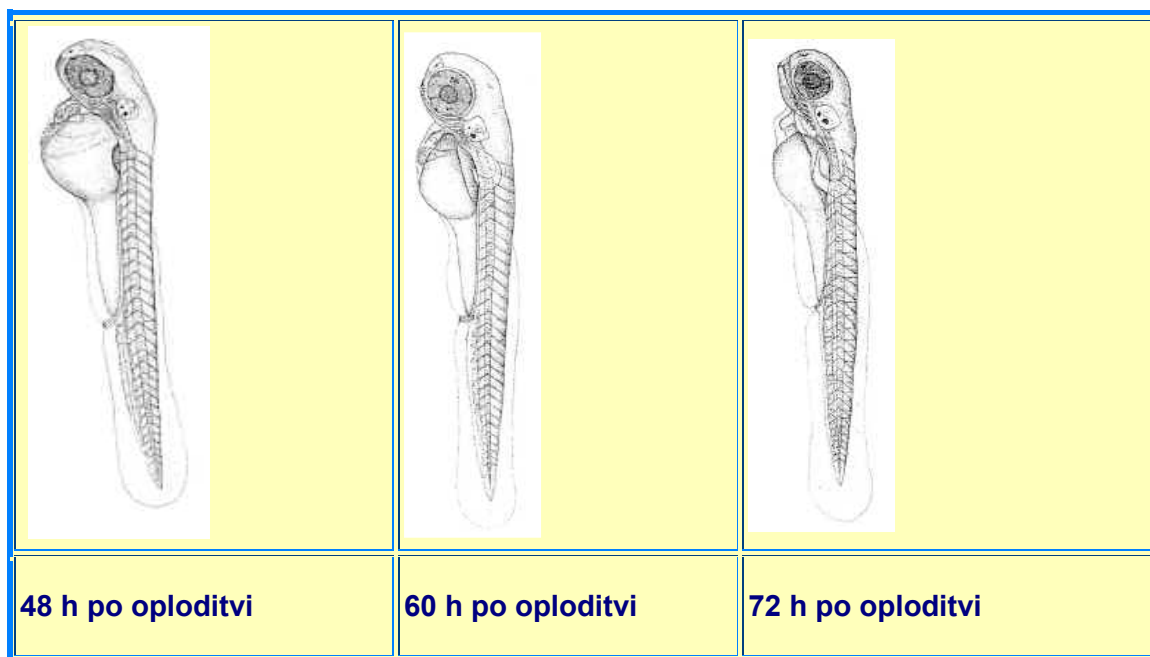
**Slika 5:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 5.3 do 10 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))



**Slika 6:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 11 do 22 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))



**Slika 7:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 25 do 42 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))



**Slika 8:** Normalni razvojni stadiji pri vrsti *Danio rerio*: 48 do 72 h po oploditvi, povzeto po Kimmel s sod., 1994 (vir: [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/stages/stages.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/stages/stages.html))

## 2.4 Test komet

Test komet ali gelska elektroforeza posamezne celice (angl. Comet assay ali SCGE - Single Cell Gel Electrophoresis assay) je enostavna, hitra in občutljiva tehnika za zaznavanje DNA poškodb na nivoju posamezne evkariontske celice. S testom komet lahko zaznamo eno- in dvo-verižne prelome DNA, oksidativne poškodbe DNA ter alkalno labilna mesta, ki so posledica neposrednih poškodb DNA ali pa nastanejo kot vmesna stopnja med popravljanjem poškodb DNA (McKelvey-Martin s sod., 2003; Diekmann s sod., 2004; Shaposhnikov s sod., 2008; Lovell in Omori, 2008).

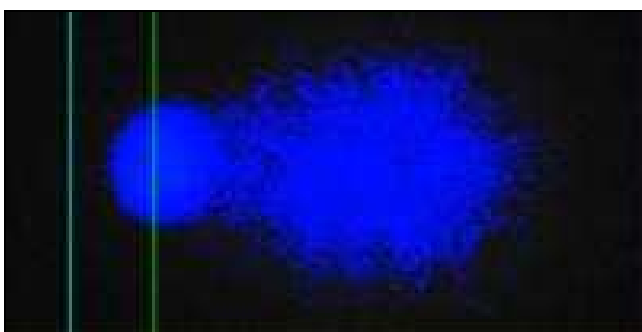
Švedska raziskovalca Östling in Johansson sta tehniko razvila že leta 1984, Singh pa jo je pozneje (1988) preoblikoval v test komet v alkalnih pogojih. Tehnika je postala uveljavljena metoda za določanje poškodb DNA, za genotoksikološke teste, za raziskovanje raka, biomonitoring in drugo (Brigger s sod., 2002; Shaposhnikov s sod., 2008). Postopek testa komet obsega vklapljanje suspenzije agaroze v celice z nizko temperaturo taljenja (LMP agaroz ali angl. Low melting-point agaroses), lizo (oz. razkroj celičnih in jedrnih membran) v nevtralnih ali alkalnih (pH>13) pogojih ter elektroforezo suspenzije razkrojenih celic. Temu nato sledi določanje stopnje DNA poškodb in statistična analiza podatkov (Singh s sod., 1988; Tice s sod., 2000; Hartmann s sod., 2003).

Vklapljanje celic v agarozo poteka tako, da suspenzije celic vnesemo v staljeno LMP (angl. Low Melting Point) agarozo na objektno stekelce in pokrijemo s krovno stekelcem. Po krajšem času strjevanja agaroze na 4°C, odstranimo krovno stekelce, čemur sledi postopek liziranja. Agaroz se uporablja zaradi svoje osmotske nevtralnosti, kar pomeni, da lahko raztopine prosto potujejo skozi agarozo do celic, pri čemer ne povzročijo premikanje celic znotraj plasti agaroze. Liziranje celic (razpad celičnih membran) poteka 1–2 h pri 4°C v nekoliko alkalni raztopini z visoko koncentracijo soli ter detergenta (triton X-100). Soli in triton v raztopini povzročijo razpad celičnih in jedrnih membran in s tem osvoboditev materiala DNA v obliki dvojne

vijačnice. Pri tem se vsi proteini, membrane in citoplazma odstranijo s stekelc, medtem ko v agaroznem gelu ostane le še DNA. Po končanem postopku liziranja celic sledi postopek odvijanja DNA (v raztopini, katere pH je odvisen od tega, katere tipe poškodb želimo opazovati). Najprej je potrebno stekelca pustiti v raztopini za elektroforezo, kjer alkalni pogoji omogočijo denaturacijo histonov (bazičnih beljakovin, ki povezujejo DNA in tvorijo kromosome) ter razvijanje DNA v dolge enojne verige. Ta postopek je nujno potreben, da DNA prosto potuje v električnem polju. Če se DNA namreč ne bi odcepila od histonov ali razvila v enojno verigo, bi po električnem polju potovala kot celota in DNA fragmentov ne bi bilo mogoče opaziti. Po 20 minutah denaturacije vključimo električno polje (okoli 1 V/cm) za 20 minut. Zatem stekelca nevtraliziramo ter obarvamo z DNA-specifičnim fluorescentnim barvilom (npr. z etidijevim bromidom (EtBr) oz. 2,7-diamino-10-etil-9-fenil-fenantridinijev bromidom) in analiziramo pod mikroskopom, povezanim z izbrano programsko opremo za analizo slik (McKelvey-Martin s sod., 1998; Rojas s sod., 1999; Avishai s sod., 2002; Collins s sod., 2007).

Nepoškodovana DNA je organizirana v dolgo molekulo. Ko pride do poškodb na nivoju DNA, se ta organizacija poruši. Posamezni nizi oz. fragmenti DNA verige med elektroforezo izgubijo kompaktno strukturo in se odcepijo od celotne verige. Električno polje pri procesu elektroforeze povzroči privlak negativno nabitih prelomljenih koncev in fragmentov DNA k anodi (pozitivni elektrodi), saj je DNA kot molekula negativno nabita. Nepoškodovana DNA veriga je zelo dolga, zato zelo počasi potuje proti anodi in se hitreje oddaljuje od nepoškodovane gmote DNA. Zaradi tega merimo količino fragmentov DNA, ki se oddalji od večinske celote, kot količino poškodovane DNA posamezne celice (Singh s sod., 1988).

Analizna programska oprema meri in primerja med seboj intenzivnost fluorescence celotnega jedra s fluorescenco fragmentov DNA, ki so se zaradi električnega polja oddaljili od celote. Močnejši kot je signal oddaljenih fragmentov DNA, močnejše so poškodbe dednega materiala in s tem genotoksičnost snovi, kateri so bile izpostavljene celice. Če je DNA poškodovana, pod mikroskopom opazimo strukture, podobne kometom (od tu tudi ime metode) z značilno okroglo glavo, ki jo predstavlja nepoškodovana DNA in repom, ki ga predstavljajo fragmenti DNA (Slika 9). Daljši in svetlejši je rep komete, večja je stopnja poškodbe DNA (Singh s sod., 1988).



**Slika 9:** Tipična slika komete (posneta s programsko opremo Comet Assay IV).

Pri obdelavi podatkov se lahko osredotočimo na različne podatke, pridobljene s programsko opremo. Dolžina repa (angl. tail length) je definirana kot maksimalna dolžina DNA fragmentov, merjeno bodisi od ocenjenega roba glave ali od centra glave. Odstotek DNA, ki je potovala (angl. % tail DNA) predstavlja del DNA v repu proti celotnemu kometu (glave in repa skupaj). Moment repa (angl. tail moment) pa je

definiran kot mera dolžine repa, pomnožena z deležem DNA v repu (Albertini s sod., 2000; Wang s sod., 2007b).

Kot večina metod zahteva tudi test komet uporabo in primerjavo testiranih vzorcev z referenčnimi kemikalijami oz. kontrolami. Kot negativna kontrola genotoksičnosti se pogosto uporablja NaCl, kot pozitivna kontrola, ki potrebuje metabolno aktivacijo, benzoapiren (ali BaP s formulo  $C_{20}H_{12}$ ), kot pozitivna kontrola, ki povzroča poškodbe DNA tudi v metabolno neaktivnih celicah, pa se pogosto uporablja metil-metansulfat (ali MMS s formulo  $C_2H_6O_3S$ ).

Test komet se ne uporablja le na celičnih kulturah *in vitro*, temveč ga lahko z manjšimi prilagoditvami uporabljamo tudi na tkivih organizmov ali njihovih zarodkih (Kosmehl s sod., 2006; Chen s sod., 2007). Nekateri znanstveniki (Jarvis in Knowles, 2003) so mnenja, da nam izvedba testa na celih organizmih zagotavlja bolj reprezentativne rezultate kot uporaba testa na celičnih kulturah (Kosmehl s sod., 2006), vendar pa lahko nastane problem pri tolmačenju rezultatov, saj so različni tipi celic, izoliranih iz celotnega organizma, lahko različno dovzetni za poškodbe DNA. Perspektivno metodo predstavlja uporaba testa komet na 24 ur starih zarodkih rib, ko celice še niso diferencirane in zato kažejo bolj homogen odziv kot pri starejših osebkih, pri katerih so celice že diferencirane in zato različno občutljive.

### 3 EKSPERIMENTALNI DEL – materiali in metode

Delo je potekalo v laboratorijih Nacionalnega inštituta za biologijo, na Oddelku za genetsko toksikologijo in biologijo raka.

#### 3.1 Titanov dioksid (TiO<sub>2</sub>)

Za testiranje smo uporabili titanov dioksid (TiO<sub>2</sub>) – Sigma Aldrich, deklarirana velikost 5 nm (637254 Titanium(IV) oxide, anatase) in 10 nm x 40 nm (637262 Titanium(IV) oxide, rutile). Osnovni podatki uporabljenih nanodelcev so zapisani v Tabeli 2.

**Tabela 2:** Splošni podatki o testiranih nanodelcih TiO<sub>2</sub>.

|                            | TiO <sub>2</sub> – anatazni | TiO <sub>2</sub> – rutilni              |
|----------------------------|-----------------------------|---|
| Podjetje izdelave delcev   | Sigma-Aldrich               | Sigma-Aldrich                           |
| Čistost                    | 99.7 %                      | 99.5 %                                  |
| CAS število                | 1317-70-0                   | 1317-80-2                               |
| Oblika                     | prah                        | prah                                    |
| Specifična površina delcev | 200–220 m <sup>2</sup> /g   | 130–190 m <sup>2</sup> /g               |
| Deklarirana velikost       | 5 nm (polmer kroglic)       | 10 nm x 40 nm (širina in dolžina palčk) |

#### 3.2 Določanje dejanske velikosti nanodelcev TiO<sub>2</sub>

##### 3.2.1 Fotografiranje delcev z vrstičnim elektronskim mikroskopom

Meritve z vrstičnim elektronskim mikroskopom so bile opravljene na Inštitutu tehničnih znanosti Srbske akademije znanosti in umetnosti v Beogradu v Srbiji.

Vzorci prahu nanodelcev TiO<sub>2</sub> so bili pred analizo neparjeni z zlatom s pomočjo naprave za napraševanje kovin (3ΔL-TEC SCD005) s tokom 30 mA z oddaljenostjo 50 mm v 180 s. Fotografije nanodelcev so bile nato posnete z vrstičnim elektronskim mikroskopom (JEOL-JSM-639OLV Japan), katerega energija elektronov znaša od 10 do 50 KeV-a, kar omogoča ločljivost v rangu enega nanometra.

##### 3.2.2 Analiza velikosti in porazdelitve delcev

Analiza velikosti delcev (particle size distribution analysis) TiO<sub>2</sub> v vodnem mediju je bila izvedena na Oddelku za nanostrukturne materiale na Inštitutu Jožef Stefan. Analizo nanodelcev TiO<sub>2</sub> smo opravili z laserskim granulometrom HORIBA LA-920 (HORIBA, Japonska). Naprava granulometer je sestavljena iz vira laserske svetlobe, fotodetektorja ter računalnika in izračunava velikost delcev na osnovi sipanja usmerjenih žarkov pri prehodu skozi dispergirane delce.

Kot medij smo uporabili destilirano vodo (oz. ISO-vodo). Suspenzijo nanodelcev TiO<sub>2</sub> je bilo potrebno pred analiziranjem velikosti delcev zaradi tvorbe agregatov najprej razbiti s pomočjo ultrazvoka. Za to sta bili uporabljeni dve metodi: ultrazvočna kopel in ultrazvočna sonda.

### 3.3 Priprava založnih in testnih koncentracij

ISO-voda (ISO 7346-3:1998) je raztopina točno določene sestave, ki jo uporabljamo za raztapljanje testnih snovi ter kot kontrolno raztopino v FET, in je bila sprejeta s strani Mednarodne organizacije za standardizacijo. Sveže pripravljena ISO voda ima pH med 7.6 in 8.0, vsebnost  $\text{CaCO}_3$  150–175 mg/L.

Za 1 l ISO-vode je potrebno zmešati skupaj po 250 mL vseh 4 založnih raztopin naslednjih soli:  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  založne koncentracije 1176 mg/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  založne koncentracije 493 mg/L,  $\text{NaHCO}_3$  založne koncentracije 252 mg/L ter KCl založne koncentracije 22 mg/L. ISO-vodo smo dan pred uporabo preprihali s kisikom, tako da je količina raztopljenega kisika na dan uporabe pri stalni pH vrednosti vsaj 90 % (OECD guideline for the testing of chemicals, 2006). Tako pripravljeno ISO-vodo smo uporabili za pripravo založnih koncentracij  $\text{TiO}_2$  deklarirane velikosti 5 nm (v nadaljevanju kot mali delci), 10 nm x 40 nm (v nadaljevanju kot veliki delci) in sedmih različnih testnih koncentracij suspenzije  $\text{TiO}_2$  obeh velikosti.

Za pripravo založne koncentracije (1 mg/mL) malih nanodelcev  $\text{TiO}_2$  smo zatehtali 0.1 g prahu  $\text{TiO}_2$  ter ga raztopili v 100 mL sveže ISO-vode. Ker so se nanodelci  $\text{TiO}_2$  slabo suspendirali v ISO vodi, smo jih čez noč pustili na magnetnem mešalu, pred uporabo pa vsakokrat dobro premešali. Založno koncentracijo smo po uporabi shranili v hladilniku ter jo dan pred naslednjo uporabo čez noč pustili na magnetnem mešalu. Založno koncentracijo  $\text{TiO}_2$  smo pripravili na povsem enak način za delce obeh velikosti.

Koncentracije  $\text{TiO}_2$ , uporabljene v FET: 0.1, 1, 10, 50, 100, 250 in 500 mg/L.  
Koncentracije  $\text{TiO}_2$ , uporabljene v testu komet: 0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10 mg/L.

### 3.4 Test na zarodkih rib cebric (FET)

#### 3.4.1 Vzdrževanje cebric

Odrasle ribe cebrice smo gojili v dveh 80 L steklenih akvarijih s temperaturo vode 26° C. Cebrice so bile v razmerju spolov 1:1, okvirna gostota porazdelitve rib pa je znašala 1 riba/L vode. Režim osvetljevanja je bil 12:12 ur, hranjenje pa je potekalo vsaj dvakrat dnevno s suho hrano ter vsaj enkrat dnevno z živimi rakci *Artemia salina*.

#### 3.4.2 Nastavitev FET

Na dan izvedbe poskusa smo v akvarij pred začetkom osvetljevanja akvarija vstavili pasti za lovljenje ribjih zarodkov. Pasti za lovljenje zarodkov so narejene tako, da spodnji stekleni del pokriva kovinsko ali plastično rešeto, na katerega so pritrjene zelene plastične niti, ki simulirajo naravno zeleno rastje.

Eno uro po začetku drstenja smo pobrali pasti z zarodki iz akvarija, nakar smo zarodke previdno prenesli v petrijevko, kjer smo jih dobro sprali s sveže preprihano ISO vodo. Pod mikroskopom smo nato izbrali le oplojene in za poskus primerne zarodke.

Pripravili in označili smo mikrotitrne plošče 4x6 (Slika 10) in vanje odpipetirali 10-krat po 2 mL vsake od petih izbranih testnih raztopin nanodelcev  $\text{TiO}_2$  ter ISO vodo kot kontrolno raztopino. Plošče smo nato prenesli na termostatisirano ogrevalno ploščo (Slika 4 A) ob mikroskopu, ki je ves čas ohranjala temperaturo raztopin v ploščah na



26° C ter previdno prenesli po en zarodek iz petrijevke v posamezno luknjico (napolnjeno z raztopino) na mikrotitrski plošči.

Izmerili smo delež kisika in pH-vrednosti kontrolne raztopine ter najvišje uporabljene testne koncentracije v vsakem posameznem FET. Napolnjene mikrotitrski plošče smo nato pokrili s prozorno samolepilno folijo in s tem preprečili morebitno izhlapevanje testne raztopine. Mikrotitrski plošče smo dali nato v vrečke in jih shranili v inkubatorju, ki je ohranjal primerno konstantno temperaturo (26° C) in primeren svetlobni režim (12:12 ur).



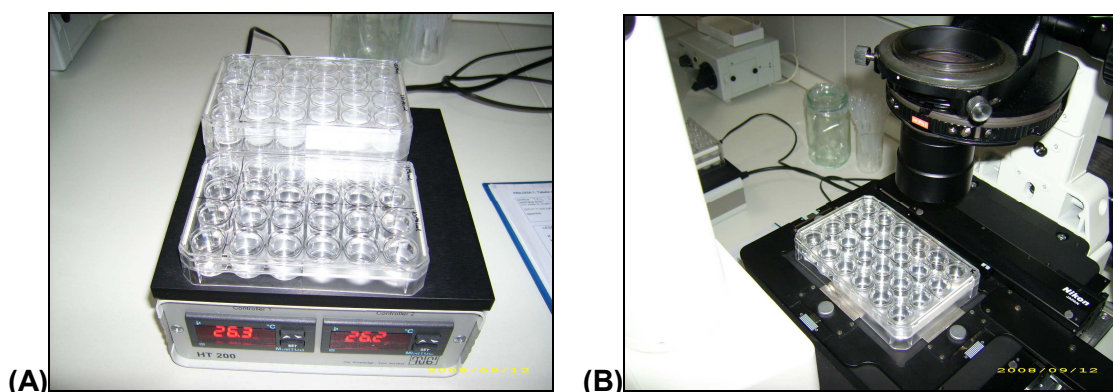
**Slika 10:** Testna (mikrotitrski) plošča za test na zarodkih rib.

Za vsak FET smo nastavili po 4 testne plošče. Prva plošča nam je služila kot zunanja kontrola, kjer smo zarodke izpostavili ISO-vodi, naslednje tri plošče pa za izbrane testne suspenzije nanodelcev TiO<sub>2</sub>. Pri vsaki od teh treh plošč so luknjice prvega stolpca služile kot notranja kontrola, v luknjicah ostalih petih stolpcev pa so bile naše testne suspenzije (izpostavili smo po 10 zarodkov na koncentracijo).

Notranja in zunanja kontrola sta po kemijski sestavi enaki. Razlikujeta se le v tem, da je pri zunanji kontroli, ki je na posebni plošči, popolnoma izključen vpliv testirane raztopine oz. suspenzije, medtem ko je pri notranji kontroli zaradi bližine testne kemikalije na isti plošči vpliv mogoč (npr. pri hlapnih testiranih raztopinah), kar se kaže v povečani smrtnosti (večja od 10 %) zarodkov, izpostavljenim notranji kontroli. Povečana smrtnost v zunanji kontroli kaže na slabo kvaliteto zarodkov ali na neprimerno ravnanje z njimi (npr. pri prenašanju s pipeto).

### 3.4.3 Mikroskopski pregled zarodkov

24 ur po izpostavitvi zarodkov je sledil pregled razvoja z invertnim mikroskopom (Nikon Eclipse TE300). Mikrotitrski plošče smo dali na ogrevano ploščo ob mikroskopu (Slika 11A), ki nam je omogočila, da so bili zarodki na konstantni temperaturi 26° C, in opazovali zarodke pod 100-kratno povečavo (Slika 11B). Določitev stopnje razvoja je potekala po opisu Schulte in Nagel (1994) ter Nagel (1998). Rezultate smo zapisovali v tabele, da smo lahko ob koncu posameznega testa izračunali delež smrtnih in subletalnih učinkov. Po pregledu in določitvi razvoja vseh zarodkov smo mikrotitrski plošče ponovno prekrili s prozorno samolepilno folijo, jih dali v vrečke in vrnili v inkubator za naslednjih 24 ur.



**Slika 11:** Mikrotitrne plošče na ogrevalni plošči (A) in opazovanje zarodkov z mikroskopom (B).

Po 48-ih urah od nastavitve posameznega FET smo mikrotitrne plošče z zarodki ponovno pregledali pod mikroskopom in zarodkom določili stopnjo razvoja. V tem primeru smo se poleg opazovanja zakrnelih zarodkov osredotočili posebej na znake razvoja, prikazane na Sliki 12.

| LEGENDA                                  |   |                          |    |
|--|---|--------------------------|----|
| <b>razvoj</b>                            | razvoj zarodka po Kimmel et al., 1995         |                          |    |
| <b>u/20 s</b>                            | število utripov srca na 20 sekund (~ 45/20 s) |                          |    |
| <b>Razvojni znaki (angl. endpoints):</b> |   | čas izpostavljenosti (h) |    |
|  |   | 24                       | 48 |
| <b>N</b>                                 | normalno razvit zarodek                       |                          |    |
| *** <b>Z</b>                             | zakrnjenost (koagulacija)                     | +                        | +  |
| ** <b>E</b>                              | epibolija (ni še delitev)                     | +                        |    |
| ** <b>O</b>                              | ni oči  | +                        | +  |
| *** <b>S</b>                             | ni somit                                      | +                        | +  |
| ** <b>P</b>                              | ni spontanih premikov (normalno ~2/60 s)      | +                        | +  |
| *** <b>R</b>                             | rep ni pritrjen na rumenjaki                  | +                        | +  |
| *** <b>U</b>                             | ni utripanja srca (normalno ~45/20 s)         |                          | +  |
| ** <b>Kr</b>                             | ni krvnega obtoka                             |                          | +  |
| ** <b>B</b>                              | ni barvanja (pigmentacija)                    |                          | +  |
| ** <b>Ed</b>                             | edem  |                          | +  |
| * <b>Zr</b>                              | zaostalost v razvoju (dopiši ~h)              | +                        | +  |
| * <b>Dr</b>                              | deformiranost repa                            | +                        | +  |
| ***                                      | letalni                                       |                          |    |
| **                                       | subletalni                                    |                          |    |
| *  | teratogeni                                    |                          |    |

**Slika 12:** Opazovani znaki razvoja zarodka glede na čas izpostavitve testni raztopini.

Opazovanje razvoja zarodkov in predvsem določitve hitrosti srčnega utripanja zahteva zelo dobro vidljivost, zato je bilo potrebno zarodke v višjih koncentracijah (50, 100, 250 in 500 mg/L raztopljenega TiO<sub>2</sub> v ISO vodi) nekoliko prepahati s pomočjo kapalke. Le

tako smo lahko namreč delce  $\text{TiO}_2$ , ki so se usedli na ovojnice zarodkov, odstranili in uspeli pridobiti verodostojne podatke o razvoju zarodkov.

### 3.5 Test komet

#### 3.5.1 Priprava zarodkov in raztopin

Dan pred izvedbo testa komet smo zarodke izpostavili suspenzijam  $\text{TiO}_2$  za 24 ur, kot je opisano za FET. Poleg izbranih testnih koncentracij nanodelcev  $\text{TiO}_2$  smo uporabili 25  $\mu\text{M}$  benzoapiren – BaP (Sigma, CAS: 50-32-8), ki predstavlja pozitivno kontrolo posredno delujočih genotoksinov in 2.5 mg/L metil metan sulfat – MMS (Fluka, EEC 2006250), kot pozitivno kontrolo neposredno delujočih genotoksinov, 25  $\mu\text{M}$  raztopino NaCl (pro analysis, Sigma) pa smo uporabili kot negativno kontrolo genotoksičnosti. Vse raztopine so bile pripravljene v preprihani ISO-vodi.

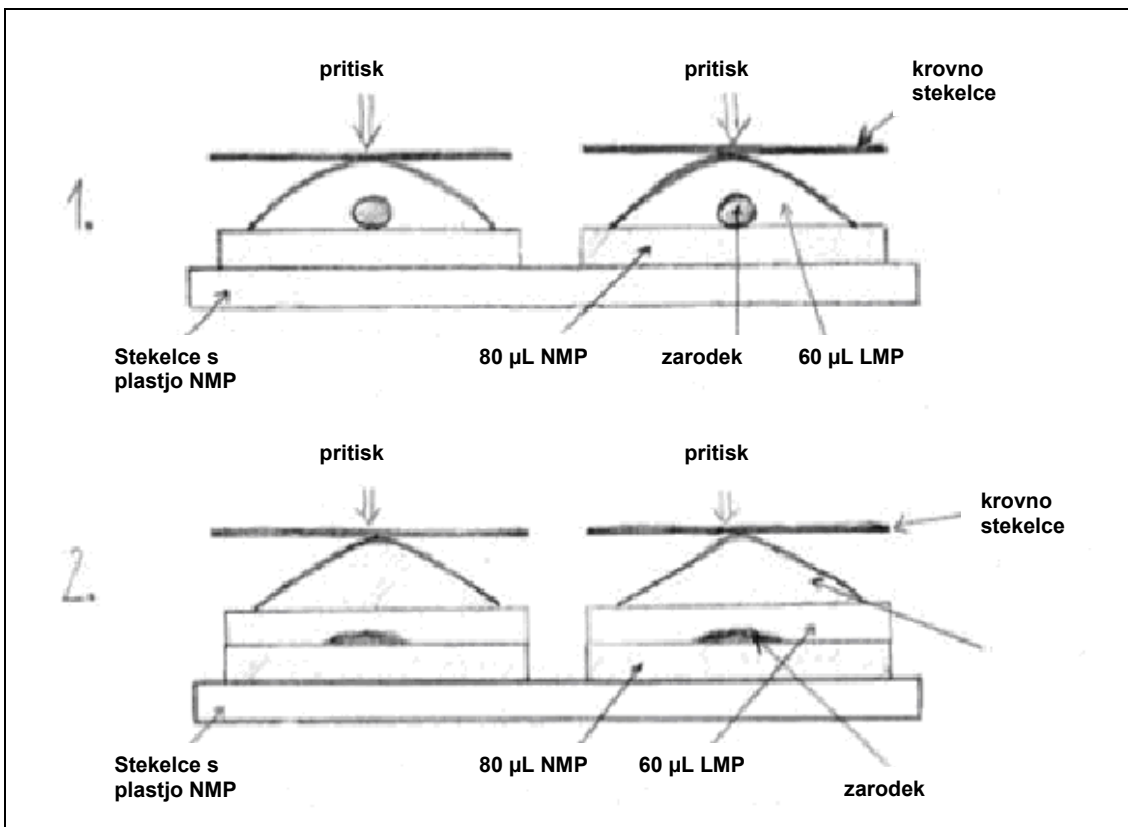
Objektna stekelca smo najprej s pomočjo 100-odstotnega metanola sterilizirali in ožgali v plamenu gorilnika. V mikrovalovni pečici smo si ogreli v steklenički strjeno 1-odstotno (0.2g/20mL) NMP (Normal Melting Point) agarozo, tako da se je utekočinila. Vanjo smo pomočili stekelca, jih obrisali s spodnje strani in za nekaj ur dali v termostatirano pečico (program Fan, 60° C), kjer so se stekelca posušila. Tik pred uporabo smo jih nekoliko segreli v termostatirani pečici, da se je lahko naslednja plast agaroze lažje prijela.

Pred izvedbo testa komet smo si pripravili še: 1.5 % LMP (Low Melting Point) agarozo, nevtralizacijski pufer (0.4 M raztopino trisa s pH 7.5) ter raztopino za lizo (2.5 M NaOH, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris in 1% Triton (X-100), pH 10).

#### 3.5.2 Izvedba testa

Na levo in desno stran stekelca smo kanili po 80  $\mu\text{l}$  1 % NMP agaroze, jih pokrili s krovnim stekelcem ter jih pustili v hladilniku pri 4° C za 5 min. Med tem časom smo pripravili zarodke za test komet. Za mehčanje ovojnic smo zarodke za natančno 4 minute izpostavili Pronasi E (2 mg/ml), nato pa jih nežno sprali v ISO-vodi. Na strjeno plast NMP smo nato skupaj z zarodkom nanесли 60  $\mu\text{l}$  1.5 % LMP, pokrili z krovnim stekelcem in zarodek nežno zmečkali s pritiskanjem na krovno stekelce s pomočjo tope paličice. Stekelca smo zatem položili v hladilnik na 4° C. Po 5 min smo stekelca prekrili z drugo plastjo (80  $\mu\text{l}$ ) NMP agaroze in še zadnjič vrnili v hladilnik za 5 min na 4° C (Slika 13).

Stekelca smo zložili v plastično banjico, prelili z raztopino za lizo in pustili učinkovati 60–90 min v hladilniku na 4° C. Medtem ko so bila stekelca v raztopini za lizo, smo si pripravili elektroroforetski pufer (300 mM NaOH, pH 7.5, 1 mM EDTA). Po končani lizi smo stekelca zložili v elektroforetsko banjico z elektroforetskim pufrom in pustili 20 min v hladilniku na 4° C, da se DNA odvijuje. Temu je sledila elektroforeza (20 min na 23 V in 400 mA). Po končani elektroforezi smo stekelca za 15 minut potopili še v nevtralizacijski pufer pri 4° C.



**Slika 13:** Shema izvedbe testa komet.

### 3.5.3 Barvanje in mikroskopiranje preparatov

Stekelca smo obarvali z barvilom etidijev bromid (5 µg/mL) ter jih analizirali s pomočjo fluorescentnega mikroskopa (Nikon Eclipse 800) s filtrom G-2A in programom Comet Assay IV. Celice (naključnih 55) smo slikali pod 40-kratno povečavo z objektom Sfluor.

## 3.6 Statistična obdelava podatkov

Po opravljenem testiranju raztopin izbranih koncentracij nanodelcev TiO<sub>2</sub>, tako FET kakor testa komet, smo rezultate obdelali s programsko opremo Prism 5 (GraphPad software inc.), nekatere podatke pa smo tudi obdelali v programu MS Excel. Rezultate, ki smo jih dobili z vsaj tremi neodvisnimi ponovitvami FET, smo najprej obdelali v programu MS Excel. Podatke o razvojnih znakih zarodkov, ločene glede na velikost delcev, smo vpisali v program in z osnovnimi statističnimi funkcijami izračunali naslednje podatke: odstotek smrtnosti v kontrolah (<10%), letalne učinke testiranih nanodelcev TiO<sub>2</sub> po 24 in 48 h urah, subletalne in teratogene učinke po 24 in 48 h ter hitrost srčnega utripa po 48 h. Podatke smo prikazali tudi grafično v obliki histogramov.

V program Prism 5 smo najprej vnesli podatke o letalnih učinkih, dobljenih s FET, za vsako velikost nanodelcev posebej, nato smo transformirali vrednosti x-osi s funkcijo  $x=\log(x)$ . Po postopku logaritmiranja smo izvedli nelinearno regresijo po modelu:  $\log(\text{agonist})$  vs.  $\text{response} - \text{variable slope}$ . Uporabili smo vsaj pet različnih koncentracij nanodelcev TiO<sub>2</sub> obeh izbranih velikosti. Na diagramih, ki nam jih je izrisal program Prism 5, smo za lažjo predstavbo in boljšo interpretacijo rezultatov prikazali srednje vrednosti (aritmetične sredine) s standardno napako (SE – standard error).

Med podatki, dobljenimi z analizo kometov s programom Comet Assay IV, so bili za nas pomembni podatki o % intenzivnosti repov (angl. tail intensity) (Wiklund in Agurell, 2003), ki smo jih statistično obdelali v programu Prism 5. Analizirali smo celice vsaj 6 neodvisnih zarodkov na posamezni tretma. Rezultate smo statistično analizirali in predstavili na dva načina:

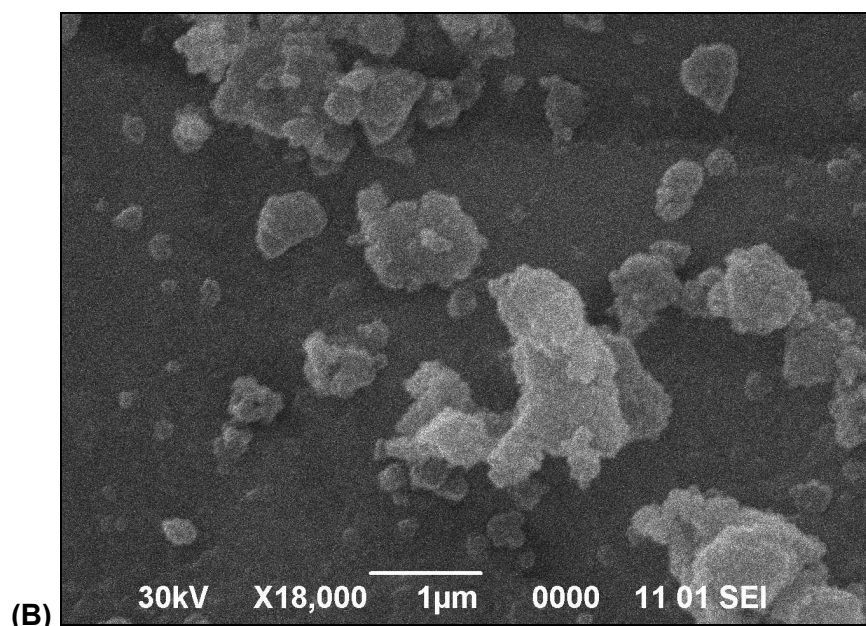
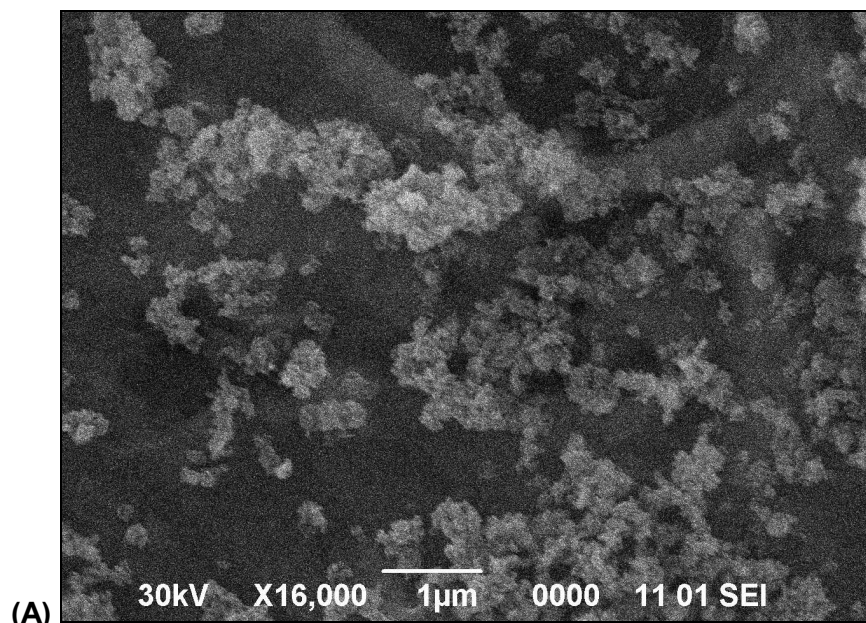
a) razlike med kometi vseh kontrolnih celic in vseh celic iz vsake skupine tretiranih zarodkov smo testirali z neparametrično analizo varianc (ANOVA ali Kruskal-Wallis test), ki smo ji dodali še Dunnov post test. Princip metode ANOVA je primerjava razpršenosti varianc med vsemi testiranimi snovmi (tako med kontrolami kakor med suspenzijami nanodelcev  $\text{TiO}_2$ ), vendar smo se osredotočili na porazdelitev varianc med kontrolami in posameznimi izbranimi testnimi koncentracijami nanodelcev  $\text{TiO}_2$ . Rezultate smo predstavili kot »škatle z ročaji« (angl. box-plots).

b) za analizo razlik v % DNA v repu med tretiranimi in kontrolnimi zarodki smo zaradi nenormalne porazdelitve % DNA v repu uporabili primerjave vrednosti mediane (Me) namesto aritmetičnih sredin, da se izognemo vplivu ekstremno odstopajočih podatkov. Vrednosti median smo primerjali s studentovim t-testom. Kot statistično značilno razliko smo upoštevali  $P < 0,05$ . Rezultate smo prikazali v obliki histogramov.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Določitev dejanske velikosti nanodelcev $\text{TiO}_2$

S pomočjo vrstičnega elektronskega mikroskopa (JEOL-JSM-639OLV Japonska, z energijo elektronov od 10 do 50 KeV) so nam na Inštitutu tehničnih znanosti Srbske akademije znanosti in umetnosti v Beogradu v Srbiji posneli fotografije agregatov nanodelcev  $\text{TiO}_2$  obeh izbranih kristalnih oblik in velikosti (Slika 14A, B).



**Slika 14:** Agregati: (A) malih nanodelcev, (B) velikih nanodelcev  $\text{TiO}_2$ , posneli z vrstičnim elektronskim mikroskopom (JEOL-JSM-639OLV Japonska) (vir: Inštitut tehničnih znanosti Srbske akademije znanosti in umetnosti, 2008).

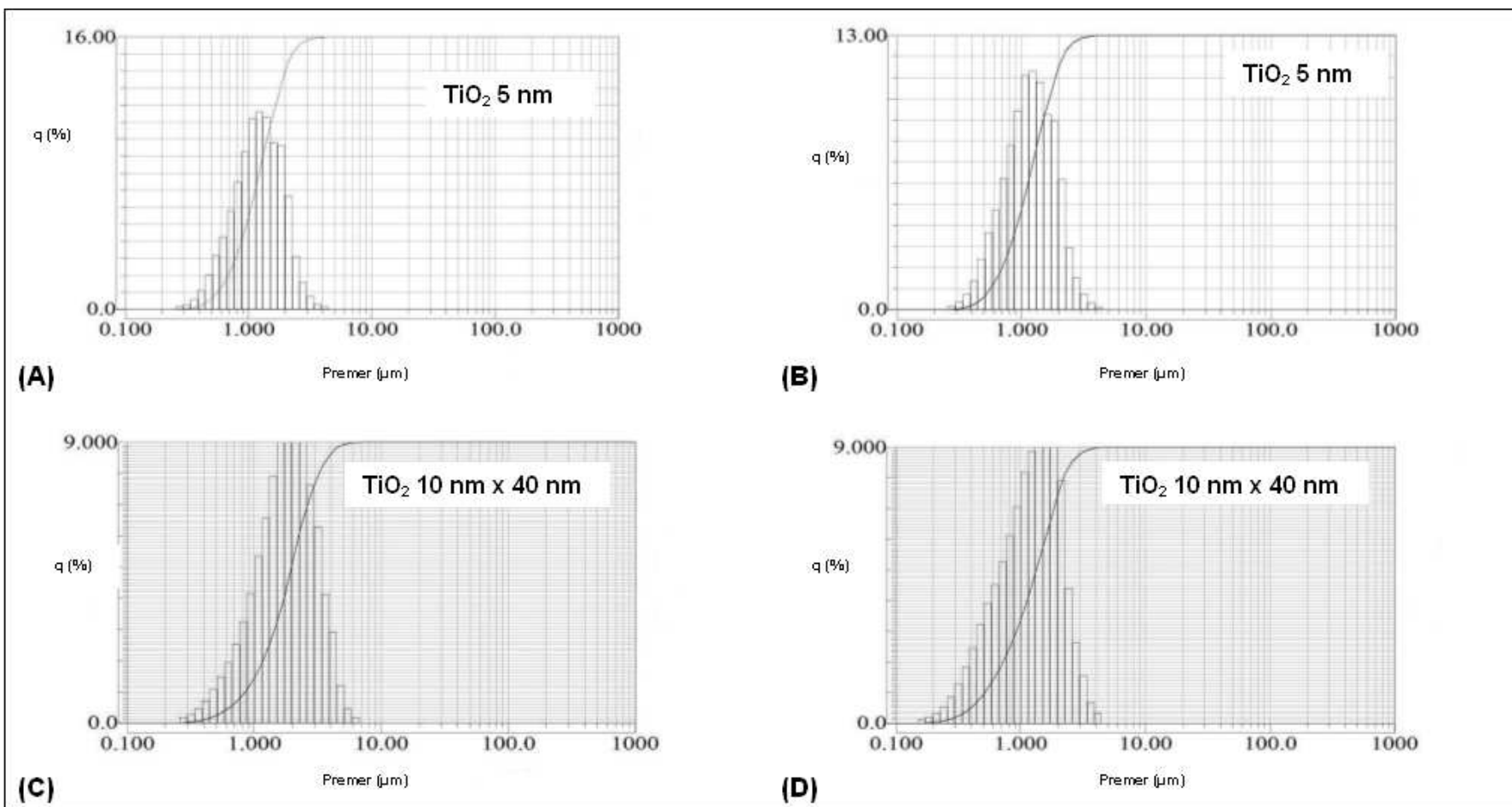
Večina malih (Slika 14A) in velikih (Slika 14B) nanodelcev TiO<sub>2</sub> je v analiziranem vzorcu agregiranih, sestavljenih iz manjših delcev nanometrskih dimenzij. Kljub temu pa je lahko s pomočjo merila (1 µm) na spodnjem delu fotografij opaziti tudi manjše posamezne delce v nanometriškem merilu.

Analiza distribucije velikosti delcev (particle size distribution analysis), ki smo jo izvedli na Oddelku za nanostrukturne materiale Inštitutu Jožef Stefan (Slika 15), je pokazala veliko odstopanje med deklarirano in dejansko velikostjo uporabljenih nanodelcev TiO<sub>2</sub>. Pred izvedbo meritev velikosti delcev smo suspenzijo nanodelcev izpostavili dvema različnima metodama razbijanja agregatov z ultrazvokom: ultrazvočni kopeli in ultrazvočni sondi. Meritve so pokazale, da je kljub razbijanju agregatov z ultrazvokom velikost nanodelcev TiO<sub>2</sub> tudi do 240-krat večja od deklarirane velikosti (Tabela 3), izkušnje pa, da nanodelcev TiO<sub>2</sub> z ultrazvokom v ISO-vodi ni mogoče učinkovito razbiti. Pri vsem je potrebno upoštevati, da smo z granulometrom najverjetneje uspeli izmeriti le velikost suspenzije nanodelcev TiO<sub>2</sub>, ne pa tudi njihove usedline.

**Tabela 3:** Podatki o srednjih vrednosti (medianah) dejanske velikosti testiranih nanodelcev TiO<sub>2</sub>.

|  | TiO <sub>2</sub> – anatazni | TiO <sub>2</sub> – rutilni |
|--|-----------------------------|----------------------------|
| Dejanska velikost (UZ sonda) – mediana | 1180 nm                     | 1226 nm                    |
| Dejanska velikost (UZ kopel) – mediana | 1218 nm                     | 1838 nm                    |

Zaradi neprimernosti razpoložljivih metod ni mogoče določiti odstotka delcev, ki se v raztopini nahajajo v nanometriškem merilu. Oceniti ne moremo niti deleža nanodelcev, ki so zmožni prehoda skozi pore (velikosti 17 nm<sup>2</sup>) v izpostavljene zarodke in so torej biorazpoložljivi.



**Slika 15:** Grafični prikaz porazdelitve dejanske velikosti nanodelcev TiO<sub>2</sub> (particle size distribution analysis) po tretiranju z ultrazvokom: (A) mali delci - UZ kotel, (B) mali delci - UZ sonda, (C) veliki delci - UZ kotel, (D) veliki delci - UZ sonda (vir: IJS, 2008).



## 4.2 Rezultati FET

### 4.2.1 Testiranje odziva zarodkov na prepihanje

Že pri koncentraciji 100 mg/L testiranih nanodelcev  $\text{TiO}_2$  je bila pokritost zarodka z nanodelci tako velika (Slika 16), da je bilo nemogoče določiti hitrost srčnega utripa ali celo preživetja zarodka. Zato smo za testiranje učinkov nanodelcev  $\text{TiO}_2$  izbrali koncentracije 100 mg/L in nižje. Tudi pri nižjih koncentracijah se je pojavljala velika pokritost ovojnice z nanodelci (Slika 16), zaradi česar je bilo med izvedbo FET potrebno zarodke s pomočjo kapalke nekoliko prepihati. Da bi se prepričali, ali izbrani postopek odstranjevanja nanodelcev (in njihovih agregatov) z ovojnic nima vpliva na fiziološke procese zarodkov, smo opravili manjši vmesni test. V tem testu smo primerjali srčni utrip zarodka, ki ga nismo izpostavili prepihanju, s hitrostjo srčnega utripa istega zarodka potem, ko smo ga izpostavili prepihanju. Ker se hitrost srčnega utripa pri tem ni razlikovala, lahko sklepamo, da torej prepihanje oz. postopek, ki smo ga uporabili za odstranjevanje nanodelcev  $\text{TiO}_2$  z ovojnice zarodkov, ni vplival na povečanje stresa in na spremembo hitrosti srčnega utripa.

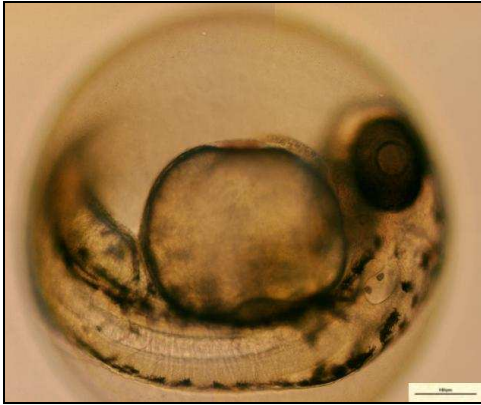


**Slika 16:** Pokritost ovojnice zarodkov z delci  $\text{TiO}_2$  pri koncentracijah 10, 50 in 100 mg/L po 48 h razvoja (pred postopkom prepihanja).

### 4.2.2 Rezultati mikroskopskega pregleda zarodkov

Zarodkom, ki so bili izpostavljeni različnim koncentracijam testne suspenzije nanodelcev  $\text{TiO}_2$ , smo določili stopnjo razvoja. Pri tem smo se osredotočili na vse znake razvoja (Slika 12), še posebej pozorni pa smo bili na preživetje zarodkov in hitrost srčnega utripa (število utripov v 20 sekundah).

Pri mikroskopskem pregledu zarodkov smo največkrat opazovali normalni razvoj zarodkov (Slika 17A, B), mrtve oz. zakrknjene zarodke (Slika 17C) ter zarodke z razvojem edema (Slika 17D).



**(A)** Normalen razvoj (bočno) po 48 h



**(B)** Normalen razvoj (od zgoraj) po 48 h



**(C)** Razvoj somit in pigmenta (od zadaj) po 48 h



**(D)** Razvoj edema (bočno) po 48 h



**(E)** Zakrknjenost zarodka po 48 h

**Slika 17:** Zarodki rib cebric po 48 h razvoja: (A) normalen razvoj (bočno), (B) normalen razvoj (od zgoraj), (C) razvoj somit in pigmenta na repu (od zadaj), (D) razvoj edema (bočno), (E) mrtev oz. zakrknjen zarodek. Merilo v spodnjem kotu predstavlja 500  $\mu\text{m}$ .

### 4.2.3 Letalni učinki po 24 in 48 h

V prvih dveh ponovitvah FET smo uporabili višje koncentracije testne suspenzije malih nanodelcev  $\text{TiO}_2$ . Ker rezultatov za višje koncentracije testne suspenzije (500, 250 ter delno 100 mg/L) zaradi neuspešnega odstranjevanja delcev z ovojnic zarodkov nismo uspeli dobiti, smo v drugih dveh ponovitvah FET uporabili nižje koncentracije (Slika 18).

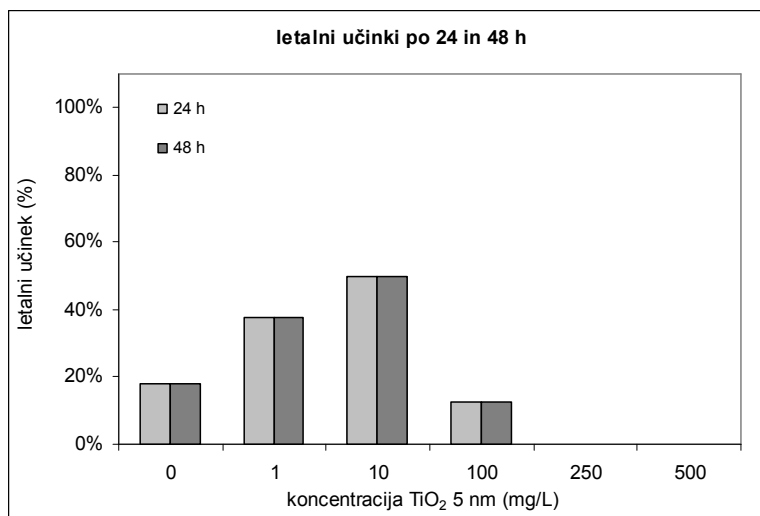
Smrtnost zarodkov po 24 in 48 h razvoja je znašala v primeru testiranja malih delcev  $\text{TiO}_2$  od 0 do 40 % (Slika 18). Izjema je bila le smrtnost pri koncentraciji 100 mg/L v prvi ponovitvi FET (dosegla je vrednost 50 %). Ker pa je bila smrtnost v kontroli višja od predpisanih 10 % (znašala je 18 %), so tako rezultati iz prvega FET manj zanesljivi. Pri velikih delcih je znašala smrtnost po 24 in 48 h razvoja od 0 do 30 % (Slika 19). Pri nekaterih koncentracijah v posameznih ponovitvah testa presenetljivo ni opaziti smrtnosti oz. je ta celo nižja od smrtnosti v kontroli. Razlogov za to je lahko več. Morda se nanodelci vedejo in delujejo nekoliko drugače kot do sedaj raziskane kemikalije in nimajo koncentracijske odvisnosti delovanja. Ne smemo pa tudi pozabiti, da so različni zarodki različno občutljivi in kažejo zelo različne rezultate, kar se ujema z razmerami v naravi.

Podatki, pridobljeni s FET, ne kažejo linearne odvisnosti, saj naraščanje smrtnosti z naraščajočo koncentracijo za majhne in velike nanodelce  $\text{TiO}_2$  ni jasno opazno. Čeprav razlike niso statistično značilne, lahko opazimo razlike med kontrolo in vsemi izbranimi testnimi koncentracijami nanodelcev obeh izbranih velikosti. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko kljub statistično neznačilnim razlikam sklepamo, da imajo testirani nanodelci  $\text{TiO}_2$  manjši negativen vpliv na zgodnji razvoj rib cebric, saj že v koncentracijah od 0.1 mg/L naprej povzročajo do povprečno 20 % smrtnost izpostavljenih zarodkov po 24 in 48 h razvoja (Slika 22).

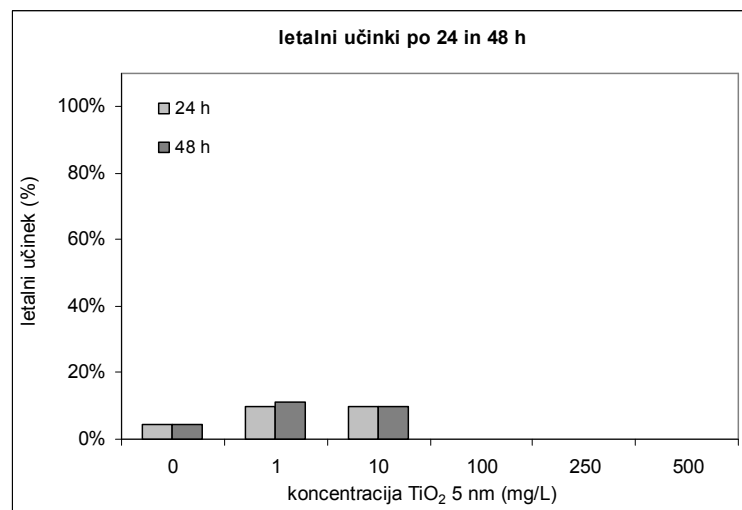
### 4.2.4 Hitrost srčnega utripa po 48 h

Hitrost srčnega utripa je eden od znakov razvoja zarodkov, ki nam daje pomemben vpogled v delovanje organizma izpostavljenemu testni raztopini. Kot smo že opisali, je bila določitev hitrost srčnega utripa pod ovojnico, prekrito z nanodelci, nemogoča, zaradi česar smo v prvih dveh FET (Slika 20A, B) ostali brez podatkov pri zarodkih, izpostavljenih suspenziji malih nanodelcev  $\text{TiO}_2$  v koncentracijah 500, 250 ter delno 100 mg/L.

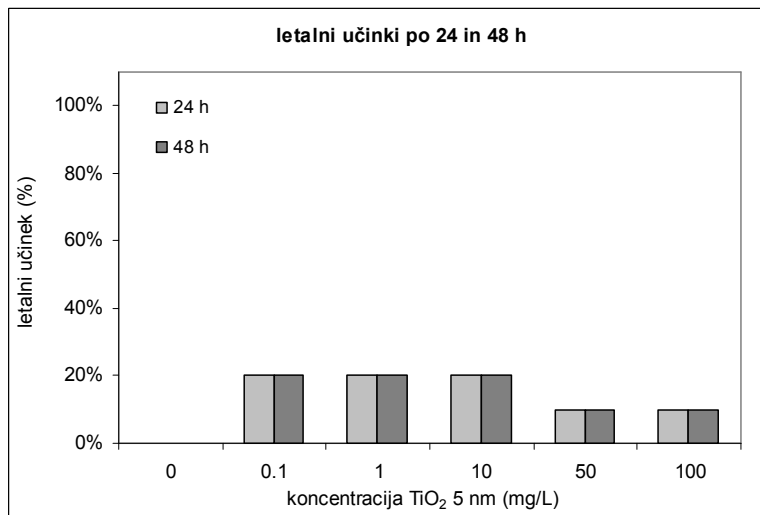
Pri zarodkih, ki so bili izpostavljeni velikim nanodelcem  $\text{TiO}_2$ , smo opazili trend znižanja števila utripov na min z naraščajočo koncentracijo. Čeprav razlike niso statistično značilne, je morda tudi majhna razlika v hitrosti srčnega utripa izpostavljenih zarodkov v primerjavi s kontrolo (Slika 21) lahko zelo pomembna. V nekaterih primerih (Slika 20D) pri koncentraciji 1 mg/L, kjer ni bilo smrtnosti (Slika 18D), je opaziti razliko v primerjavi s kontrolo. Ta podatek kaže na to, da so tudi v primerih, ko je bila smrtnost izpostavljenih zarodkov enaka ali nižja od kontrole (Slika 18D, Slika 19A, B), mali in veliki nanodelci imeli negativen vpliv na zarodke. Čeprav se ta vpliv ni končal s smrtjo zarodkov, je vplival nanje v obliki povečanega stresa, posledično znižanja števila utripov srca na minuto in potencialno na upočasnitev celotnega nadaljnjega razvoja zarodkov.



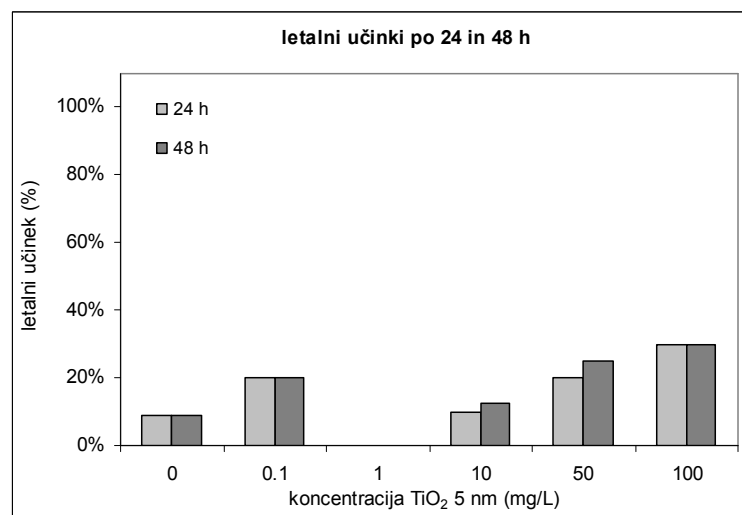
**(A) Letalni učinki po 24 in 48 h v prvem FET**



**(B) Letalni učinki po 24 in 48 h v drugem FET**

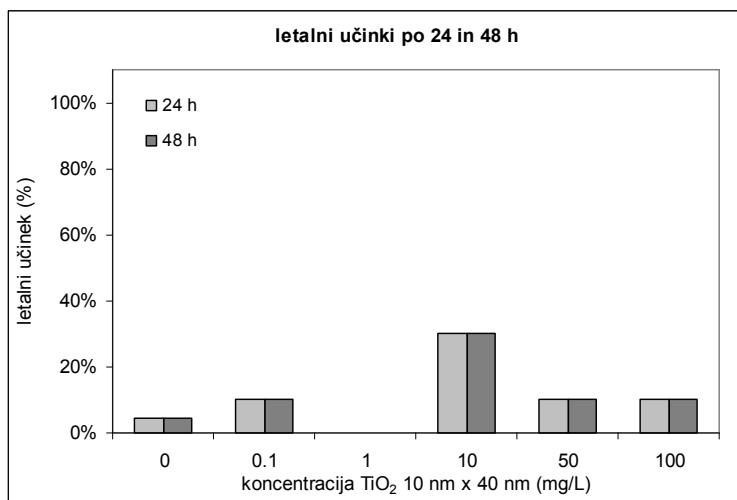


**(C) Letalni učinki po 24 in 48 h v tretjem FET**

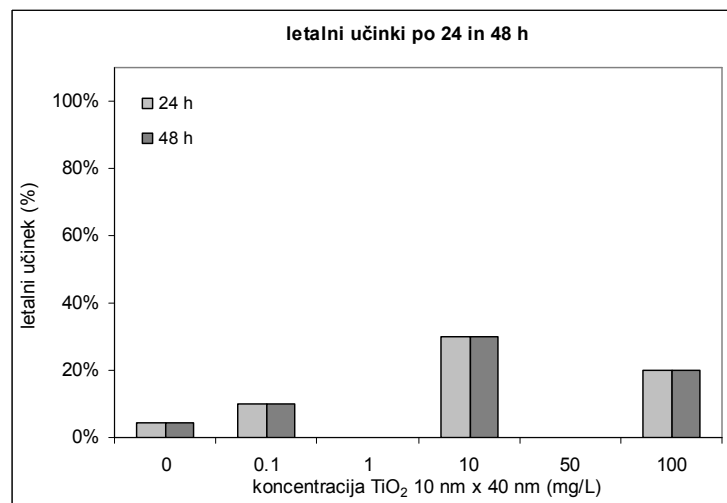


**(D) Letalni učinki po 24 in 48 h v četrtem FET**

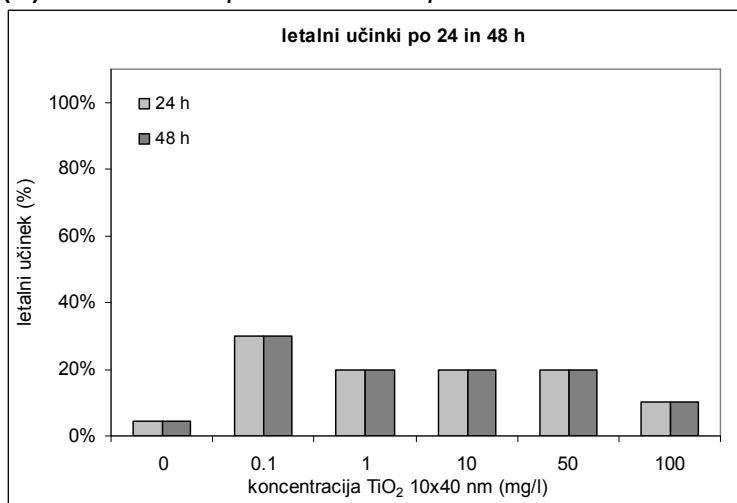
**Slika 18:** Rezultati testiranja akutne strupenosti malih TiO<sub>2</sub> nanodelcev (deklarirane velikosti 5 nm) po 24 in 48 h razvoja zarodkov rib cebric.



**(A) Letalni učinki po 24 in 48 h v prvem FET**

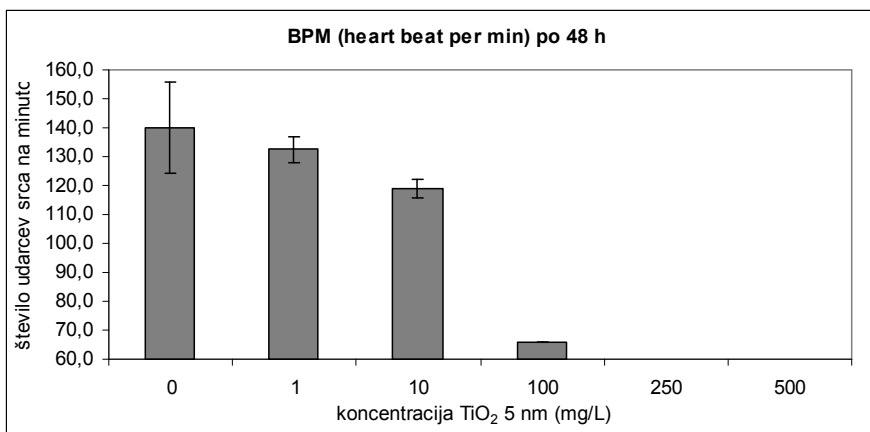


**(B) Letalni učinki po 24 in 48 h v drugem FET**

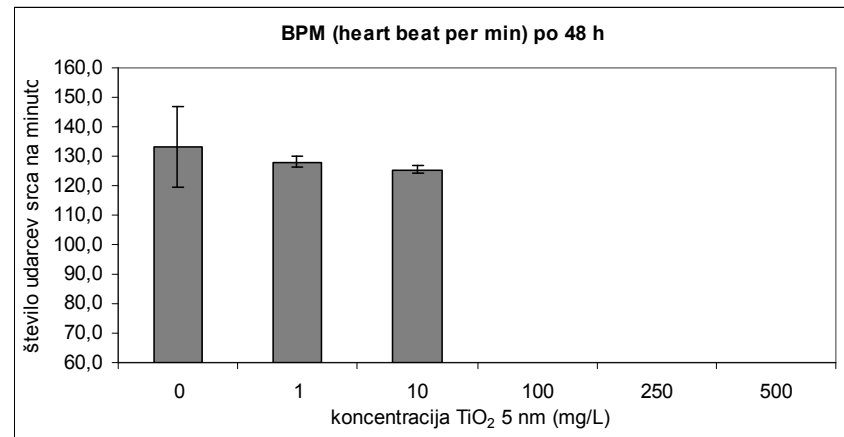


**(C) Letalni učinki po 24 in 48 h v tretjem FET**

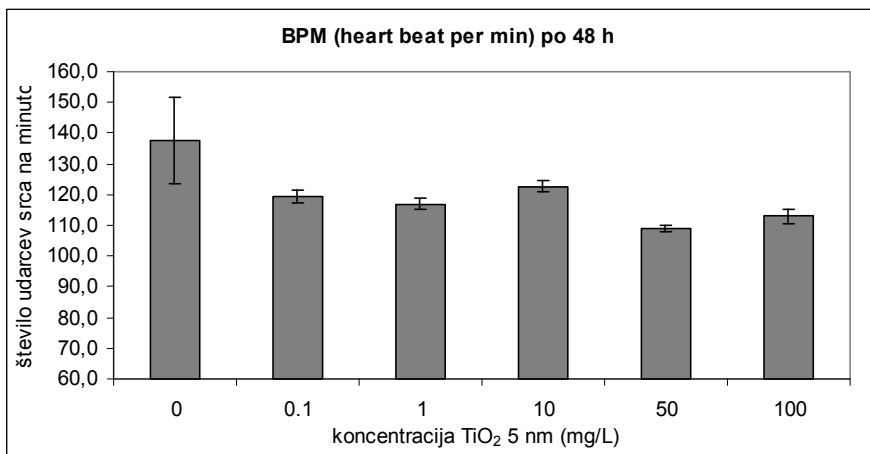
**Slika 19:** Rezultati testiranja akutne strupenosti velikih TiO<sub>2</sub> nanodelcev (deklarirane velikosti 10 nm x 40 nm) po 24 in 48 h razvoja zarodkov rib cebric.



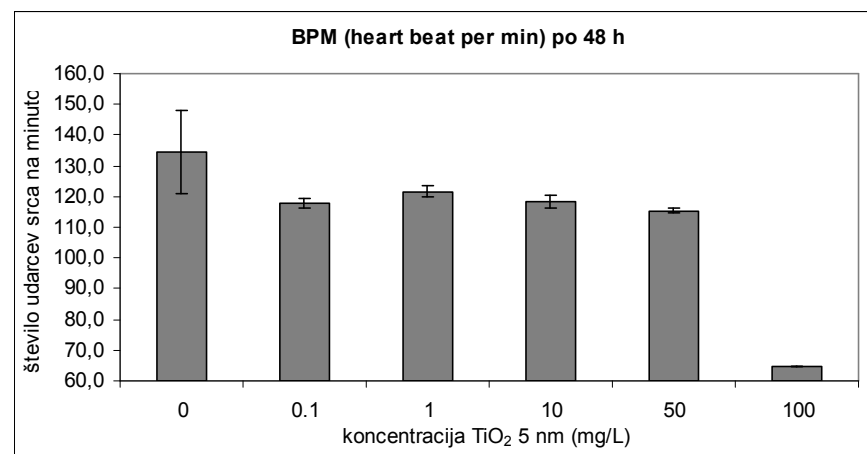
**(A)** Hitrost srčnega utripa po 48 h v prvem FET



**(B)** Hitrost srčnega utripa po 48 h v drugem FET

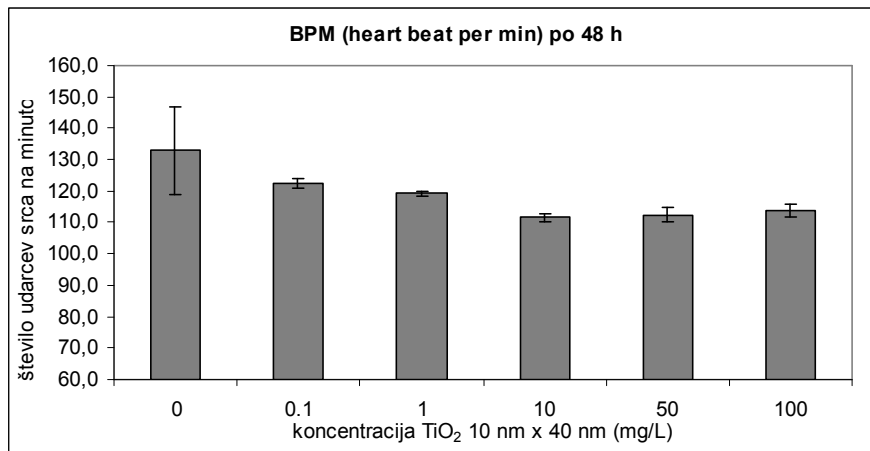


**(C)** Hitrost srčnega utripa po 48 h v tretjem FET

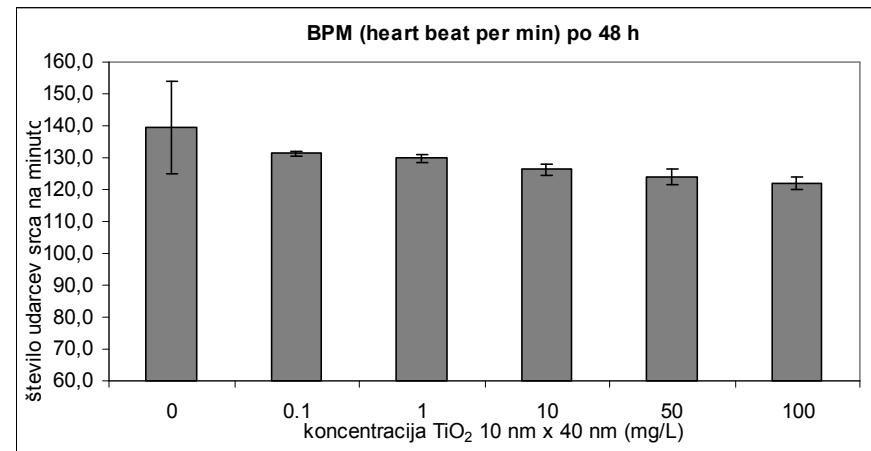


**(D)** Hitrost srčnega utripa po 48 h v četrtem FET

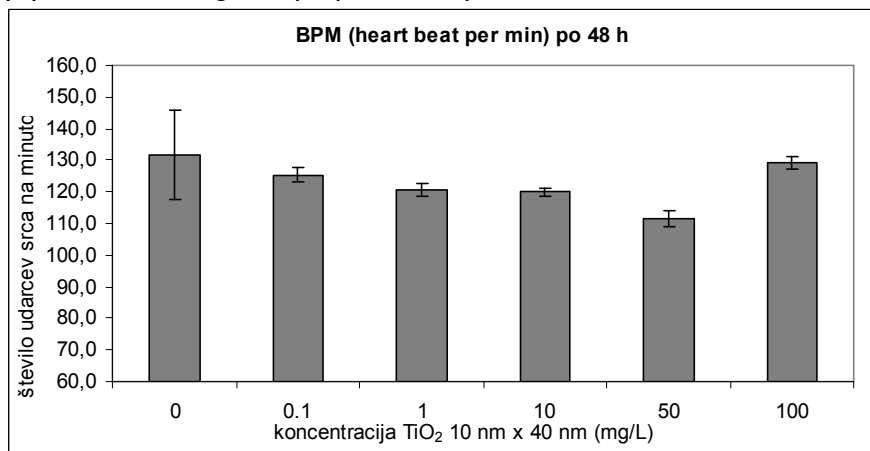
**Slika 20:** Hitrost srčnega utripa (udarci na min) po 48 h razvoja zarodkov, izpostavljenih suspenziji malih nanodelcev TiO<sub>2</sub> (deklarirane velikosti 5 nm).



**(A)** Hitrost srčnega utripa po 48 h v prvem FET



**(B)** Hitrost srčnega utripa po 48 h v drugem FET



**(C)** Hitrost srčnega utripa po 48 h v tretjem FET

**Slika 21:** Hitrost srčnega utripa (udarci na min) po 48 h razvoja zarodkov, izpostavljenih suspenziji velikih nanodelcev TiO<sub>2</sub> (deklarirane velikosti 10 nm x 40 nm).

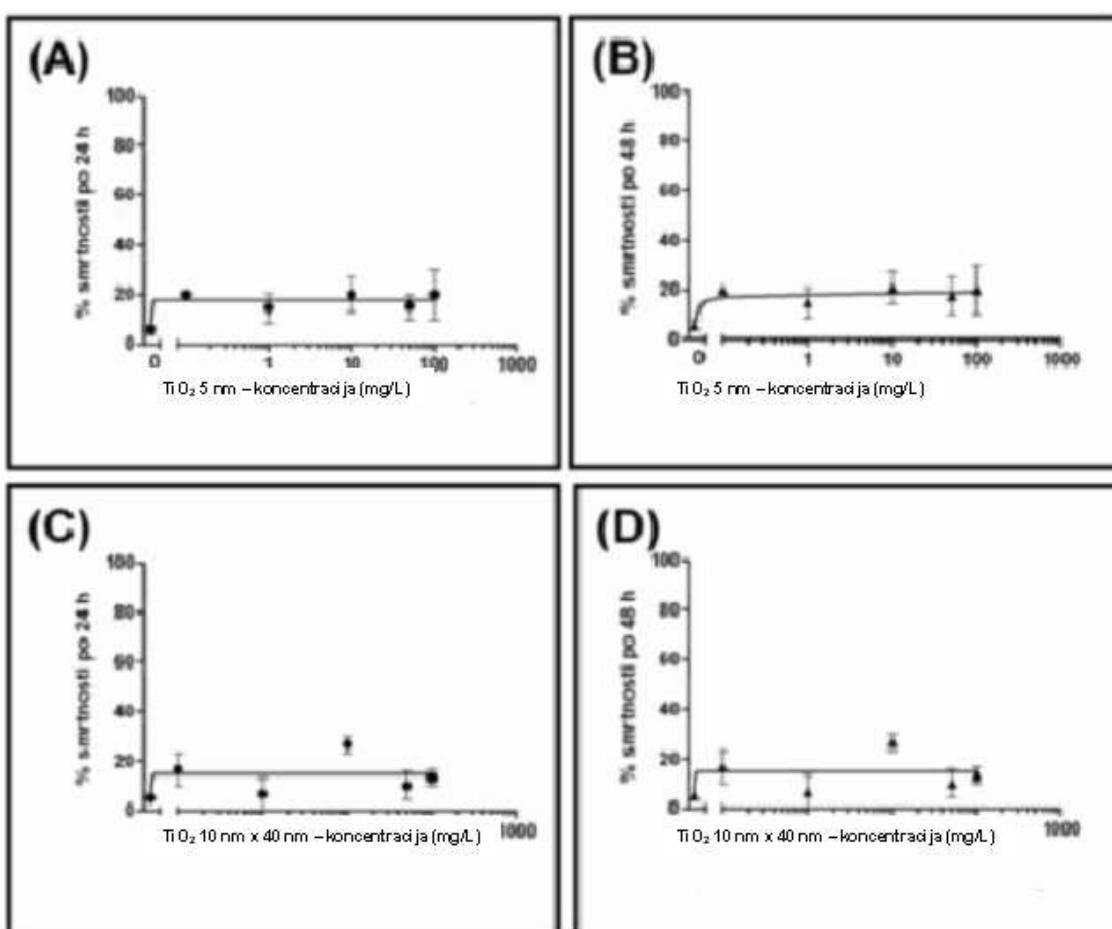
#### 4.2.5 Subletalni učinki po 24 in 48 h

Med mikroskopiranjem izpostavljenih zarodkov cebric smo nekajkrat opazili razvoj edema (Slika 17D), ki je pomemben subletalni učinek. Nakopičenje tekočine v tkivu v medceličnem prostoru smo tako opazili le trikrat po 48 h razvoja – enkrat v kontroli, enkrat pri izpostavitvi zarodkov malim in enkrat velikim nanodelcem  $\text{TiO}_2$ . Zaključimo lahko, da se subletalni učinki ne pojavljajo statistično značilno. Razlog pojava edemov pa lahko pripišemo naključju, saj se edem pojavlja tudi v naravi, pri zarodkih, ki niso bili izpostavljeni toksičnim snovem.



#### 4.2.6 Prilegajoče krivulje smrtnosti izpostavljenih zarodkov

Prilegajoče krivulje smrtnosti zarodkov (Slika 22), ki so bili izpostavljeni suspenzijam nanodelcev  $\text{TiO}_2$ , nam razkrivajo, da izbrani nanodelci ne povzročajo od odmerka odvisne smrtnosti zarodkov rib cebric. Čeprav razlike niso statistično značilne (Slika 22), lahko opazimo, da vse od najnižje do najvišje testirane koncentracije suspenzije nanodelcev  $\text{TiO}_2$  (0.1 mg/L) povzročijo smrtnost, višjo od kontrole. Pražne vrednosti na naših krivuljah ni mogoče določiti. Tako lahko že nizka koncentracija nanodelcev  $\text{TiO}_2$  v vodi povzroči nekoliko povečano smrtnosti rib in potencialno drugih izpostavljenih vrst v naravi. Žal zaradi težav z usedanjem delcev na ovojnice zarodkov nismo uspeli testirati višjih koncentracij in zaradi tega ne moremo vedeti, kaj se tako zgodi pri koncentracijah, višjih od 100 mg/L. Vrednosti  $\text{LC}_{50}$  ni bilo mogoče določiti, saj nobena od izbranih koncentracij ni povzročila letalnih znakov pri 50 % izpostavljenih zarodkov rib cebric.



**Slika 22:** Krivulje smrtnosti zarodkov v odvisnosti od izpostavitve: (A) malim delcem po 24 h, (B) malim delcem po 48 h, (C) velikim delcem po 24 h, (D) velikim delcem po 48 h. Na grafih so prikazane srednje vrednosti s standardno napako.

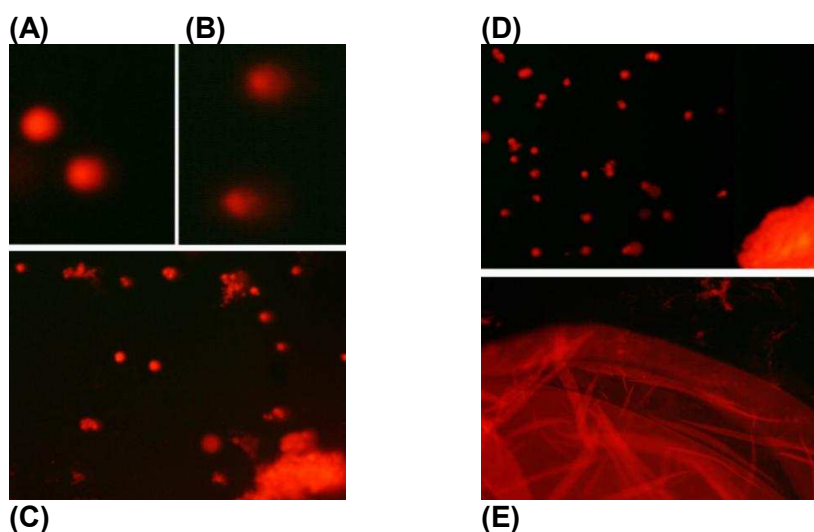
### 4.3 Rezultati testa komet

Zarodke, uporabljene v testu komet, smo najprej za 24 h izpostavili vodni suspenziji malih in velikih nanodelcev TiO<sub>2</sub> izbranih koncentracij: 0.001, 0.01, 0.1, 1 in 10 mg/L, kot je opisano v postopku za izvedbo FET (na str. 15 in 16). Na teh zarodkih smo nato izvedli test komet, kot je opisano v postopku za izvedbo testa komet (na str. 18 in 19).

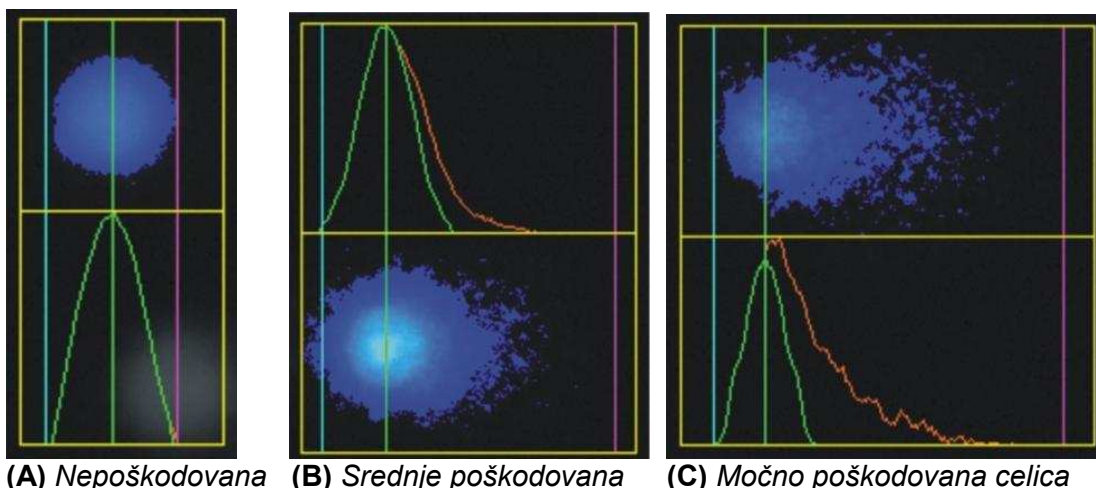
#### 4.3.1 Mikroskopski pregled preparatov

Pri pregledovanju mikroskopskih preparatov smo opazovali celice, ki so bile od ostankov zarodkov primerno oddaljene (Slika 23).

Med opazovanjem celic kontrole (izpostavljene ISO-vodi) ter negativne kontrole (NaCl) je bila DNA, kot je bilo pričakovano, večinoma nepoškodovana (Slika 24A). Pri mikroskopskem pregledu preparatov izbranih testnih koncentracij nanodelcev TiO<sub>2</sub> pa smo pogosto opazili celice s poškodovano DNA (Slika 24B). Pri višjih koncentracijah testne suspenzije je bilo opaziti tudi močno poškodovano DNA celic (Slika 24C), podobno kot pri testiranju MMS in BaP, kjer je bilo to pričakovano.



**Slika 23:** Fotografije celic, posnete s fluorescentnim mikroskopom: (A) nepoškodovane, (B) rahlo poškodovane, (C) in (D) posamezne celice, ki niso v stiku z ostankom zarodka v desnem spodnjem kotu, (E) ovojnica zarodka.



**Slika 24:** Fotografije celic, posnete s fluorescentnim mikroskopom v programu Comet Assay IV: (A) nepoškodovana celica, (B) srednje poškodovana celica, (C) bolj poškodovana celica (komet).

#### 4.3.2 Primerjava poškodovanosti DNA

Primerjava median, izražene kot vrednosti odstotka intenzivnosti DNA v repu, kažejo močan genotoksični vpliv nanodelcev  $\text{TiO}_2$  na celice zarodkov rib cebric (Slika 25). Variabilnosti med posameznimi poskusi so prikazane na Sliki 26.

Po pričakovanjih ni statistično značilnih razlik med kontrolo (ISO-vodo) in NaCl, saj NaCl predstavlja negativno kontrolo in ne povzroča poškodb DNA. Drugače je z BaP (pozitivna kontrola posredno delujočih genotoksinov) in MMS (pozitivna kontrola neposredno delujočih genotoksinov), ki pričakovano kažeta veliko statistično značilno povečano poškodovanost DNA (Slika 25A). S tem smo potrdili ustrezno delovanje testa.

Zanimivo je, da nam primerjava med kontrolo in izbranimi koncentracijami malih nanodelcev  $\text{TiO}_2$  (Slika 25B) kaže statistično značilne razlike za vse izbrane koncentracije, razen za najnižjo koncentracijo 0.001mg/L. Pri primerjavi vseh posameznih testnih koncentracij lahko opazimo velike razlike v porazdelitvi varianc. Izjema je primerjava med koncentracijama 0.1 mg/L in 1 mg/L, ki ne kaže statistično značilne razlike. Pri koncentraciji 10 mg/L se obseg poškodb DNA statistično ne razlikuje od obsega poškodb, ki jih je povzročila modelna genotoksična kemikalija MMS.

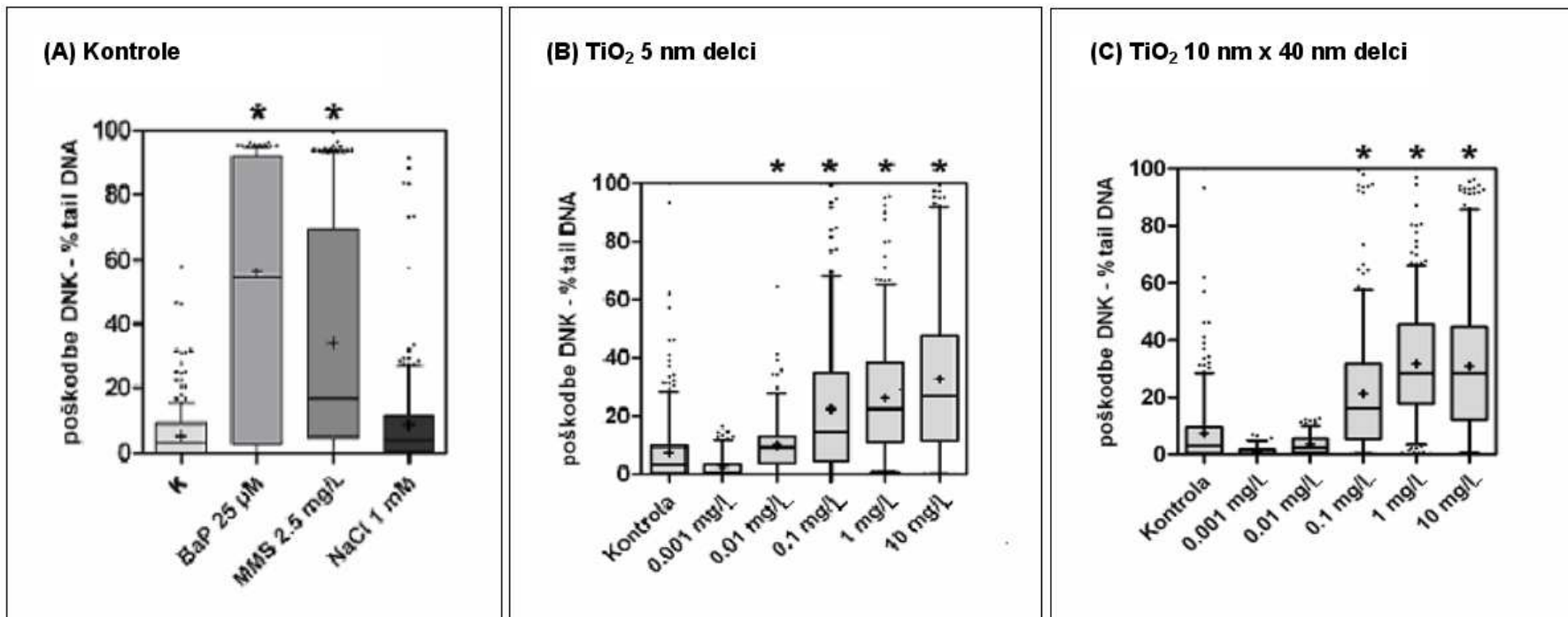
Primerjava poškodovanosti DNA med kontrolo in izbranimi testnimi koncentracijami velikih nanodelcev  $\text{TiO}_2$  (Slika 25C) nam kaže, da so razlike statistično značilne za tri najvišje izbrane koncentracije (0.1, 1 in 10 mg/L). Pri velikih delcih se statistično neznačilna razlika med suspenzijo nanodelcev  $\text{TiO}_2$  in MMS pokaže pri nižji koncentraciji kot pri malih delcih, to je že pri 1 mg/L.

Zanimivo je, da so poškodbe DNA izpostavljenih zarodkov cebric pri uporabi velikih nanodelcev  $\text{TiO}_2$  primerljive z učinki MMS že pri 10-krat nižji koncentraciji kot pri uporabi malih nanodelcev, medtem ko je najnižja koncentracija velikih nanodelcev, pri kateri je bilo opaženo statistično značilno povečanje poškodb DNA v primerjavi s kontrolo (torej LOEC), 10-krat višja kot pri uporabi malih nanodelcev. To pomeni, da je interval, katerega krajišči predstavljata vrednosti LOEC, ter najnižja koncentracija, pri kateri je učinek nanodelcev že primerljiv z učinkom MMS, na prilegajoči krivulji

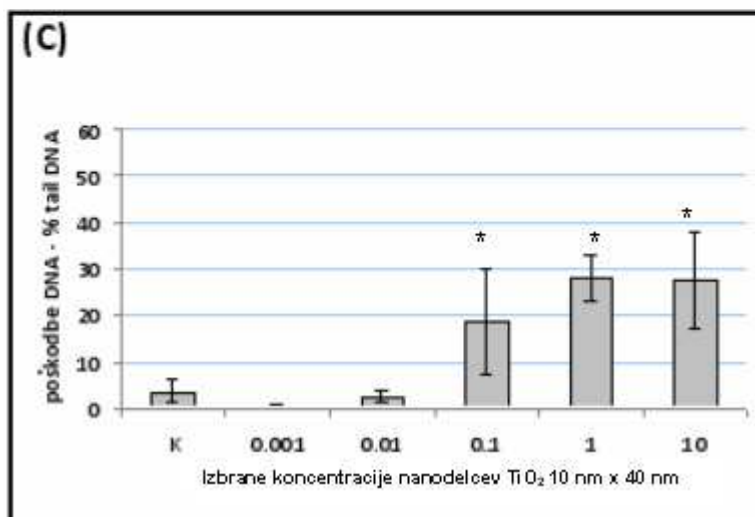
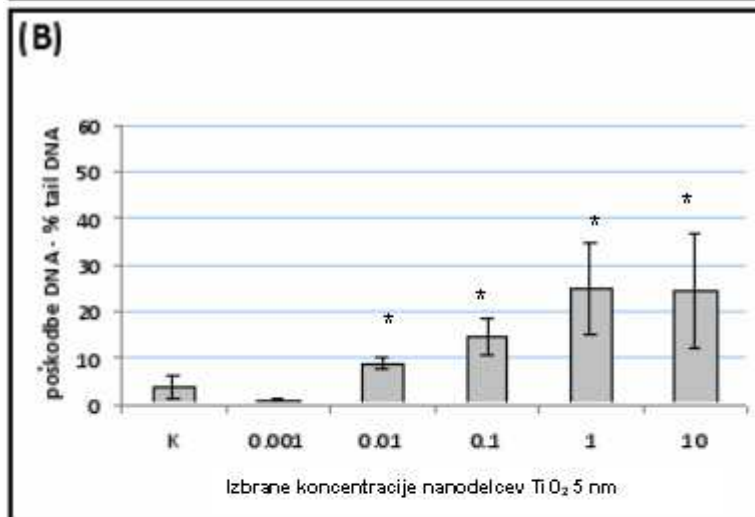
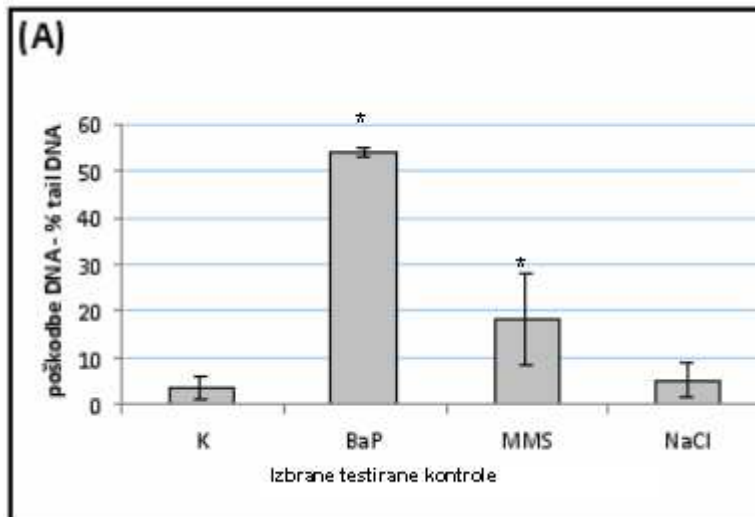
smrtnosti zarodkov, izpostavljenih velikim nanodelcem  $\text{TiO}_2$ , krajši od intervala na prilegajoči krivulji smrtnosti zarodkov, izpostavljenih malim nanodelcem  $\text{TiO}_2$ .

Iz rezultatov primerjave poškodovanosti DNA med testnimi suspenzijami nanodelcev  $\text{TiO}_2$  in MMS lahko sklepamo, da je aktivnost nanodelcev  $\text{TiO}_2$  primerljiva z aktivnostjo MMS.

Koncentracija, pri kateri se poškodbe DNA ne razlikujejo od kontrole, torej ni opaznih genotoksičnih učinkov (NOEC), znaša v primeru malih nanodelcev 0.001 mg/L, v primeru velikih nanodelcev pa 0.01 mg/L. Na podlagi podatkov, pridobljenih s testom komet, je tako najnižja uporabljena koncentracija, pri kateri je opazen genotoksičen učinek (torej LOEC) za male delce 0.01 mg/L, za velike pa 0.1 mg/L.



**Slika 25:** Primerjava kometov med: (A) posameznimi kontrolami (ISO- voda, BaP, MMS in NaCl), (B) izbranimi koncentracijami malih nanodelcev TiO<sub>2</sub>, (C) izbranimi koncentracijami velikih nanodelcev TiO<sub>2</sub>. Statistično značilne razlike (ANOVA) med poškodbami DNA, izolirane iz celic kontrolnih ( ISO- voda) in tretiranih zarodkov cebric, so označene z \*.



**Slika 26:** Variabilnost med posameznimi poskusi (mediane  $\pm$  SD): (A) med izbranimi kontrolami, (B) med izbranimi koncentracijami malih nanodelcev in (C) med izbranimi koncentracijami velikih nanodelcev. \* predstavlja statistično značilno ( $P < 0.05$ ) razliko med kontrolnimi in tretiranimi zarodki ( $n=6$ ).

#### 4.4 Povezovanje rezultatov FET in testa komet

S FET smo ob testiranju nanodelcev  $\text{TiO}_2$  obeh izbranih velikosti zabeležili dokaj nizko smrtnost izpostavljenih zarodkov. Nato pa smo z analizo rezultatov testa komet ugotovili, da povzročajo nanodelci  $\text{TiO}_2$  pri koncentracijah, ki so nižje od teh, uporabljenih v FET, zelo velike poškodbe celic DNA. To pomeni, da imajo tako mali kot veliki nanodelci  $\text{TiO}_2$  negativen učinek na zarodke oz. njihovo DNA že pri koncentracijah, kjer letalni, subletalni in teratogeni učinki sploh še niso statistično značilno povečani.

Čeprav so bili učinki dobro vidni na nivoju DNA, smo jih lahko »zaslutili« tudi v FET na nivoju delovanja osnovnih življenjskih procesov, kot je hitrosti krvnega obtoka. Število srčnih utripov na min se je namreč v primeru povečanja koncentracije vseh testiranih nanodelcev  $\text{TiO}_2$  v primerjavi s kontrolo rahlo znižalo. Znano je, da lahko nekateri toksini upočasnijo respiracijo in s tem krvni obtok izpostavljenega organizma (bodisi z neposrednim oviranjem ali posredno s povečanjem stresa in večjo porabo kisika kot vira energije za boj proti stresorju), kar lahko vpliva na njegov nadaljnji razvoj.

Dejstvo, da nam rezultati FET ne kažejo, da bi nanodelci  $\text{TiO}_2$  imeli koncentracijsko odvisen značaj in bi krivulje opisovale tipično matematično odvisnost (npr. linearno ali sigmoidno, kjer se odziv organizma povečuje z naraščanjem koncentracije testne snovi), je lahko povezano z lastnostjo agregacije nanodelcev v vodnem okolju. Znano je, da nanodelci v vodnih raztopinah agregirajo v skupke, agregate, ki so kot celota tako veliki, da ne morejo prodreti skozi membrane celic in povzročiti poškodb na in v celicah. Vendar pa imajo nanodelci tudi to lastnost, da se lahko na robu agregata vsak čas odcepijo od celote in prosto potujejo do celic, v celice in v njih povzročijo različne negativne učinke, med katerimi so tudi poškodbe DNA.

Morda bi lahko tako na podlagi krivulje smrtnosti sklepali na škodljivo delovanje nanodelcev  $\text{TiO}_2$ . Ena izmed možnosti bi bila, da imajo nanodelci  $\text{TiO}_2$  neko maksimalno prazno vrednost in lahko prehajajo skozi membrane le v okviru določene koncentracije, nakar se njihovo prehajanje ustavi. Med obdelavo rezultatov namreč ni bilo mogoče opaziti koncentracijske odvisnega značaja, ki je značilen za večino znanih testiranih (nevarnih) kemikalij. Razlog za to bi se lahko skrival v njihovih lastnostih, saj je dobro znano, da imajo nanodelci drugačne fizikalne lastnosti od istih delcev večjih velikosti.

Agregacija nanodelcev bi bila lahko tisti faktor, ki določa intenzivnost in obseg prehajanja nanodelcev  $\text{TiO}_2$  skozi biološko membrano. Dejstvo namreč ostaja, da nanodelci v raztopinah agregirajo v večje delce v odvisnosti od količine raztopljenih kationov in anionov v raztopini, v kateri se nahajajo. V naši raziskavi smo ugotovili, da se je velikost delcev močno razlikovala od deklarirane ter da so bili delci pretežno v obliki agregatov, ki so bili v povprečju večji od  $1 \mu\text{m}$ . Ker se z agregacijo lastnosti nanodelcev začasno spremenijo, niso več sposobni (kot celota, agregat) prodirati skozi membrane celic, kar pa ne velja za nanodelce na obrobju agregata. Ker pa sta količina in intenzivnost agregiranja kot tudi disociacija nanodelcev močno odvisni od količine in vrste razpoložljivih ionov v raztopini, je proces odcepitve posameznih nanodelcev od agregatov zelo spremenljiv in kompleksen. Morda se odsotnost koncentracijske odvisnega odziva skriva prav v pojavu agregacije delcev. Rezultati testiranja dveh različnih kristalnih oblik – anataznih in rutilnih nanodelcev  $\text{TiO}_2$  so se med seboj nekoliko razlikovali, vendar razlike niso velike.

Po drugi strani pa smo opazili jasen, od doze odvisen, odziv na ravni poškodb DNA, in sicer pri koncentracijah nanodelcev  $\text{TiO}_2$ , ki so bile mnogo nižje od koncentracij, uporabljenih pri ugotavljanju letalne in subletalne toksičnosti. To kaže, da, ne glede na agregiranost pri nižjih koncentracijah, delci prehajajo v celico v odvisnosti od doze. Nekatere raziskave so pokazale, da v *in vitro* pogojih nanodelci  $\text{TiO}_2$  povzročajo v celicah oksidativni stres (Gurr in sod., 2005). Možno je, da so v naši raziskavi ugotovljene poškodbe DNA posledica delovanja pri oksidativnem stresu nastalih prostih reaktivnih kisikovih zvrsti, kar pa bo treba potrditi z nadaljnjimi raziskavami.



## 5 ZAKLJUČKI

Pri študiji v okviru tega diplomskega dela smo ugotavljali toksičnost in genotoksičnost nanodelcev  $\text{TiO}_2$  dveh različnih kristalnih oblik (anatasa in rutila) z različno velikostjo delcev (5 nm in 10 nm x 40 nm) s testnim sistemom z zarodki rib cebric.

Z vrstičnim elektromskim mikroskopom ter z analizo porazdelitve velikosti nanodelcev smo ugotovili, da so delci, ki smo jih uporabili v tej raziskavi, večji kot deklarirani proizvajalec ter da so v suspenziji, pripravljani v ISO-vodi, pretežno agregirani.

FET, ki smo ga uporabili za ugotavljanje akutne toksičnosti, je pokazal nekoliko povečano, vendar statistično neznačilno, smrtnost zarodkov, izpostavljenih nanodelcem  $\text{TiO}_2$ , večjim od 0,1 mg/L. Odziv ni bil odvisen niti od doze niti od velikosti oz. kristalne oblike nanodelcev. Opazili smo tudi rahlo statistično neznačilno znižanje hitrosti srčnega utripa v primerjavi s kontrolo. Subletalnih in teratogenih učinkov nismo opazili.

Test komet je pokazal, da obe uporabljeni kristalni obliki nanodelcev  $\text{TiO}_2$  povzročata poškodbe DNA pri razmeroma nizkih koncentracijah (10  $\mu\text{g/L}$  za majhne delce velikosti 5 nm oz. 100  $\mu\text{g/L}$  za velike delce velikosti 10 nm x 40 nm). Njihovi učinki na DNA so bili primerljivi celo z učinkom znane genotoksične kemikalije metil metan sulfata.

Kljub temu, da pri FET nismo opazili signifikantnih učinkov, je test genotoksičnosti pokazal precejšnje poškodbe DNA pri koncentracijah, kjer letalnih, subletalnih in teratogenih učinkov še ni bilo mogoče zaznati.

Na osnovi rezultatov testa komet smo za majhne delce določili vrednosti NOEC 0.001 mg/L in LOEC 0.01 mg/L, za velike pa NOEC 0.01 mg/L in LOEC 0.1 mg/L.

Na podlagi rezultatov tega diplomskega dela sklepamo, da so testirani anatasa in rutilni nanodelci  $\text{TiO}_2$  obeh velikosti zelo genotoksični v testnem sistemu z zarodki rib cebric. Pri tem moramo upoštevati, da so bili testirani delci v resnici veliko večji od deklarirane velikosti. Bili so tudi agregirani, kar pa ne vpliva na relevantnost rezultatov, saj agregacija delcev v laboratorijskih pogojih posnema dogajanje v naravi. Opazili smo obsežne poškodbe dednega materiala zarodkov, vendar moramo upoštevati, da imajo zarodki rib izjemno sposobnost popravljanja poškodb DNA. Zaradi tega se lahko poškodbe, ki smo jih zaznali z testom komet, tekom nadaljnjega razvoja popravijo, kar lahko ugotovimo le z dodatnimi dolgotrajnejšimi testi.

Naše ugotovitve nakazujejo, da nanodelci  $\text{TiO}_2$  obeh velikosti in oblik predstavljajo potencialno genotoksično nevarnost za organizme v vodnem okolju. Vendar pa bodo za morebitno klasifikacijo nanodelcev  $\text{TiO}_2$  med genotoksične dejavnike potrebne še številne raziskave, med njimi tudi raziskave kronične izpostavljenosti.

## 6 VIRI

- Adams L.K., Lyon D.Y., Alvarez P.: Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> and ZnO water suspensions, *Water Research* 40 (2006), 3527-3532
- Albertini R.J., Anderson D., Douglas G.R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A.T., Norppa H., Shuker D.E., Tice R., Waters M.D., Aitio A.: IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, *Mutation Research* 463:2 (2000), 111-172
- Avishai N., Rabinowitz C., Moiseeva E., Rinkevich B.: Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an in vitro cellular assay, *Elsevier Science* 518:1 (2002), 21-37
- Baan R., Straif K., Grosse Y., Secretan B., El Ghissassi F., Coglianò V.: Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc, *The Lancet Oncology* 7:4 (2006), 295-296
- Braunbeck T., Lammer E.: Background Document on Fish Embryo Toxicity Test, OECD 2006, <http://www.oecd.org/dataoecd/39/62/36817242.pdf> (29.8.2008)
- Brigger I., Dubernet C., Couvreur P.: Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54 (2002), 631-651
- Buzea C., Pacheco I., Robbie K.: Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity, *Biointerphases* 2:4 (2007), 17-71
- Chen Y., Chen H., Wu Y., Li Z., Sun L., Qu M., Kong Z.: Toxicity evaluation of Meiliang Bay, Lake Taihu, China - a drinking water source, *Hydrobiologia* 581 (2007), 297-303
- Chen M., von Mikecz A.: Formation of nucleoplasmic protein aggregates impairs nuclear function in response to SiO<sub>2</sub> nanoparticles, *Experimental Cell Research* 305:1 (2005), 51-62
- Collins A.R., Dobson V.L., Dusinská M., Kennedy G., Stětina R.: The comet assay: what can it really tell us?, *Elsevier Science B.V.* (2007)
- Diekmann M., Waldmann P., Schnurstein A., Grummt T., Braunbeck T., Nagel R.: On the relevance of genotoxicity for fish populations II: genotoxic effects in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to 4-nitroquinoline-1-oxide in a complete life-cycle test, *Aquatic toxicology* 68:1 (2004), 27-37
- Direktiva REACH (396, 30/12/2006), <http://www.uradni-list.si/1/content?id=88354> (15.10.2008)
- Direktiva o zaščiti poskusnih živali v znanstvene namene (86/609/EEC), <http://vestnik.szd.si/st6-11/719-725.pdf> (15.10.2008)
- Donaldson K., Beswick P., Gilmour P.: Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? *Toxicology Letters* 88:1-3 (1996), 293-298
- Federici G., Shaw B.J., Handy R.D.: Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects, *Aquatic Toxicology* 84 (2007) 415-430
- Garnett M., Kallinteri P.: Nanomedicines and nanotoxicology: some physiological principles, *Occupational Medicine* 56:5 (2006), 307-311
- Griffitt R.J., Luo J., Gao J., Bonzongo J.C., Barber D.S.: Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms, *Environmental Toxicology and Chemistry* 27:9 (2008), 1972-1978

- Gurr J.R., Wang A., Chen C.H., Jan K.Y.: Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells, *Toxicology* 213 (2005) 66-73
- Gutjahr A. 2007: Akvarijske ribe, Mladinska knjiga: 38
- Hagens W., Oomen A., de Jong W., Cassee F., Sips A.: What do we (need to) know about the kinetic properties of nanoparticles in the body? *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 49:3 (2007), 217-229
- Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., Tice R.R.: Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay, *Mutagenesis* 18:1 (2003)
- Heath D., Vasić V.: Nanotechnology – opportunity for the domestic appliance industry, *strokovni prispevek*, 13: 4 (2004), 9 str., [http://www.gorenjegroup.com/si/filelib/gorenje\\_group/corporate/professional\\_contributions/gib0404\\_nanotehnologija1.pdf](http://www.gorenjegroup.com/si/filelib/gorenje_group/corporate/professional_contributions/gib0404_nanotehnologija1.pdf) (22.9.2008)
- Hill A, Teraoka H, Heideman W, Peterson R: Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity, *Toxicological Sciences* 86:1 (2005), 6-19
- ISO standard: ISO 7346-3:1998: Water quality. Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish
- Jarvis R.B., Knowles J.F.: DNA damage in zebrafish larvae induced by exposure to low-dose rate-radiation: detection by the alkaline comet assay, *Mutation Research* 541 (2003), 63-69
- Joner E.J., Hartnik T., Amundsen C.E.: Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles, Norwegian Pollution Control Authority (TA 2304/2007), 66 str., <http://www.sft.no/publikasjoner/2304/ta2304.pdf> (22.9.2008)
- Kahru A., Dubourguier H.C., Blinova I., Ivask A., Kasemets K.: Biotests and Biosensors for Ecotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles: A Minireview, *Sensors* 8:8 (2008), 5153-5170
- Kimmel C.B., Ballard W., Kimmel S.R., Ullmann B., Schilling T.F.: Stages of embryonic development of the zebrafish, *American Journal of Anatomy*, 203:3 (1994), 253-310
- Klaine S.J., Alvarez P.J., Batley G.E., Fernandex T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin M.J., Lead J.R.: Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects, *Environmental Toxicology and Chemistry* 27:9 (2008), 1825-1851
- Kosmehl T., Hallare A.V., Reifferscheid G., Manz W., Braunbeck T., Hollert H.: A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos, *Environmental toxicology and chemistry* 25:8 (2006), 2097-2106
- Lange M., Gebauer W., Markl J., Nagel R.: Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio* and RTG-2 cytotoxicity as possible alternatives to the acute fish test, *Chemosphere* 30:11 (1995), 2087-2102
- Long T., Saleh N., Tilton R., Lowry G., Veronesi B.: Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): Implications for nanoparticle neurotoxicity, *Environmental Science and Technology* 40:14 (2006), 4346-4352
- Lovell D.P., Omori T.: Statistical issues in the use of the comet assay, *Mutagenesis* 23:3 (2008), 171-182
- Lubick N.: Risks of nanotechnology remain uncertain, Despite an onslaught of research, scientists cannot say which nanomaterials are hazardous to the environment or human health, *Environmental Science and Technology* 42 :6 (2008), 1821-1824,

- [http://www.organicconsumers.org/articles/article\\_10517.cfm](http://www.organicconsumers.org/articles/article_10517.cfm) (22.9.2008)
- McKelvey-Martin V.J., Edwin T.S., McKeown S.R., Johnston S.R., McCarthy P.J., Rajab N.F., Downes C.: Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells, *Mutagenesis* 13:1 (1998), 1-8
  - McKelvey-Martin V.J., Green M.H., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Méo M.P., Collins A.: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review, *Mutation Research* 288:1 (2003), 47-63, [www.sigmaaldrich.com/life-science.html](http://www.sigmaaldrich.com/life-science.html) (19.8.2008)
  - Miller G., Senjen R.: Out of the laboratory and on to our plates: Nanotechnology in food and agriculture, (2008), <http://nano.foe.org.au/node/219> (18.9.2008)
  - Moore M.N.: Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?, *Environment International* 32 (2006), 967-976
  - Nagel R.: The embryo test with the zebra fish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology, *Altex - Alternativen Zu Tierexperimenten* 19 (2002), 38-48
  - Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang H.: Principles for characterising the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy, *Particle and Fibre Toxicology* 2:8 (2005a)
  - Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J.: Nanotoxicology: an emerging discipline from studies of ultrafine particles, *Environmental Health Perspectives* 113:7 (2005b), 823-839
  - OECD Guideline for the testing of chemicals, Draft proposal for a new guideline - Fish Embryo Toxicity (FET) Test, Draft Guideline (2006), <http://www.oecd.org/dataoecd/39/59/36817070.pdf> (18.9.2008)
  - Reeves J.F., Davies S.J., Dodd N., Jha A.: Hydroxyl radicals ( $\bullet\text{OH}$ ) are associated with titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells, *Mutation Research* 640 (2008), 113-122
  - Rojas E., Lopez M.C., Valverde M.: Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 722:1-2 (1999), 225-54
  - Sayes C., Wahi R., Kurian P., Liu Y., West J., Ausman K., Warheit D., Colvin V.: Correlating nanoscale titania structure with toxicity: A cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells, *Toxicological Sciences* 92:1 (2006), 174-185
  - Scholz S., Fischer S., Gündel U., Küster E., Luckenbach T., Voelker D.: The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - applications beyond acute toxicity testing, *Environmental Science and Pollution Research* 15:5 (2008), 394-404
  - Schulte C., Nagel R.: Testing acute toxicity in the embryo of zebra fish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test – preliminary - results, *Alta - Alternatives to Laboratory Animals* 22 (1994) 12-19
  - Shaposhnikov S.A., Salenko V.B., Brunborg G., Nygren J., Collins A.R.: Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): Loops or fragments?, *Electrophoresis* 29:14 (2008), 3005-3012

- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental Cell Research* 175:1 (1988), 184-191
- Spitsbergen J., Kent M.L.: The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research - Advantages and Current Limitations, *Toxicologic Pathology* 31 (2003), 62-87
- Suttner R.: Cebrice : priljubljene akvarijske ribe z vzhodnega dela Prednje Indije, *Tetra magazin*. 1, 1996, str. 20-22
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C., Sasaki Y.F.: Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing , *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35:3 (2000), 206-21
- Valiyaveetil S.: Problematic new findings regarding toxicity of silver nanoparticles, *Nanowerk Spotlight*, June 6, 2008, [http://www.nusnni.nus.edu.sg/researchhighlights\\_files/nanowerk-article060608.pdf](http://www.nusnni.nus.edu.sg/researchhighlights_files/nanowerk-article060608.pdf) (18.9.2008)
- Wang J., Zhou G., Chen C., Yu H., Wang T., Ma Y., Jia G., Gai Y., Li B., Sun J., Li Y., Jiao F., Zhano Y., Chai Z.: Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration, *Toxicology Letters* 168:2 (2007a), 176-185
- Wang J.J., Sanderson B.J., Wang H.: Cyto- and genotoxicity of ultrafine TiO<sub>2</sub> particles in cultured human lymphoblastoid cells, *Mutation Research* 628:2 (2007b), 99-106
- Warheit D.V., Webb T.R., Reeda K., Frerichs S., Sayes C.: Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO<sub>2</sub> particles: Differential responses related to surface properties, *Toxicology* 230 (2007) 90-104
- Westerfield M. 2000: *The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of zebrafish Danio (Brachydanio) rerio*, 4th Edition, [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/zfbk.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html) (28.8.2008)
- Wiklund S.J., Agurell E: Aspects of design and statistical analysis in the Comet assay, *Mutagenesis* 18:2 (2003), 167-175
- Wilson M., Kannangara K., Smith G., Simmons M., Raguse B. 2002: *Nanotechnology: basic science and emerging technologies*. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC. 271 str.
- ZFIN: Zebrafish Information Network [www.zfin.org](http://www.zfin.org) (28.8.2008)
- Zhu X., Zhu L., Duan Y., Qi R., Li Y., Lang Y.: Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage, *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 :9 (2008), 1825-1851