

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.707>  
<https://orcid.org/0009-0007-4739-2012>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Milda Babonaitė

# Nanodalelių genotoksinio poveikio ir jų patekimo į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles įvertinimas

**DAKTARO DISERTACIJA**

Gamtos mokslai,  
Biologija (N 010)

VILNIUS 2024

Disertacija rengta 2019–2023 metais, Vilniaus universitete, Gyvybės mokslų centre, Biomokslų institute, Genetikos ir Botanikos katedroje.

**Mokslinis vadovas** – prof. habil. dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010)

Gynimo taryba:

**Pirmininkas** – doc. dr. Raimondas Šiukšta (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010).

**Nariai:**

doc. dr. Tatjana Čėsniienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010)

dr. Naouale El Yamani (Norvegijos oro tyrimų institutas, Norvegija, gamtos mokslai, biologija – N 010),

prof. dr. Eglė Lastauskienė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biologija – N 010),

dr. Milda Stankevičiūtė (Gamtos tyrimų centras, gamtos mokslai, biologija – N 010),

Disertacija ginama viešame Gynimo tarybos posėdyje 2024 m. gruodžio mėn. 17 d. 10 val., Gyvybės mokslų centre, R403 auditorijoje. Adresas: Saulėtekio al. 7, Vilnius, Lietuva. Disertacija bus ginama anglų kalba.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto bibliotekoje ir VU interneto svetainėje adresu:

<https://www.vu.lt/naujienos/ivykiu-kalendorius>

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.707>

<https://orcid.org/0009-0007-4739-2012>

VILNIUS UNIVERSITY

Milda Babonaitė

# Assessment of Nanoparticle Genotoxicity and its Cellular Uptake by Human Peripheral Blood Mononuclear Cells

**DOCTORAL DISSERTATION**

Natural Sciences,  
Biology (N 010)

VILNIUS 2024

The dissertation was prepared between 2019 and 2023 at Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of biosciences.

**Academic Supervisor –**

Prof. Habil. Dr. Juozas Rimantas Lazutka (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010)

This doctoral dissertation will be defended in a public meeting of the Dissertation Defence Panel:

**Chairman** – Assoc. Prof. Dr. Raimondas Šiukšta (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010).

**Members:**

Assoc. Prof. Dr. Tatjana Čėsniėnė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010),

Dr. Naouale El Yamani (The Norwegian Institute for Air Research, Norway, Natural Sciences, Biology – N 010),

Prof. dr. Eglė Lastauskienė (Vilnius University, Natural Sciences, Biology – N 010),

Dr. Milda Stankevičiūtė (Nature Science center, Natural Sciences, Biology – N 010).

The dissertation shall be defended at a public meeting of the Dissertation Defence Panel at 10 h on 17<sup>th</sup> December 2024 in auditorium R403 of the Life Sciences Center. Address: Saulėtekio av., 7, Vilnius, Lithuania.

The text of this dissertation can be accessed at the libraries of Vilnius University, as well as on the website of Vilnius University:

[www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius)



## TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS .....	7
ĮVADAS.....	8
MOKSLINIS DARBO NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ.....	10
GINAMIEJI TEIGINIAI.....	11
1.LITERATŪROS APŽVALGA.....	12
1.1. Nanodalelių rūšys ir šaltiniai .....	12
1.2. Nanodalelių panaudojimas.....	12
1.3. Nanodalelių patekimas į žmogaus organizmą .....	13
1.3.1 Nanodalelių patekimas per kvėpavimo takus.....	14
1.3.2 Nanodalelių patekimas per odą .....	15
1.3.3 Nanodalelių patekimas per virškinimo sistemą.....	16
1.4. Viduląstelinio nanodalelių įsisavinimo mechanizmai .....	17
1.4.1.Nanodalelių savybės, turinčios įtakos jų viduląsteliniam įsisavinimui.....	20
1.5. Nanodalelių genotoksiškumas ir jo mechanizmai .....	24
1.5.1 Pirminis tiesioginis genotoksiškumo indukcijos mechanizmas .....	24
1.5.2 Pirminis netiesioginis genotoksiškumo indukcijos mechanizmas .....	24
1.5.3 Antrinis genotoksiškumo indukcijos mechanizmas.....	25
1.6 Nanodalelių sukulto genotoksiškumo vertinimas.....	25
1.6.1 Nanodalelių sukulto genotoksiškumo tyrimų rekomendacijos .....	28
2.MEDŽIAGOS IR METODAI.....	31
2.1. Tirpalai ir buferiai.....	31
2.2 Tyrimo objektas .....	32
2.3 Kraujo donorai .....	34
2.4 Darbo metodai.....	35
2.4.1 Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių išskyrimas.....	35
2.4.2 Ląstelių optinio tankio skaičiavimas.....	36
2.4.3 Nanodalelių charakterizavimas .....	36
2.4.4 Nanodalelių patekimo į ląstelę analizė.....	37
2.4.5 Reaktyviųjų deguonies formų generavimo analizė .....	38
2.4.6 Šarminis Kometų testas.....	39
2.4.7 Mikrobranduolių testas.....	45
2.4.8 Sėsnerinių chromatidžių mainų testas.....	48

2.4.9. Statistinė analizė.....	53
3.REZULTATAI.....	54
3.1 Nanodalelių charakterizavimas ląstelių mitybinėje terpėje.....	54
3.2 Nanodalelių patekimo į ląstelę analizė.....	64
3.3 ROS formavimosi analizė .....	70
3.4 Nanodalelių genotoksiškumo tyrimai .....	76
3.4.1 Kobalto oksido nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai .....	77
3.4.2 Sidabro nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai .....	85
3.4.2 Aukso nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai .....	87
3.4.3 Aliuminio oksido nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai .....	91
3.4.4 Silicio dioksido nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai .....	96
3.4.5 Polistireno nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai ...	99
4. REZULTATŲ APTARIMAS .....	102
IŠVADOS .....	114
LITERATŪROS SĄRAŠAS .....	115
SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION.....	132
INTRODUCTION.....	133
SCIENTIFIC NOVELTY .....	135
STATEMENTS TO BE DEFENDED .....	136
MATERIALS AND METHODS.....	137
RESULTS .....	146
DISCUSSION .....	158
CONCLUSIONS.....	170
PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS / LIST OF PUBLICATIONS .....	171
TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĘ .....	173
CURRICULUM VITAE .....	174
PADĖKA.....	175
PRIEDAI.....	176

## SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

%TDNA – (angl. *%tail DNA*) – DNR kiekis (%) kometos uodegoje  
AO – akridino oranžas  
BDI – branduolio dalijimosi indeksas  
BrdU – 5-bromo-2'-deoksiuridinas  
CBPI – (angl. *cytokinesis-blocked proliferation index*) – sustabdytos citokinezės proliferacijos indeksas  
cytB – citochalazinas B  
diH<sub>2</sub>O – dejonizuotas vanduo  
DMSO – dimetilsulfoksidas  
EB – etidžio bromidas  
FHA – fitohemagliutinas  
FISH- (angl. *fluorescent in situ hybridization*) – fluorescencinė *in situ* hibridizacija  
FSC – (angl. *forward scatter*) – priekinė išsklaidyta šviesa  
H<sub>2</sub>DCFDA – 2'7'-dichlorodihidrofluoresceino diecetas  
ID – Identifikacijos numeris  
LMP – (angl. *low melting point agarose*) – žemos lydymosi temperatūros agarozė  
MB – mikrobranduolys  
MMS – metil-metansulfonatas  
ND – nanodalelės  
NM – nanomedžiagos  
NMP – (angl. *normal melting point agarose*) – normalios lydymosi temperatūros agarozė  
OECD – (angl. *the Organization for Economic Cooperation and Development*) – Ekonominės kooperacijos ir vystymosi organizacija  
PEG – polietilenglikolis  
PKVL – periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės  
PVP – polivinilpirolidonas  
RI – (angl. *replication index*) – replikacinis indeksas  
ROS – (angl. *reactive oxygen species*) – reaktyviosios deguonies formos  
SCM – seserinių chromatidžių mainų testas  
SCMB – sustabdytos citokinezės mikrobranduolių tesas  
SSC – (angl. *side scatter*) – šoninė išsklaidyta šviesa  
SD – (angl. *standard deviation*) – standartinis nuokrypis  
TEM – transmisinė elektroninė mikroskopija

## ĮVADAS

Nanotechnologijos tampa viena iš sparčiausiai augančių rinkų visame pasaulyje [1]. 2022 metais nanomedžiagų (NM) rinka pasaulyje įvertinta 10,88 milijardų Jungtinių Amerikos Valstijų dolerių [2]. Europos cheminių medžiagų agentūra (angl. *European Chemicals Agency – ECHA*) tikisi, kad per ateinančius metus (2023–2030), NM rinka Europoje padidės 14,8 %, o vertė – 18,4 % [3]. Nanodalelės (ND) – tai natūralios arba antropogeninės kilmės medžiaga, kurios vienas arba daugiau išorinių matmenų yra 1–100 nm dydžio [4]. Dėl itin mažo dydžio nanodalelės gali pasižymėti naujomis ir neįprastomis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis, nebūdingomis mikro- ir makroskopinio dydžio atitikmenims [5]. Dėl šios priežasties, atsiranda vis daugiau antropogeninės kilmės nanodalelių, kurios yra kuriamos ir pritaikomos įvairiose srityse: medicinoje, technologijose, pramonėje ir t. t. Atsižvelgiant į tai, kad ir toliau bus stebimas eksponentinis nanodalelių sintezės augimas, tai kelia nerimą dėl galimo neigiamo nanodalelių poveikio gyviems organizmams [6].

Į žmogaus organizmą nanodalelės gali patekti keliais būdais: per kvėpavimo takus, virškinamąjį traktą, odą ir tiesioginės injekcijos metu, kai yra naudojamos biomediciniuose tyrimuose [7]. Patekusios į organizmą nanodalelės neišvengiamai sąveikauja su įvairiomis biomolekulėmis (baltymais, cukrais ir lipidais), dėl to nanodalelės gali lengviau patekti į ląsteles [8]. Nanodalelės gali pažeisti DNR tiesioginiais arba netiesioginiais genotoksiškumo mechanizmais. Tiesiogiai sąveikaudamos su DNR nanodalelės gali sukelti fizines arba chemines DNR pažaidas [9]. Nanodalelių sąveika su DNR interfazės metu gali trikdyti DNR replikaciją arba transkripciją, o sąveika su chromosomomis mitozės metu gali sukelti klastogeninį arba aneugeninį poveikį [10]. Netiesioginis genotoksiškumas gali atsirasti dėl tarpinių produktų: reaktyvių deguonies formų (ROS) formavimosi arba toksiškų jonų atsipalaidavimo iš tirpiųjų ND [10,11]. Reaktyvios deguonies formos gali oksiduoti purinus ir pirimidinus, sukeldamos DNR grandinės trūkius. Jei ląstelės reparacinė sistema veikia efektyviai,

tokios pažaidos gali būti ištaisytos. Tačiau jei pažaidos nėra pašalinamos, jos gali tapti chromosomų pažeidimais [9]. Keletas tyrimų įrodė, kad nanodalelės gali efektyviai patekti į ląsteles arba organus ir juose kauptis, skatinti reaktyvių deguonies formų susidarymą ir sukelti genotoksinį poveikį [12–15].

Šiame darbe siekta ištirti 11-os skirtingų tipų nanodalelių citotoksiškumą ir genotoksiškumą, ypatingą dėmesį skiriant jų dydžiui, koncentracijai ir gebėjimui indukuoti ROS formavimąsi. Tyrimai buvo atliekami su žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėmis ląstelėmis (PKVL), naudojant skirtingus genotoksiškumo testus, kuriais buvo identifikuojamas platus spektras DNR pažaidų: viengrandiniai ir dvigrandiniai DNR trūkiai, apurininės ir apirimidininės vietos, ir chromosomų pažaidos. Dėl spartaus nanotechnologijų vystymosi ir augimo, su nanodalelių poveikiu susijusių rizikų tyrimai tampa ypač svarbūs, o šiame darbe gauti rezultatai prisideda prie nanodalelių saugumo vertinimo strategijų kūrimo.

**Darbo tikslas:** Ištirti skirtingos sudėties, dydžio ir formos nanodalelių gebėjimą patekti į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles ir sukelti citotoksinį ir (arba) genotoksinį poveikį.

**Darbo uždaviniai:**

1. Išanalizuoti nanodalelių hidrodinaminį dydį ir jo pokyčius ląstelių mitybinėje terpėje
2. Nustatyti nanodalelių patekimo į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles efektyvumą
3. Nustatyti nanodalelių gebėjimą indukuoti reaktyviųjų deguonies formų susidarymą žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse *in vitro*
4. Įvertinti nanodalelių citotoksinį poveikį žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse *in vitro*
5. Įvertinti nanodalelių genotoksinį potencialą žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse *in vitro*

## MOKSLINIS DARBO NAUJUMAS IR PRAKTINĖ REIKŠMĖ

Šiame darbe buvo ištirtas skirtingų tipų nanodalelių citotoksiškumas ir genotoksiškumas žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse *in vitro* panaudojant šarminį kometos ir sustabdytos citokinezės mikrobranduolių testus. Remiantis gautais rezultatais buvo nustatyti trys skirtingi nanodalelių sukeliama genotoksiškumo mechanizmai. Po efektyvios internalizacijos nanodalelės ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ -,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ - ir PS-ND), indukuojančios ROS susidarymą, sukėlė ne tik pirmines DNR pažeidas, bet ir reikšmingą chromosomų pažeidų susidarymą, o ND (PVP-Ag,  $\text{SiO}_2$ -ND), neindukavusios ROS susidarymo, sukėlė tik DNR trūkius. Tyrimais taip pat nustatyta, kad nanodalelių internalizacija ir ROS indukcija gali būti ribota (Au-ND), tačiau jos vistiek gali indukuoti statistiškai reikšmingą pirminių DNR pažeidų kiekio augimą.

Šiame darbe, analizuojant nanodalelių genotoksiškumo rezultatus, buvo pastebėta statistiškai reikšminga variacija tarp skirtingų donorų. Tai leidžia daryti prielaidą, kad individualus donorų jautrumas gali turėti reikšmingos įtakos genotoksiškumo tyrimų rezultatams. Tokia pastebėta tendencija kvestionuoja nusistovėjusią praktiką, kur dirbant su donorų krauju genotoksiškumo tyrimų rezultatai pateikiami kaip vidurkių reikšmės ir skatina atsižvelgti į galimą individualų donorų jautrumą siekiant kuo tiksliau identifikuoti medžiagų genotoksiškumą.

Šio darbo rezultatai liudija apie kompleksinių tyrimų panaudojimo svarbą nanogenotoksikologijoje, suteikia tiek teorinių įžvalgų apie nanodalelių sukeliama genotoksiškumo mechanizmus, tiek gali prisidėti prie naujų rekomendacijų tyrimams su nanodalelėmis kūrimo.

## GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Nanodalelių patekimas į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles priklauso nuo nanodalelių tipo ir jų dydžio.
2. Visos tirtosios nanodalelės sukelia reikšmingą pirminių DNR pažeidimų kiekį.
3. Ilgalaikis (24 val.) nanodalelių poveikis dažnai sukelia daugiau pirminių DNR pažeidimų žmogaus PKVL, palyginti su trumpalaikiu poveikiu (1 val. arba 3 val.).
4. ROS generuojančios nanodalelės indukuoja chromosomų pažeidimus.
5. Individualus donorų jautrumas turi įtakos genotoksiškumo tyrimų rezultatams.

# 1. LITERATŪROS APŽVALGA

## 1.1. Nanodalelių rūšys ir šaltiniai

Remiantis Europos komisijos rekomendacija 2022/C 229/1, nanodalelės – tai dalelės, kurių vienas arba daugiau išorinių matmenų yra 1–100 nm dydžio [4]. Jos gali būti natūralios arba antropogeninės kilmės. Natūraliai egzistuojančios ND susidaro vykstant įvairiems aplinkos fizikiniams, cheminiams ir biologiniams procesams, pavyzdžiui, cheminiam mineralų dūlėjimui, fotooksidacijai, mineralizacijai ir kt. Antropogeninės kilmės ND gali susiformuoti kaip žmogaus veiklos šalutinis produktas, tokių procesų metu kaip žemės dirbimas, kasyba, nuotekų išleidimas nepakankamai uždaroje vietoje arba transporto priemonių vidaus degimo variklio veikimo metu [16]. Taip pat antropogeninės ND gali būti sintetinės naujai, taikant įvairius fizikinius, cheminius, biologinius arba hibridinius metodus [17].

## 1.2. Nanodalelių panaudojimas

Dėl mažo dydžio, sudėties, formos ir paviršiaus funkcionalumo ND pasižymi unikalėmis fizikinėmis ir cheminėmis savybėmis, todėl sėkmingai panaudojamos įvairiose pramonės srityse: farmacijoje, elektronikoje, kosmetikoje, medicinoje, maisto pramonėje, bioinžinerijoje ir kt. [18–21].

Dėl puikių antibakterinių, antivirusinių ir priešgrybelinių savybių, sidabro ND plačiai naudojamos biomedicinoje prieš *Staphylococcus aureus* [22], *Candida albicans* [23], Herpes simplex virusą ir žmogaus parainfluenzos 3 tipo virusą [24]. Šiuo metu sidabro ND gali būti aptinkamos antibakteriniuose tvarsčiuose, namų vandens valymo sistemose, kosmetikoje, tekstilėje ir t.t. [25].

Kobalto ir kobalto oksido ND priklauso metalo nanodalelių grupei, ir yra vienos iš perspektyviausių medžiagų, naudojamų cheminėje katalizėje, įvairiuose pigmentuose, biojutikliuose, energijos kaupimo įrenginių gamyboje ir medicinoje, pavyzdžiui, magnetinio rezonanso tomografijoje [26–28]. Be to, kobalto oksido ND yra aktyviai



tyrinėjamos dėl jų selektyvaus vėžinių ląstelių augimo slopinimo ir galimybės panaudoti priešvėžinėje terapijoje [29].

Pastaraisiais metais didelis dėmesys buvo skiriamas silicio ir aliuminio dioksido ND dėl plačių panaudojimo galimybių. Silicio dioksido nanodalelės gali būti pritaikomos tikslinėje vaistų pernašoje, aplinkosaugos ir pažangios katalizės srityse [30]. Tai vienos gausiausiai aptinkamų ND Žemėje [31]. Aliuminio dioksido ND sėkmingai naudojamos tiek tikslinėje vaistų pernašoje [32], tiek keramikoje, siekiant pagerinti keraminių plytelių mechanofizikines savybes [33].

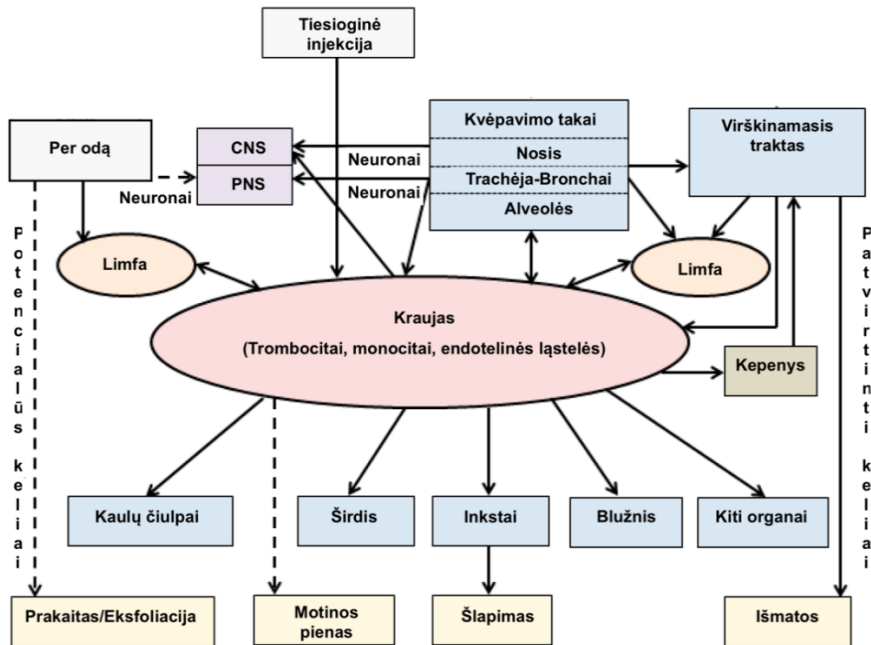
Dėl unikalių fizikocheminių savybių, aukso ND gali būti naudojamos medicininėje biofizikoje [34], molekulinio vaizdinimo technologijose [35] ir biojutikliuose [36]. Taip pat aukso ND gali būti naudojamos kaip radiosensibilizatoriai vėžio terapijoje. Šios dalelės yra linkusios kauptis naviko vietose, o veikiant spinduliuotei išskiria antrinius elektronus, kurie sukelia netiesiogines DNR pažaidas vėžinėse ląstelėse [37].

Polistireno ND dažniausiai sintetamos pasitelkiant stireno polimerizacijos techniką: vykdant emulsinę polimerizaciją, polimerizaciją be emulsiklio, nusodinimo (angl. *precipitation*) polimerizaciją ir dispersinę polimerizaciją [38]. Kadangi polistireno ND gali būti nesudėtingai sintetamos įvairių dydžių ir su skirtingu paviršiaus funkcionalizavimu, jos puikiai tinka naudoti kaip pavyzdinės ND tiriant dalelių paviršiaus charakteristikų poveikį įvairiems biologiniams parametrų (t. y. bio-nano sąveiką) [39]. Dėl polistireno ND gebėjimo efektyviai patekti į ląsteles, šios ND tiriamos kaip priemonė tikslinei vaistų pernašai [40].

Nepaisant daugybės ND pranašumų įvairiose srityse, sparčiai auganti nanotechnologijų pramonė lemia tai, kad didėja ir ND tiesioginė sąveika su gyvais organizmais, todėl kyla susirūpinimas dėl jų saugumo.

### 1.3. Nanodalelių patekimas į žmogaus organizmą

Mokslinėje literatūroje įvardijami keturi potencialūs nanodalelių patekimo į žmogaus organizmą keliai (1.1 pav.).



**1.1 pav.** Nanodalelių patekimo į žmogaus organizmą ir pasiskirstymas jame – patvirtinti ir potencialūs keliai. Modifikuota pagal Bakand & Hayes, 2016 [41]

**Fig. 1.1** Nanoparticle entry into the human body and their distribution – confirmed and potential pathways. Modified from Bakand & Haey, 2016

Tiesioginės injekcijos metu, kai ND naudojamos biomedicinoje, ligos diagnostikoje, terapijoje, audinių arba organų vaizdinime [42]. Per kvėpavimo takus, su įkvėpiamu oru. Per odą, su naudojamomis kosmetikos arba dermatologinėmis priemonėmis ir per virškinamąjį traktą su vartojamu maistu ir gėrimais [8].

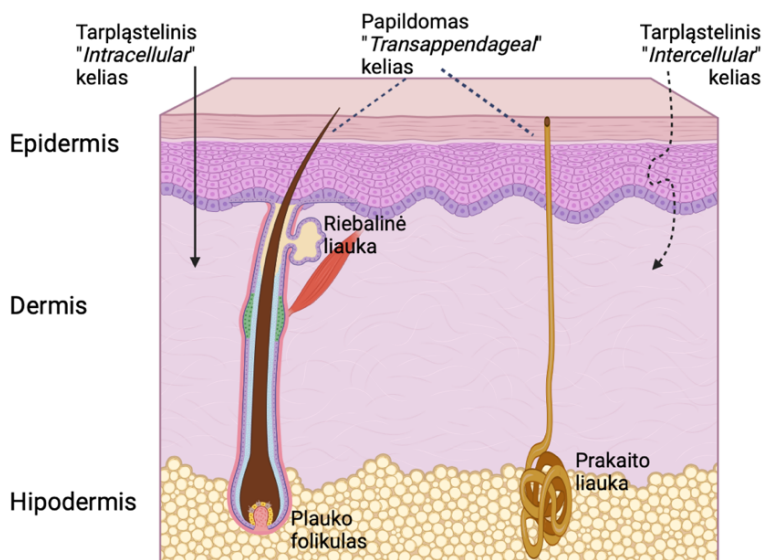
### 1.3.1 Nanodalelių patekimas per kvėpavimo takus

Anatomiškai, žmogaus kvėpavimo sistema sudaryta iš dviejų dalių: viršutinių kvėpavimo takų (nosies ertmės, ryklės ir gerklės), ir apatinių kvėpavimo takų (trachėjos, bronchų, bronchiolių, alveolių kanalų ir alveolių, kurios svarbios dujų apykaitai) [43]. Viršutinių kvėpavimo takų pagrindinės funkcijos yra oro perdavimas ir apatinių kvėpavimo takų apsauga. Nepaisant to, ND dažnai yra per mažos, kad jos būtų veiksmingai atpažintos ir fagocituotos alveolinių makrofagų, o

ypač mažos dalelės gali potencialiai kirsti plaučių epitelio audinio barjerą ir patekti į kraujotakos sistemą [41,44,45]. Žinoma, kad priklausomai nuo ND fizikocheminių savybių, įkvėpimo metu jos gali peržengti kraujo-smegenų barjerą (angl. *blood-brain barrier (BBB)*) arba gali būti pernešamos neuronų tiesiai iš nosies į smegenis [41].

### 1.3.2 Nanodalelių patekimas per odą

Oda yra sudaryta iš trijų sluoksnių: epidermio, dermio ir poodinio sluoksnio. Tai yra vienas iš didžiausių žmogaus organų, apsaugantis organizmą nuo įvairių aplinkos veiksnių [46]. Tačiau manoma, kad ND potencialiai gali kirsti odos barjerą keliais būdais: tarpląstelininiu keliu (angl. *intercellular* ir angl. *intracellular*) ir per plaukų folikulus arba prakaito liaukas (angl. *transappendageal route*) (1.2 pav.) [47].



**1.2 pav.** Odos sandara ir nanodalelių patekimo būdai tarpląstelininiu ir papildomu keliu. Sukurta naudojant BioRender.com

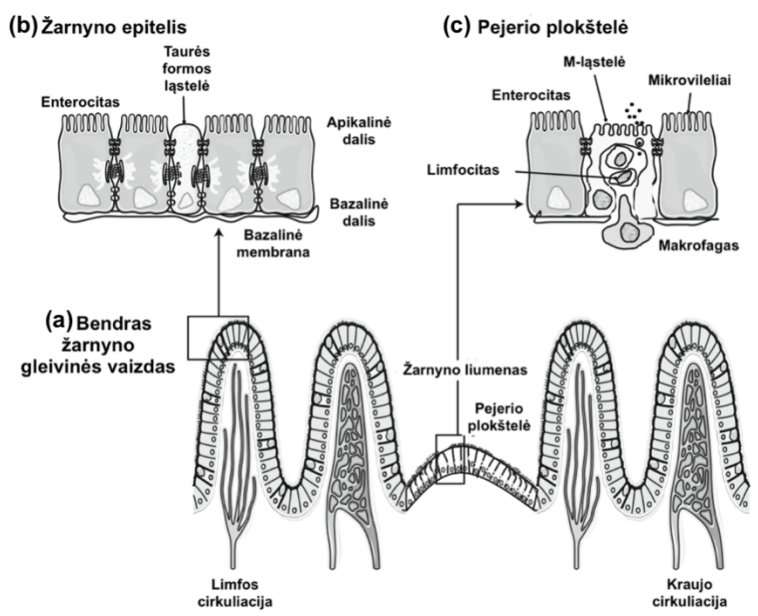
**Fig. 1.2** Structure of the skin and pathways of nanoparticles uptake routes. Created using BioRender.com

Tarpląstelinis kelias paremtas nanodalelių gebėjimu epidermio sluoksnį kirsti tiesiogiai per korneocitus (angl. *intracellular route*) arba pasklindant lipidų matrikse, esančiame tarp ląstelių (angl. *intercellular route*) [48]. Taip pat nanodalelės į organizmą gali patekti per prakaito

liaukas arba plaukų folikulus (angl. *transappendagear route*) plauko augimo metu. Kadangi plauko folikulas sąveikauja su limfa ir kapiliarais, šiuo keliu patekusios nanodalelės gali patekti į sisteminę cirkuliaciją [47]. Nors tikslūs nanodalelių patekimo per nepažeistą odą mechanizmai nėra pilnai ištirti, yra žinoma, kad mažesnės nei 4 nm dydžio nanodalelės gali kirsti nepažeistą odą, o nanodalelės, kurių dydis svyruoja tarp 4–45 nm, gali prasiskverbti tik per odos pažeidimus [49].

### 1.3.3 Nanodalelių patekimas per virškinimo sistemą

Virškinimo sistema sudaryta iš viršutinio (stemplės, skrandžio ir dvylikapirštės žarnos) ir apatinio virškinamojo trakto (plonasis ir storasis žarnynas) [44]. Kiekviena iš šių dalių atlieka virškinimo, absorbcijos, sekrecijos ir apsaugines funkcijas ir turi unikalias biochemines sąlygas, įskaitant pH, virškinimo fermentus ir kt. [50]. Didžiosios dalies maistinių medžiagų skaidymas ir adsorbcija vyksta plonajame žarnyne. Ši žarnyno dalis yra mechaniškai apsaugota epitelio, sudaryto iš enterocitų, taurės formos ląstelių (angl. *goblet cells*) ir Pejerio plokštelių (angl. *Peyer's patches*), ir skirtingo storio bei sudėties gleivių, už kurių sintezę atsakingos taurės formos ląstelės (1.3 pav.) [46,50,51].



**1.3 pav.** Žarnyno epitelio sandara. a – bendras žarnyno gleivinės vaizdas; b – žarnyno epitelis; c – Pejerio plokštelės. Modifikuota pagal Baeza-Squiban & Lanone [46]

**Fig. 1.3** Structure of the intestinal epithelium. a – general view of the intestinal mucosa; b - intestinal epithelium; c - Peyer's patches. Modified from Baeza-Squiban & Lanone

Enterocitai dalyvauja makromolekulių ir mikroorganizmų perdavimo kontrolėje ir maistinių medžiagų įsisavinime, o Pejerio plokštelės – svarbios imunitetui. Pejerio plokštelės sudarytos iš specializuoto epitelio su M-ląstelėmis (angl. *M-cells*), kurias mikroorganizmai gali naudoti žarnyno gleivinei kirsti (1.3 pav. (C)) Taigi, nanodalelių translokacija per žarnyno barjerą yra daugiapakopis procesas, apimantis ND difuziją per gleivių sluoksnį, sąveiką su enterocitais ir (arba) M-ląstelėmis ir viduląstelinį ND įsisavinimą [44,50].

#### 1.4. Viduląstelinio nanodalelių įsisavinimo mechanizmai

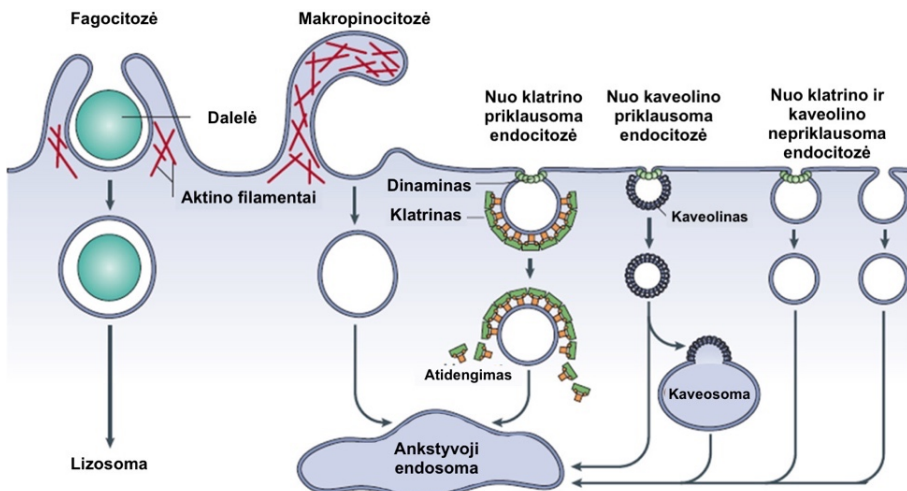
Nustatyta, kad nanodalelėms patekus į organizmą ir pradėjus sąveikauti su audiniais ir biologiniais skysčiais, aplink jas spontaniškai susiformuoja biomolekulių / baltymų vainikas (angl. *biomolecular / protein corona*), sudarytas iš lipidų, cukrų, nukleorūgščių, įvairių

metabolitų, bet daugiausiai – baltymų [52]. Tyrimuose su žmogaus plazma, baltymų vainiko pėdsakai ant nanodalelių paviršiaus buvo pastebėti jau po 30-ies sekundžių. Taip pat įrodyta, kad baltyminio vainiko profilis laike nekinta, kinta tik baltymų, esančių vainike, kiekis [53]. Remiantis baltymų afiniškumu ir disociacijos greičiu, baltyminis vainikas dažniausiai sudarytas iš dviejų sluoksnių – kietojo (angl. *hard corona*) ir minkštojo (angl. *soft corona*) [54]. Kietasis sluoksnis gali susidaryti labai greitai – nuo kelių sekundžių iki kelių minučių, jį formuoja aukšto afiniškumo baltymai, sudarydami glaudžius ryšius su nanodalelės paviršiumi, tai stabilus ir dažniausiai laike nekintantis sluoksnis, turintis žemą disociacijos konstantą [55]. Priešingai, minkštojo sluoksnio susidarymas užtrunka iki kelių valandų. Jis sudarytas iš mažo afiniškumo baltymų, kurie silpnomis, nekovalentinėmis jungtimis sąveikauja su kitais baltymais, esančiais vainike. Šis sluoksnis turi aukštą disociacijos konstantą, tad gali būti dinamiškas ir linkęs kisti [55]. Baltymų vainiko formavimasis gali turėti įtakos nanodalelių fizikocheminėms savybėms, tolimesnei nanodalelių sąveikai tarpusavyje ir su ląstelėmis, skatindamas arba slopindamas jų patekimo į ląstelę efektyvumą [56].

Ląstelių membrana sudaryta iš amfifilinių lipidų, turinčių hidrofilines galvutes ir hidrofobines uodegas, dvisluoksnio. Tai yra selektyviai pralaidus barjeras, kurio viena iš svarbiausių funkcijų yra mažų molekulių ir maistinių medžiagų pernašos kontrolė [7]. Priklausomai nuo to, ar naudojama energija, medžiagų transportas gali būti pasyvus arba aktyvus. Dujos (pavyzdžiui, deguonis ir anglies dioksidas), hidrofobinės molekulės (pavyzdžiui, benzenas) ir mažos, polinės, krūvio neturinčios molekulės (pavyzdžiui, vanduo ir etanolis) geba kirsti ląstelės membraną pasyvios pernašos būdu, prieš koncentracijos gradientą [57,58]. Didesnių polinių ir krūvį turinčių molekulių, įskaitant nanodaleles, pernašai per ląstelės membraną dažniausiai reikalinga energija – vyksta aktyvioji pernaša. Pagrindinis nanodalelių pernašos būdas yra endocitozė, kurios metu dalis ląstelės membranos įlinksta į ląstelės vidų ir apgaubia dalelę, kuri vėliau pernešama į ląstelės vidų suformuodama viduląstelinę pūslelę

[7,58,59]. Iš esmės, endocitozė gali būti skirstoma į dvi pagrindines kategorijas: fagocitozę ir pinocitozę [58].

Fagocitozės metu specializuotos žinduolių ląstelės (makrofagai, neutrofilai, dendritinės ląstelės ir kt.) geba internalizuoti bakterijas ir daleles, didesnes nei 750 nm dydžio, formuodamos fagosomas [58]. Pinocitozę gali vykdyti beveik visų tipų ląstelės, o jos metu internalizuojami skysčiai ir mažos molekulės (nuo kelių nanometrų iki kelių šimtų nanometrų dydžio). Pinocitozė skirstoma į makropinocitozę, nuo klatrino priklausomą endocitozę, nuo kaveolino priklausomą endocitozę ir nuo klatrino ir kaveolino nepriklausomą endocitozę (1.4 pav.) [58,60].



**1.4 pav.** Nanodalelių patekimo į ląstelę keliai. Modifikuota pagal Mayor & Pagano, 2007 [61]

**Fig. 1.4** Pathways of nanoparticle entry into the cell. Modified from Mayor & Pagano, 2007

Makropinocitozės metu vyksta citoskeleto persitvarkymas. Dalyvaujant aktino filamentams, susidaro plazminės membranos ištįsimai, formuojantys 0,2–5  $\mu\text{m}$  dydžio pūsleles, į kurias patenka ekstraląsteliniame skystyje esančios molekulės ir dalelės, nepriklausomai nuo specifinių receptorių buvimo [62]. Šis procesas svarbus didesnių nanodalelių patekimui į ląsteles, kurių įsisavinimas nuo klatrino ar kaveolino priklausoma endocitoze būtų neįmanomas [7].

Nuo klatrino priklausoma endocitozė yra pagrindinis nanodalelių patekimo į ląsteles kelias, kurį inicijuoja nanodalelių paviršiaus ligandų prisijungimas prie atitinkamų ląstelės membranos receptorių ir plazminės membranos invaginacijos [63]. Nanodalelės yra patalpinamos į 100–500 nm dydžio viduląstelines pūsleles iš išorės padengtas citozoliniu endocitiniu baltymu klatrinu. Pūslelių formavimasi užbaigia jų atskyrimas nuo ląstelės membranos, dalyvaujant fermentui dinaminui [64]. Paprastai šios pūslelės, padengtos klatrinu, yra pernešamos į endosomas, kurios vėliau dažniausiai susilieja su lizosomomis ir taip nanodalelės patenka į ląstelės endolizosominę sistemą [63].

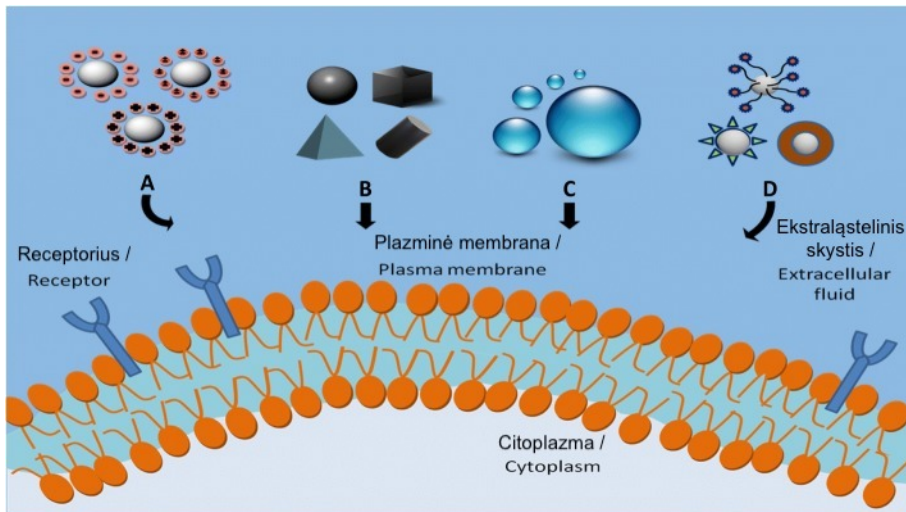
Nuo kaveolino priklausoma endocitozė primena nuo klatrino priklausomą pernašą, tik vietoje baltymo klatrino susiformavusias viduląstelines pūsleles su medžiagomis iš aplinkos dengia baltymas kaveolinas, ir tokios pūslelės vadinamos kaveolėmis [60]. Šiuo endocitozės mechanizmu dažniausiai pernešamos 20–100 nm dydžio nanodalelės [65]. Susiformavusios ir nuo plazminės membranos atsiskyrusios kaveolės susilieja su viduląsteliniu kompartmentu – kaveosoma. Kaveosomos geba išvengti sąveikos su lizosomomis ir tokiu būdu apsaugo pūslelių viduje pernešamas medžiagas nuo fermentinio skaidymo. Dėl šios priežasties nuo kaveolino priklausoma endocitozė sulaukia daug susidomėjimo nanomedicinos srityje [58].

Ląstelėse, kuriose nėra klatrino ir kaveolino baltymų, gali vykti nuo klatrino ir kaveolino nepriklausoma endocitozė. Manoma, kad šiam procesui svarbūs lipidų plauštai (angl. *lipid rafts*) – cholesterolio ir sfingolipidų turintys domenai, esantys plazminėje membranoje, ties kuriais gali vykti endocitozė ir viduląstelinių pūslelių formavimasis [66].

#### 1.4.1. Nanodalelių savybės, turinčios įtakos jų viduląsteliniam įsisavinimui

Nanodalelių fizikocheminės savybės, t.y. paviršiaus krūvis, dydis, forma ir dalelės paviršiaus chemija, turi įtakos jų patekimo į ląsteles efektyvumui (1.5 pav.) [58,59,63,67].





**1.5 pav.** Fizikocheminės nanodalelių savybės, turinčios įtakos jų viduląsteliniam įsisavinimui. (a) – paviršiaus krūvis, (b) – forma, (c) – dydis, (d) – paviršiaus chemija. Modifikuota pagal Foroozandeh & Aziz, 2018 [58]

**Fig. 1.5** Physicochemical properties of nanoparticles affecting their intracellular uptake. (a) surface charge, (b) shape, (c) size, (d) surface chemistry. Modified from Foroozandeh & Aziz, 2018

Kadangi ląstelių membranų elektrinis krūvis yra neigiamas, teigiamai įkrautos nanodalelės yra gana lengvai pritraukiamos prie membranos ir dažniausiai efektyviau patenka į ląsteles, palyginti su neutraliomis ar neigiamą krūvį turinčiomis nanodalelėmis [58,68]. Įdomu ir tai, kad nanodalelių krūvis gali turėti įtakos, kuris endocitozės kelias bus naudojamas. Tyrimuose su A549 ląstelių linija nustatyta, kad polietilenglikoliu (PEG) padengtos aukso nanodalelės, turinčios neigiamą krūvį, į ląsteles patenka nuo klatrino ir kaveolino priklausomos endocitozės būdu, o nemodifikuotos aukso nanodalelės (stabilizuotos citratu), turinčios teigiamą krūvį, į ląsteles daugiausiai patenka makropinocitozės ir nuo klatrino ir kaveolino priklausomos endocitozės keliais [69].

Nanodalelių dydis yra vienas svarbiausių veiksnių, galinčių lemti nanodalelių patekimo į ląsteles efektyvumą [58]. Remiantis Gao ir kolegų [70] pasiūlytu teoriniu modeliu, optimalų nanodalelių dydį, efektyviam patekimui į ląstelę, lemia ryšys tarp receptorių difuzijos

kinetikos ir termodinaminių varomųjų jėgų. Teigiama, kad nanodalelių, mažesnių nei optimalus pasiūlytas dydis (~55 nm), prisijungimas prie receptorių negeneruoja pakankamai laisvos energijos, skirtos inicijuoti membranos apgaubimo. Sėkmingai mažesnių nanodalelių internalizacijai reikalingas klasterių formavimasis. Chithrani ir kolegų tyrime [71], kuriame buvo tirtas skirtingo dydžio aukso nanodalelių patekimo efektyvumas į HeLa ląsteles nustatyta, kad sėkmingai Au ND internalizacijai pakako vienos 50 nm dydžio aukso nanodalelės, o 14 nm dydžio aukso nanodalelės į HeLa ląsteles pateko tik suformavusios klasterius bent iš 6 ND. Nanodalelių, didesnių nei pasiūlytas optimalus dydis, internalizacijos efektyvumas gali būti lėtesnis dėl lėtesnės receptorių difuzijos kinetikos [70]. Būtent tai buvo įrodyta tyrimuose su aukso nanodalelėmis, kur 40–50 nm dydžio nanodalelės, nuo receptorių priklausomos endocitozės keliu į HeLa [72] ir SK-BR-3 [73] ląsteles pateko efektyviau nei mažesnės ar didesnės ND. Panaši tendencija stebėta ir su mezoporinėmis 50 nm dydžio silicio nanodalelėmis, kurios į HeLa ląsteles pateko efektyviau, nei 30, 110, 170 arba 280 nm dydžio ND [74]. Tačiau vieningos nuomonės dėl optimalaus ND dydžio nėra. Shapero ir kt. [75] tyrime nustatyta, kad didėjant silicio dioksido nanodalelių dydžiui, jų patekimo į A549 ląsteles efektyvumas mažėja. O 30 nm dydžio anglies nanovamzdeliai (angl. *single-walled carbon nanotubes (SWNT)*) į ląsteles pateko efektyviau nei 50 nm dydžio nanovamzdeliai [76]. Taigi, nanodalelių viduląstelinė internalizacija yra kompleksiškas mechanizmas, kuriam įtakos gali turėti daugybė veiksnių.

Dar viena nanodalelių savybė, turinti įtakos jų efektyviam patekimui į ląstelę, yra ND forma. Chithrani su kolegomis [72] įrodė, kad 74 ir 14 nm dydžio sferos formos aukso nanodalelės į HeLa ląsteles pateko, atitinkamai, 5 ir 3,75 kartus efektyviau nei 74 × 14 nm dydžio aukso nanovamzdeliai. Palyginus sferinių ir prizmės formos sidabro nanodalelių internalizacijos efektyvumą nustatyta, kad tyrimuose su HaCat ląstelėmis reikšmingas skirtumas tarp ND formos nepastebėtas, tačiau tyrimuose su hMSC ląstelėmis – prizmės formos sidabro

nanodalelės į ląsteles pateko efektyviau [77]. Galiausiai, Banerjee su kolegomis [78] palygino sferos, disko ir vamzdelių formos polistireno nanodalelių viduląstelinės internalizacijos efektyvumą Caco2 ląstelėse ir nustatė, kad vamzdelių ir disko formos nanodalelės į ląsteles pateko dvigubai greičiau nei sferos formos ND. Daugumoje tyrimų stebima tendencija, kad išilgintos formos nanodalelės į ląsteles patenka efektyviau, nei sferos formos dalelės. Teigiama, kad sferinės ND turi mažiau jungimosi vietų, skirtų sąveikai su ląstelėmis dėl jų išlenktos formos, dėl to jų internalizacija gali būti mažiau efektyvi [79].

Siekiant pagerinti nanodalelių patekimo į ląstelę efektyvumą, jų paviršius gali būti specifiskai modifikuojamas prijungiant funkcines grupes, kurios užtikrina tvirtą sąveiką su ląstelės membrana ir saugų ND patekimą į ląstelės vidų [79]. Dažniausiai mokslinėje literatūroje aptinkamos nanodalelių paviršiaus modifikacijos yra polietilenglikolio (PEG), neigiamą krūvį turinčios karboksilo grupės (-COOH), neutralios hidroksilo (-OH) grupės ir teigiamo krūvio amino (-NH<sub>2</sub>) grupės prijungimas. Hidrofilinio PEG prijungimas prie ND paviršiaus užtikrina jų stabilumą ir sumažina tarpusavio agregacijos tikimybę [80]. Be to, tokia modifikacija slopina ND sąveiką su opsoninų baltymais, dėl to PEG modifikuotų nanodalelių cirkuliacijos laikas organizme yra ilgesnis, o pernaša į specifinę organizmo vietą – efektyvesnė [80–82]. Priklausomai nuo prijungtų funkcinių grupių ir jų skaičiaus, kinta nanodalelių paviršiaus krūvis, o tai svarbu nanodalelių tikslinei pernašai į specifines ląsteles. Amino ir karboksilo grupėmis modifikuotos polistireno nanodalelės į A549 ląsteles pateko reikšmingai efektyviau, nei nmodifikuotos [83]. Taip pat SiO<sub>2</sub> nanodalelių funkcionalizavimas karboksilo ir amino grupėmis pagerino jų viduląstelinės internalizacijos efektyvumą *in vitro* ir *in vivo* sąlygomis [84]. Taigi, tikslingas nanodalelių paviršiaus funkcionalizavimas gali užtikrinti jų sėkmingą sąveiką su specifiniais receptoriais ir patekimą į ląstelę, o tai ypač svarbu biomedicinoje, kurioje nanodalelės gali būti panaudojamos kaip vaistų pernašos sistemos arba teranostinė priemonė [79].

## 1.5. Nanodalelių genotoksiškumas ir jo mechanizmai

Genotoksiškumas apibūdinamas kaip įvairių cheminių, biologinių ir fizikinių veiksnių gebėjimas pažeisti ląstelių genetinę medžiagą [85]. Genotoksiniai efektai gali pasireikšti DNR, chromosomų ir viso genomo lygiu [11]. Somatinių ląstelių mutacijos gali sukelti vėžio ir kitų lėtinių ligų vystymąsi, o mutacijos lytinėse ląstelėse gali sukelti paveldimą požymio pokytį [86].

Mokslinėje literatūroje išskiriami keli skirtingi nanodalelių sukeliama genotoksinio poveikio mechanizmai: pirminis tiesioginis arba netiesioginis ir antrinis [87,88]. Nanodalelės gali pažeisti ląstelės genetinę informaciją vienu iš šių mechanizmų, arba keliais mechanizmais vienu metu [11].

### 1.5.1 Pirminis tiesioginis genotoksiškumo indukcijos mechanizmas

Pirminiam tiesioginiam genotoksiškumui pasireikšti yra reikalinga tiesioginė dalelės ir DNR sąveika [11]. Dalelės gali kirsti branduolio membraną difuzijos būdu arba per branduolio porų kompleksus ir tiesiogiai sąveikaudamos su DNR gali sukelti fizines arba chemines DNR pažeidas [9]. Nanodalelių sąveika su DNR interfazės metu gali trikdyti DNR replikaciją arba transkripciją, o sąveika su chromosomomis mitozės metu gali sukelti klastogeninį arba aneugeninį poveikį [10].

### 1.5.2 Pirminis netiesioginis genotoksiškumo indukcijos mechanizmas

Pirminio netiesioginio mechanizmo sukeliama genotoksiškumas gali atsirasti dėl tarpinių produktų: reaktyvių deguonies formų (ROS) formavimosi arba toksiškų jonų atsipalaidavimo iš tirpiųjų ND [10,11]. Vienas pagrindinių pirminio netiesioginio mechanizmo sukeliama genotoksiškumo veiksnių yra oksidacinis stresas. ROS gali sukelti purinų arba pirimidinų oksidaciją ir DNR grandinės trūkius. Jeigu ląstelės DNR reparacijos sistema nepažeista, tokios pažeidos gali būti ištaisytos, tačiau jos taip pat gali virsti genų mutacijomis arba chromosomų pažeidimais [9]. Be to,

nanodalelės gali pažeisti įvairius baltymus ir kitas ląstelių dalijimesi dalyvaujančias molekules, svarbias mitozinės verpstės formavimesi, DNR replikacijoje, transkripcijoje arba reparacijoje [11].

### 1.5.3 Antrinis genotoksiškumo indukcijos mechanizmas

Antrinio mechanizmo sukiamas genotoksiškumas pasireiškia dėl nanodalelių gebėjimo sukelti lėtinį uždegiminį atsaką *in vivo*. Uždegimo vietoje aktyvinami makrofagai ir neutrofilai, kurie pradeda sintetinti didelį kiekį ROS, kurie sukelia oksidacinį stresą [89]. Oksidacinis stresas indukuoja įvairias lipidų, baltymų ir DNR pažaidas [11].

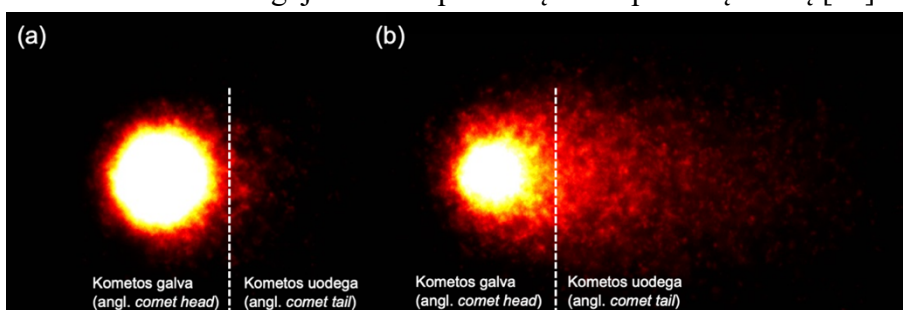
### 1.6 Nanodalelių sukkelto genotoksiškumo vertinimas

Daugumos cheminių medžiagų genotoksiškumas vertinimas *in vitro* ir *in vivo* naudojant testų rinkinius (angl. *testing battery*), leidžiančius įvertinti medžiagos genotoksinį potencialą genų, chromosomų ir viso genomo lygmenyje [90]. Dabartinės OECD gairės apima Eimso testą (angl. *Ames test*; OECD TG 471), genų mutacijų testus žinduolių ląstelėse (OECD TG 476) ir chromosomų aberacijų arba mikrobranduolių testus žinduolių ląstelėse (atitinkamai OECD TG 473 arba 487) *in vitro*. Tačiau, nanodalelių genotoksiškumo vertinimų strategija dar nėra apibrėžta, o standartiniai genotoksiškumo testai ne visada yra optimalūs ND tyrimuose, ypač tyrimus atliekant *in vitro* [91].

Eimso arba bakterijų reversinių mutacijų testu aptinkamos taškinės mutacijos, įskaitant vienos ar kelių bazių porų pakeitimą, įsiterpimą arba deleciją [92]. Nepaisant šio testo tinkamumo ir svarbos vertinant farmacinių ir cheminių junginių genotoksiškumą, mokslinėje literatūroje nerekomenduojama Eimso testo naudoti nanodalelių sukeltam genotoksiškumui nustatyti, nes gaunami rezultatai dažnai būna klaidingai neigiami (angl. *false negative*). Doak et al. [89] Eimso testu nustatė, kad didžioji dalis nanodalelių nesukelia genotoksinio poveikio, tačiau tolimesniuose *in vitro* ir *in vivo* tyrimuose buvo nustatytas teigiamas genotoksinis atsakas. Tai aiškinama sudėtingu

nanodalelių patekimu į bakterijų ląsteles, nes jos negali vykdyti endocitozės ir taip įsisavinti nanodalelių, o ND difuzija per ląstelės sienelę yra ribota. Taip pat nustatyta, kad kai kurios nanodalelės gali turėti antibakterinių savybių [93].

Nanodalelių genotoksiškumas žinduolių ląstelėse dažniausiai nustatomas kometų ir mikrobranduolių testais [90]. Kometų arba pavienių ląstelių gelio elektroforezės gelyje testas (angl. *single cell gel electrophoresis – SCGE*) yra paprastas, greitas ir jautrus testas, kuriuo gali būti analizuojamos pirminės DNR pažaidos [94]. Šis testas paremtas DNR fragmentų judėjimu agarozės gelyje iš branduolio anodo link, suformuojant į kometas panašią struktūrą (1.6 pav.) DNR kiekis kometos uodegoje atitinka pirminių DNR pažaidų mastą [85].



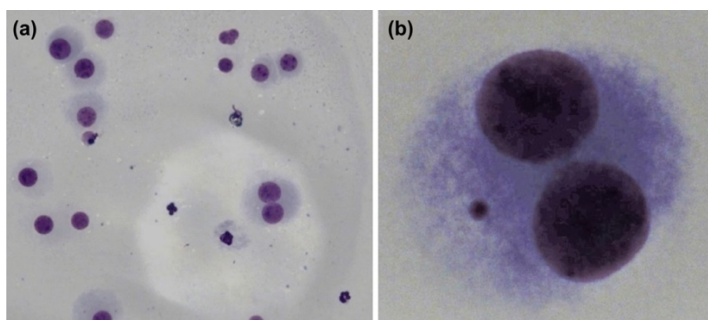
**1.6 pav.** Kometų pavyzdžiai: (a) neigiamos kontrolės mėginio ląstelė; (b) teigiamos kontrolės mėginio ląstelė, paveikta  $H_2O_2$ . Vaizdas padidintas 400 kartų. (aut. nuotrauka)

**Fig. 1.6** Representative comet images. (a) cell from the negative control sample; (b) cell treated with  $H_2O_2$  (400 $\times$ ) (original photo)

Egzistuoja keli kometos testo variantai: neutralus kometos testas (angl. *neutral comet assay*), kuriuo identifikuojami dvigrandininiai DNR trūkiai; dažniausiai naudojamas šarminis kometos testas (angl. *alkaline comet assay*), kuriuo įvertinami dvigrandininiai DNR trūkiai ir šarmui jautrios vietos (viengrandininiai DNR trūkiai, apurininės ir apirimidininės vietos); daug dėmesio susilaukiantis fermentine reakcija papildytas kometos testas (angl. *enzyme-modified comet assay*), kuriuo, priklausomai nuo naudojamo fermento, galima aptikti oksiduotas bazines, DNR metilinimą ir kt [95]. Nors kometos testas yra jautrus ir leidžia identifikuoti net silpniausią genotoksinį poveikį, tačiau šiam

metodui trūksta specifiškumo. Taip pat gaunami kometos tyrimo rezultatai negali būti tiesiogiai siejami su medžiagos mutageniškumu ir ligų vystymusi, nes pirminės DNR pažaidos, kurios yra identifikuojamos kometos testu, prieš tampant mutacijomis, gali būti sėkmingai ištaisytos ląstelės DNR reparacijos sistemos [88]. Dėl to kometos testas yra dažnai atliekamas kartu su sustabdytos citokinezės mikrobranduolių testu, nes jie vienas kitą papildo: kometos testas identifikuoja pirmines DNR pažaidas, o mikrobranduolių testas leidžia analizuoti chromosomų pažaidas [85].

Mikrobranduolių (MB) arba sustabdytos citokinezės mikrobranduolių testas (SCMB) yra vienas dažniausiai naudojamų testų nanodalelių genotoksiškumo įvertinimui [96]. Nanodalelės tiesioginiu arba netiesioginiu keliu gali sutrikdyti ląstelės dalijimąsi ir indukuoti mikrobranduolių susidarymą. Mikrobranduoliai – tai DNR fragmentai, apgaubti membrana, kurie susiformuoja iš acentrinių chromosomų fragmentų arba pilnų chromosomų, nenukeliausių į skirtingus ląstelių polius anafazės metu [97]. Mikrobranduolių analizės metu analizuojamos vieną kartą pasidalijusios ląstelės. Tokias ląsteles gana nesudėtinga atskirti, jeigu tyrimo metu yra naudojama citokinezę stabdanti medžiaga – citochalazinas B (cytB). CytB slopina aktino filamentų formavimąsi, dėl to po mitozės dukterinės ląstelės nepasidalina ir formuojasi dvibranduolės ląstelės (1.7 pav.) [96,97].



**1.7 pav.** (a) Vienbranduolių ir dvibranduolių ląstelių mikrofotografija (200×) ir (b) dvibranduolės ląstelės su mikrobranduoliu mikrofotografija (1000×) (aut. nuotrauka)

**Fig. 1.7.** (a) Representative micrographs of mononucleated and binucleated cells (200×) and (b) binucleated cells with micronucleus (1000×) (original microphotography)

Siekiant padidinti tyrimo specifiškumą, MB testas gali būti sėkmingai kombinuojamas su fluorescencine *in situ* hibridizacija (FISH) [98]. Testo metu panaudojami įvairūs DNR zondai, atpažįstantys centromeras, visas chromosomas arba kitus chromosomų specifinius regionus pagrindiniuose branduoliuose ir mikrobranduoliuose. Panaudojant centromerinius zondus, galima įvertinti mikrobranduolyje esančios DNR šaltinį: jeigu MB esanti chromosomos dalis neturi centromerų, MB susiformavo dėl chromosomos trūkio (klastogeninis poveikis); jeigu MB matomas centromerą žymintis zondas, tai MB susidarė iš visos chromosomos (aneugeninis poveikis) [99]. Taigi, kombinuotas susitabdytos citokinezės mikrobranduolių ir FISH testas leidžia įvertinti tiriamosios medžiagos klastogeninį ir aneugeninį poveikius [96].

#### 1.6.1 Nanodalelių sukkelto genotoksiškumo tyrimų rekomendacijos

Nors nanodalelių sintezė ir jų panaudojimo spektras auga eksponentiškai, dar nėra griežto protokolo arba nurodymų, kaip turėtų būti vertinamas jų genotoksiškumas [88]. Remiantis įvairių tyrimų rezultatais ir stebint tendencijas, kelios mokslininkų grupės pateikė rekomendacijas, kuriomis reikėtų vadovautis siekiant įvertinti nanodalelių daromą įtaką. Daugumoje genotoksiškumo tyrimų rekomendacijų yra minimi penki svarbiausi aspektai: nanodalelių charakterizavimas ląstelių mitybinėje terpėje, tikslingas ląstelių linijos pasirinkimas, nanodalelių internalizacijos įvertinimas, optimalių nanodalelių koncentracijų ir poveikio laiko naudojimas [11,88,90,91,100,101].

Skirtingai negu kitos cheminės medžiagos arba mažos molekulės, nanodalelės dažniausiai nėra tirpios buferiuose ar tirpikliuose [102]. Nanodalelės yra linkusios reaguoti su aplinkoje esančiomis molekulėmis ir aglomeruoti tarpusavyje. Tai gali turėti įtakos jų patekimo į ląstelę efektyvumui, sukeliama citotoksiškumui ir genotoksiškumui [88,102]. Dėl to vertinant nanodalelių genotoksiškumą, daugumoje rekomendacijų vienas iš pirmųjų žingsnių yra įvertinti nanodalelių fizikochemines savybes: dydį ir hidrodinaminį



dydį tirpiklyje ir ląstelių mitybinėje terpėje, ND dydžio pokyčius mitybinėje terpėje praėjus specifiniam laiko tarpui ir nanodalelių krūvį bei stabilumą [90,100].

Taip pat svarbu, kad tyrimuose būtų naudojama jautriausia ląstelių linija, pageidautina, žmogaus kilmės, stabilus kariotipo ir su veikliu *TP53* [88,100]. Žinoma, svarbu atsižvelgti, koku labiausiai tikėtiniu būdu tiriamosios nanodalelės natūraliai gali patekti į žmogaus organizmą, ir kokios ląstelės gali būti paveikiamos pirmiausiai. Jeigu pagrindinis nanodalelių patekimo kelias yra per odą, kvėpavimo sistemą arba virškinamąjį traktą, reiktų rinktis, atitinkamai, odos epitelio (pvz., Hs27), plaučių fibroblastų (pvz., A549) arba virškinamojo trakto (pvz., Caco2) ląstelių linijas. Jeigu tiriamosios nanodalelės, bus naudojamos kaip tikslinės pernašos sistema, reiktų rinktis kraujo arba kraujagyslių endotelio ląstelių linijas [88,90,100]. Įdomu tai, kad tyrimai su kraujo ląstelėmis ir kepenų ląstelėmis yra aktualūs daugeliu atvejų, nepriklausomai nuo nanodalelių patekimo į žmogaus organizmą kelio. Bet kuriuo keliu į organizmą patekusios nanodalelės gali atsidurti kraujo sistemoje ir būti išnešiojamos po organizmą bei kauptis kepenyse [41].

Nanodalelių internalizacijos įvertinimas yra vienas iš svarbiausių aspektų interpretuojant gautus rezultatus, ypač, jeigu genotoksiškumo tyrimų metu gaunami neigiami rezultatai [100]. Nanodalelių gebėjimas arba negebėjimas patekti į ląstelės vidų gali atskleisti, ar tiriamoji medžiaga iš tikrųjų nėra genotoksiška, ar tiesiog negebėjo pasiekti taikinio ląstelės [88].

Kitas svarbus aspektas – optimalios koncentracijos ir poveikio laiko pasirinkimas. Kaip ir su cheminėmis medžiagomis, pasirinkta nanodalelių koncentracija turi būti necitotoksiška. Jeigu nanodalelių genotoksiškumas vertinamas šarminiu kometos metodu, siekiant išvengti klaidingai teigiamų (angl. *false positive*) rezultatų, didžiausia pasirinkta nanodalelių koncentracija neturėtų viršyti 25 % – 30 % citotoksiškumo [103]. Be to, rekomenduojamas trumpalaikio (1–3 val.) ir ilgalaikio (24–72 val.) poveikio įtraukimas siekiant užtikrinti sėkmingą nanodalelių patekimą į ląsteles [104]. Remiantis OECD

rekomendacijomis, jeigu atliekamas sustabdytos citokinezės mikrobranduolių testas, didžiausia tiriamoji ND koncentracija ląstelių gyvybingumo neturėtų sumažinti daugiau nei  $45 \% \pm 5 \%$  [97]. Tačiau tuo atveju, kai tiriamosios ND nesukelia citotoksinio poveikio, didžiausia rekomenduojama ND koncentracija neturėtų būti didesnė nei  $100 \mu\text{g/mL}$ . Taip išvengiama didelių ND aglomeracijos dinamikos pokyčių, ir sumažinamas fiziologiškai nereikšmingų dozių naudojimas [100]. Priklausomai nuo pasirinktos ląstelių linijos, ND poveikio laikas gali skirtis, tačiau atliekant mikrobranduolių testą rekomenduojamas poveikio laikas turėtų apimti 1–1,5 ląstelės ciklo [100,104].

Atsižvelgiant į šias rekomendacijas, nanodalelių genotoksiškumo vertinimui reikalingi visapusiški tyrimai, apimantys ne tik nanodalelių fizikocheminių savybių analizę, bet ir optimalių eksperimentinių sąlygų pasirinkimą. Be to, svarbu nuolat tobulinti metodus ir testavimo strategijas, atsižvelgiant į naujausių tyrimų rezultatus.

## 2. MEDŽIAGOS IR METODAI

### 2.1. Tirpalai ir buferiai

Tyrimuose naudoti tirpalai ir jų sudėtinės dalys pateiktos 2.1 lentelėje. Tirpalams, kurių tirpiklis nenurodytas, buvo naudotas dejonizuotas vanduo (diH<sub>2</sub>O).

**2.1 lentelė.** Naudoti tirpalai ir jų sudėtinės dalys

*Table 2.1. Solutions and buffers used in the study*

<b>Tirpalo pavadinimas / Name</b>	<b>Paruošimas / Preparation</b>
Fiksatorius SCM testui / Fixation solution for SCE assay	Metanolis ir ledinė acto rūgštis (3:1) / Methanol and glacial acetic acid
Fiksatorius MB testui / Fixation solution for MN assays	Metanolis ir ledinė acto rūgštis (5:1) / Methanol and glacial acetic acid
0,075 M hipotoninis KCl tirpalas	2,75 g KCl / 500 mL diH <sub>2</sub> O
NMP agarozė – normalios lydymosi temperatūros agarozė (1 %)	1 g agarozės/ 100 mL diH <sub>2</sub> O
LMP agarozė – žemos lydymosi temperatūros agarozė (1 %)	0,5 g agarozės/ 50 mL PBS
<u>Lizės / Lysis buferis, pH 10*</u> NaCl Na <sub>2</sub> EDTA Tris HCl DMSO** Triton X – 100**	145 g/L 37,2 g/L 1,58 g/ 111,11 mL/L 11,11 mL/L
<u>Neutralizacijos / Neutralization buferis pH 7,5*</u> Tris HCl	63,03 g/L
<u>Šarminis / Alkaline buferis, pH &gt; 13</u> Na <sub>2</sub> EDTA NaOH	0,367 g/L 12 g/L
Akridino oranžo ir etidžio bromido (AO / EB) dažų mišinys	1 μL AO (5 mg/mL) ir 1 μL EB (3 mg/mL) / 1 mL PBS

\* pH matuotas Adwa AD 1020 matuokliu; nurodytą pH reikšmę pasiekti naudotas 20 % NaOH tirpalas.

\*\* pridedama prieš pat buferio naudojimą

## 2.2 Tyrimo objektas

Šiame darbe tyrimai atlikti su 11 skirtingų nanodalelių tipų (2.2 lentelė). Tyrimuose naudotos 10–30 nm dydžio kobalto (II, III) oksido nanodalelės ( $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$ ) įsigytos iš US Research Nanomaterials, Inc. (JAV). Gamintojo teigimu, pirminis nanodalelių dydis – 10–30 nm, grynumas – 99 %, specifinis paviršiaus plotas – 50–150  $\text{m}^2/\text{g}$ . <50 nm dydžio kobalto (II, III) oksido nanodalelės ( $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$ ) įsigytos iš Sigma Aldrich, Inc. (JAV). Gamintojo teigimu, pirminis nanodalelių dydis – <50 nm, grynumas – 99,5 %, specifinis paviršiaus plotas – 40–70  $\text{m}^2/\text{g}$ .

Aukso nanodalelės (Au-ND) įsigytos iš Sigma-Aldrich, Inc. (JAV). Tyrimuose buvo naudotos trijų dydžių Au-ND. Gamintojo teigimu, tai buvo 5 nm sferos, 40 nm sferos ir 10 nm nanovamzdeliai, stabilizuoti citratiniame buferyje. Citotoksiškumo tyrimų metu nustatyta, kad 10 nm aukso nanovamzdeliai turėjo citotoksišką poveikį. Visos tirtosios nanodalelių koncentracijos (0,25–7,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) sumažino ŽPKVL gyvybingumą iki 0 %, nepriklausomai nuo inkubacijos laiko (3 arba 24 val.), todėl tolimesni tyrimai su 10 nm dydžio aukso nanovamzdeliais nebuvo tęsiami.

Aluminio oksido nanodalelės ( $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$ ) ir silicio dioksido nanodalelės ( $\text{SiO}_2\text{-ND}$ ) taip pat įsigytos iš Sigma-Aldrich, Inc. (JAV). Tyrimuose buvo naudojamos dviejų dydžių  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$ . Gamintojo teigimu, 13 nm dydžio dalelės, grynumas – 99,8 % ir <50 nm dydžio  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$ ; ir vieno dydžio  $\text{SiO}_2\text{-ND}$  – gamintojo teigimu, tai 10–20 nm dydžio ND, grynumas – 99,5 %.

Polistireno nanodalelės įsigytos iš Spherotec, Inc. (JAV). Gamintojo teigimu, nanodalelės yra taisyklingos sferos formos, o vidutinis nanodalelių dydis tirpale – 80 nm.

Taip pat tyrimuose naudotos dviejų skirtingų dydžių, polivinilpirolidonu (PVP) dengtos sidabro nanodalelės (PVP-Ag-ND), gautos iš UAB Rho Nano įmonės. Gamintojo teigimu, nanodalelės yra 13 nm ir 35 nm dydžio. Citotoksiškumo tyrimų metu nustatyta, kad 13 nm PVP-Ag-ND pasižymėjo citotoksišku poveikiu ŽPKVL. Beveik

visos tirtosios 13 nm dydžio Ag-ND koncentracijos (10 – 100 µg/ml) po 1 val. inkubacijos ląstelių gyvybingumą sumažino daugiau nei 30 % (iki ≤57,5 %), o po 24 val. inkubacijos, gyvų ląstelių nebuvo rasta nei viename iš mėginių (S4 priedų lentelė). Dėl šios priežasties, tolimesni tyrimai su šiomis nanodalelėmis nebuvo atliekami.

**2.2 lentelė.** Tyrime naudotos nanodalelės ir jų savybės.

*Table 2.2. List of nanoparticles used in the study*

<b>Pavadinimas / Name</b>	<b>Dydis * / Size (nm)</b>	<b>Forma / Shape</b>	<b>Gamintojas / Manufacturer</b>	<b>CAS Nr. / CAS No.</b>	<b>Kat. Nr. / Cat. No.</b>
<b>Kobalto oksido (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ND</b>	10–30	Sfera / <i>Sphere</i>	US Research Nanomaterials Inc. (JAV)	1308-06-1	3056
<b>Kobalto oksido (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ND</b>	<50	Sfera / <i>Sphere</i>	Sigma-Aldrich (JAV)	-	637025
<b>Sidabro (Ag) ND</b>	35	Sfera / <i>Sphere</i>	UAB Rho Nano (LT)	-	-
<b>Sidabro (Ag) ND</b>	13	Sfera / <i>Sphere</i>	UAB Rho Nano (LT)	-	-
<b>Aukso (Au) ND</b>	40	Sfera / <i>Sphere</i>	Sigma-Aldrich (JAV)	-	753637
<b>Aukso (Au) ND</b>	5	Sfera / <i>Sphere</i>	Sigma-Aldrich (JAV)	-	741949
<b>Aukso (Au) ND</b>	10	Vamzdeliai / <i>Rods</i>	Sigma-Aldrich (JAV)	-	716820
<b>Aliuminio oksido (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ND</b>	13	Sfera / <i>Sphere</i>	Sigma-Aldrich (JAV)	1344-28-1	718475
<b>Aliuminio oksido (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ND</b>	<50	Sfera / <i>Sphere</i>	Sigma-Aldrich (JAV)	1344-28-1	544833
<b>Silicio dioksido (SiO<sub>2</sub>) ND</b>	10–20	Sfera / <i>Sphere</i>	Sigma-Aldrich (JAV)	7631-86-9	637238
<b>Polistireno (PS) ND</b>	80	Sfera / <i>Sphere</i>	Spherotec Inc. (JAV)	-	PP-008-10

\* gamintojo nurodytas pirminis ND dydis / *Primary size provided by the manufacturer*

Prieš kiekvieną tyrimą ruošiamos naujos nanodalelių suspensijos. Šarminiam Kometos testui paruošiamos 0,1 % nanodalelių suspensijos, o citogenetiniams testams (mikrobranduolių, seserinių chromatidžių mainų ir chromosomų aberacijų testams) naudojamos 0,5 % nanodalelių suspensijos. Kobalto oksido nanodalelių suspensijos ruošiamos 0,9 % NaCl tirpale (B. Braun, Melsungen, Vokietija), sidabro nanodalelių – 0,2 % PVP K30 tirpale (Boai NKY Pharmaceuticals, Kinija), aliuminio oksido, silicio dioksido ir polistireno nanodalelių – ląstelių mitybinėje terpėje RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Co., JAV). Aukso nanodalelės įsigytos jau paruoštos baziniame koloidiniame tirpale (angl. *stock solution*), kuris nebuvo skiedžiamas.

Kadangi nanodalelės yra linkusios aglomeruoti, prieš kiekvieną tyrimą nanodalelių tirpalas homogenizuojamas 25–30 minučių 35 kHz dažnio bangomis ultragarsiniu homogenizatoriumi Bandelin sonorex digital (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Vokietija) sonikatoriumi.

### 2.3 Kraujo donoriai

Tyrimuose naudotas sveikų, nerūkančių donorų (2.3 lentelė) periferinis kraujas, paimtas iš alkūninės venos į specialių mėgintuvėlių su ličio heparinu (Vacuteiner®, Beliver Industrial Estate, JK) gavus donorų sutikimą.

**1.3 lentelė.** Tyrime dalyvavusių donorų lytis ir amžius

**Table 2.3. Demographic Characteristics of Donors (Age and Gender)**

Donorų ID / <i>Donors ID</i>	Lytis / <i>Gender</i>	Amžius / <i>Age</i>
D1	Vyras / <i>Male</i>	36
D2	Moteris / <i>Female</i>	29
D3	Vyras / <i>Male</i>	36
D4	Moteris / <i>Female</i>	42
D5	Moteris / <i>Female</i>	22
D6	Moteris / <i>Female</i>	22
D7	Moteris / <i>Female</i>	22
D8	Vyras / <i>Male</i>	22
D9	Vyras / <i>Male</i>	26

Nanodalelių genotoksiškumo įvertinimui mikrobranduolių ir seserinių chromatidžių mainų testais naudotas visas surinktas periferinis kraujas, o nanodalelių patekimo į ląstelę analizei, ROS indukcijai, citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimams kometas testu naudotos iš periferinio kraujo išskirtos vienbranduolės ląstelės (limfocitai ir monocitai).

## 2.4 Darbo metodai

### 2.4.1 Periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių išskyrimas

Periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės (PKVL) išskiriamos iš periferinio kraujo (PK) panaudojant ląstelių frakcionavimo mišinį Lymphoprep™ (Axis-Shield, Norvegija) arba Ficoll Paque (Cytiva CO., Švedija). Surinktas kraujas išpilstomas į centrifugos mėgintuvėlius ir į kiekvieną iš jų papildomai įpilama mitybinės ląstelių terpės RPMI 1640. Vėliau stikline Pastero pipete į kiekvieno mėgintuvėlio, su kraujo mišiniu dugną atsargiai supilama ląstelių frakcionavimo mišinio. Kraujo, ląstelių mitybinės terpės ir frakcionavimo mišinio santykis – 1:1:1. Mėginiai centrifuguojami 20 min.  $800 \times g$  greičiu (centrifuga Eppendorf5702). Po centrifugavimo limfocitai, monocitai ir trombocitai kaupiasi mėgintuvėlio viršuje, nes jų tankis yra mažesnis negu naudojamo frakcionavimo mišinio. Eritrocitų ir granulocitų tankis yra didesnis negu frakcionavimo mišinio, dėl to jie nusėda mėgintuvėlio apačioje [105] (2.1 pav.).



**2.1 pav.** Žmogaus periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių (ŽPKVL) išskyrimo schema, panaudojant limfocitų frakcionavimo mišinį. Sukurta naudojant Biorender.com

**Fig. 2.1.** A schematic of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) isolation using a density gradient medium. Created with Biorender.com

Atsiskyres vienbranduolių ląstelių tarp sluoksnis atsargiai surenkamas pastero pipete ir perpilamas į naują, sterilų mėgintuvėlį. Surinktų ląstelių mėginiai praskiedžiami RPMI 1640 mitybine terpe ir centrifuguojami 10 min. 800 × g greičiu. Supernatantas nusiurbiamas virš ląstelių paliekant apie 0,5 mL terpės. Nuosėdos švelniai suplakamos ir vieno donoro ląstelės surenkamos į bendrą mėgintuvėlį.

#### 2.4.2 Ląstelių optinio tankio skaičiavimas

Prieš ląsteles veikiant tiriamąją medžiagą, hemocitometru tikrinamas ląstelių optinis tankis. Abi hemocitometro kameros užliejamos po 10 μL ląstelių suspensijos. Ląstelių skaičius skaičiuojamas visuose hemocitometro didžiuosiuose kvadratuose, vaizdą 100 kartų padidinus OLYMPUS CX41 šviesiniu mikroskopu.

Ląstelių tankis viename suspensijos mililitre apskaičiuojamas pagal formulę [106]:

$$\text{Ląstelių koncentracija} = \frac{(\text{Ląstelių skaičius} / 2)}{0,9} \times 100$$

Optimalus pasirinktas ląstelių optinis tankis nanodalelių patekimo į ląstelę analizei, ROS indukavimo tyrimams ir DNR pažeidimų įvertinimui Kometos testu – 1–2 × 10<sup>5</sup> / mL terpės. Esant per dideliame ląstelių tankiui, suspensija papildomai praskiedžiama ląstelių mitybine terpe.

#### 2.4.3 Nanodalelių charakterizavimas

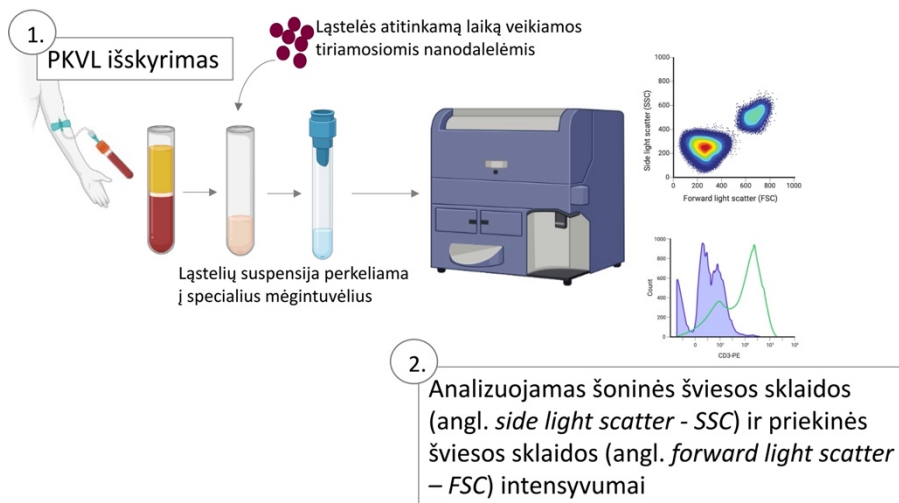
Kobalto oksido nanodalelių dydis ir forma 0,9 % NaCl tirpale įvertinti transmisiniu elektroniniu mikroskopu (TEM). Nanodalelių suspensija perkeliama ant 400 vietų formvaru dengtų varinių tinklelių (Agar Scientific, Stansted, UK). Mėginiai 2 minutes dažyti 2 % vandeniniu uranilo acetato tirpalu. Vėliau mėginiai analizuojami Morgagni-268 elektroniniu mikroskopu (FEI, Eindhoven, Netherlands), veikiančiu 90 kV. Analizė atlikta VU Biotechnologijos institute, Eukariotų genų inžinerijos skyriuje padedant dr. Justui Lazutkai.



Visų tiriamųjų nanodalelių hidrodinaminis dydis ir aglomeracijos lygis vandenyje ir (arba) tirpiklyje ir ląstelių mitybinėje terpėje RPMI 1640 įvertintas panaudojant nanodalelių sekimo analizės metodą (angl. *nanoparticle tracking analysis* – NTA), NanoSight LM10 analizatoriumi (Malvern Panalytical Ltd, JK). Gauti duomenys apdoroti NanoSight TA 3.1 programa. Matavimai atlikti iškart po nanodalelių suspensijos ultragarsinio dispergavimo (0 val.), praėjus 1 arba 3 ir 24 valandų inkubacijai ląstelių mitybinėje terpėje. Analizė atlikta VU Biotechnologijos institute, Eukariotų genų inžinerijos skyriuje padedant Andriui Burduliui.

#### 2.4.4 Nanodalelių patekimo į ląstelę analizė

Tiriamųjų nanodalelių patekimas į žmogaus periferinio kraujo limfocitus įvertintas tėkmės citometrijos šviesos išsklaidymo metodu (2.2 pav.), remiantis Suzuki ir kt. [107] protokolu.



**2.2 pav.** Nanodalelių patekimo į ląstelę tyrimo schema. Sukurta naudojant Biorender.com

**Fig. 2.2.** Schematic of nanoparticle uptake analysis. Created with Biorender.com

Patikrinus ląstelių tankį, ląstelių suspensijos išpilstomos į mėgintuvėlius po 1 mL ir 24 valandas veikiamos (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) pasirinktomis nanodalelių koncentracijomis (2.4 lentelė).

**2.4 lentelė.** Nanodalelių patekimo į ląsteles ir ROS tyrimuose naudotos ND koncentracijos

*Table 2.4. Nanoparticle concentrations used in studies of nanoparticle uptake by cells and ROS induction*

<b>Nanodalelės / Nanoparticles</b>	<b>Tirtos ND koncentracijos (µg/mL) / Concentrations tested (µg/mL)</b>
<b>10–30 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND</b>	40, 80, 160
<b>&lt;50 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND</b>	40, 80, 160
<b>35 nm PVP-Ag-ND</b>	10, 20, 50
<b>40 nm Au-ND</b>	2, 2,5, 4,5
<b>5 nm Au-ND</b>	2, 2,5, 4,5
<b>13 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND</b>	40, 80, 100, 160
<b>50 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND</b>	40, 80, 100, 160
<b>10–20 nm SiO<sub>2</sub>-ND</b>	40, 80, 100, 160
<b>80 nm PS-ND</b>	10, 50, 100, 500

Po inkubacijos ląstelės išimamos iš inkubatoriaus ir centrifuguojamos 10 min. 800× g greičiu. Supernatantas nusiurbiamas, o likusios nuosėdos resuspenduojamos 0,5 mL šviežios mitybinės terpės RPMI 1640. Paruošta ląstelių suspensija perkeliama į tėkmės citometro kiuvetę, ir išmatuojamas šoninės atspindėtos šviesos (angl. *side light scatter* – SSC) intensyvumas, parodantis ląstelės granuliuotumą, kuris yra proporcingas nanodalelių patekimui į ląstelę [107]. Kiekvieno matavimo metu analizuota po 10 000 ląstelių, gauti duomenys apdoroti internetine Floreada.io programa. SSC intensyvumas nanodalelėmis paveiktuose mėginiuose lygintas su neigiamos kontrolės mėginių SSC intensyvumu.

#### 2.4.5 Reaktyviųjų deguonies formų generavimo analizė

Vienas iš mechanizmų, kaip nanodalelės gali sukelti DNR pažeidimus, yra dėl per didelio reaktyviųjų deguonies formų (angl. *reactive oxygen species* – ROS) generavimo [87]. Šiame darbe ROS indukcija žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse buvo įvertinta, panaudojant ląstelių membranoms pralaidų 2'7'-dichlorodihidrofluoresceino diecetatą (H<sub>2</sub>DCF-DA) (Abcam, JK). Viduląstelinis ROS indukuoja H<sub>2</sub>DCF-DA konversiją į ląstelei

nepralaidų žalią fluorescencinį produktą, kuris gali būti kiekybiškai įvertintas tėkmės citometru, FITC kanale (sužadinimas vyksta esant 488 nm bangos ilgiui, o emisija – 519 nm) [108].

ROS vertinimui, ląstelės buvo paruošiamos taip pat, kaip aprašyta 2.2.7 skyriuje, tik po centrifugavimo ląstelės dažomos 20  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>DCFDA. Su dažu mėginiai inkubuojami 30 minučių (37 °C temperatūroje, 5 % CO<sub>2</sub>) ir iškart analizuojami tėkmės citometru. Kiekvieno matavimo metu analizuota po 10 000 ląstelių, gauti duomenys apdoroti internetine Floreada.io programa.

#### 2.4.6 Šarminis Kometų testas

Nanodalelių indukuojamas pirminių DNR pažeidimų kiekis buvo įvertintas šarminiu kometos metodu, remiantis Singh ir kt. [109], su keliomis modifikacijomis.

Po periferinio kraujo vienbranduolių ląstelių išskyrimo patikrinamas ląstelių tankis. Pasiekus optimalų ląstelių skaičių, ląstelių suspensija išpilstoma į mėgintuvėlius po 1 mL ir veikiama skirtingomis nanodalelių koncentracijomis 1 arba 3 ir 24 valandas, 37 °C temperatūroje, 5 % CO<sub>2</sub> (2.5 lentelė). Poveikio laikas pasirinktas, remiantis Dusinska et al. tyrimų rekomendacijomis [104]. Teigiamai kontrolei naudojamas mitybine terpe skiestas 3 % vandenilio peroksido tirpalas, kurio galutinė koncentracija ląstelių suspensijoje – 0,25  $\mu\text{g/mL}$  (Gemi, Przedsiębiorstwo Produkcji Farmaceutycznej, Lenkija). Neigiamos kontrolės mėginyje, jokia papildoma medžiaga nebuvo įvedama.

**2.5 lentelė** Šarminio Kometos tyrimo metu naudotos nanodalelių koncentracijos ir tiriamųjų donorų ID

**Table 2.5.** Nanoparticle concentrations used in the alkaline comet assay and the IDs of the study donors

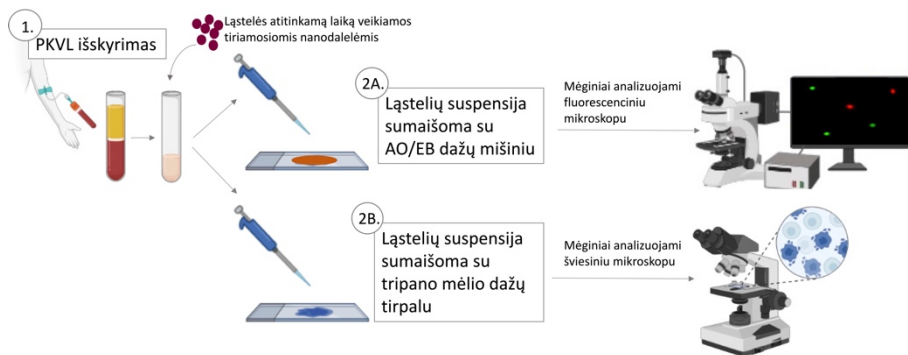
Nanodalelės / Nanoparticles	Tirtųjų ND koncentracijos ( $\mu\text{g/mL}$ ) / Nanoparticle concentrations		Donorų ID / Donors ID
	Trumpalaikė Inkubacija / <i>Short-term incubation</i>  (1 arba 3 val.)	Ilgalaikė Inkubacija / <i>Long- term incubation</i>  (24 val.)	
<b>10–30 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND</b>	20, 40, 60, 80	20, 40, 60, 80	D1, D2, D3, D4, D5
<b>&lt;50 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND</b>	20, 40, 60, 80	20, 40, 60, 80	D1, D2, D3, D4, D5
<b>35 nm PVP-Ag-ND</b>	5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100	5, 10, 15, 20, 30	D2, D3, D6, D7, D9
<b>40 nm Au-ND</b>	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 4,5	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 4,5	D2, D6, D7, D8, D9
<b>5 nm Au-ND</b>	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 4,5, 7,5	0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 4,5, 7,5	D2, D6, D7, D8, D9
<b>13 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND</b>	5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100	5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100	D2, D6, D7, D8, D9
<b>50 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND</b>	5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100	5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100	D2, D6, D7, D8, D9
<b>10–20 nm SiO<sub>2</sub>-ND</b>	10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500	10, 20, 40, 60, 80, 100, 150, 200, 250, 300	D2, D3, D6, D7, D9
<b>80 nm PS-ND</b>	15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100	15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100	D2, D6, D7, D8, D9

Praėjus inkubacijos laikui, ląstelės centrifuguojamos 10 min.  $800 \times g$  greičiu. Supernatantas nusiurbiamas, o likusios nuosėdos resuspenduojamos 1 mL šviežios ląstelių mitybinės terpės RPMI 1640. Tokia ląstelių suspensija toliau naudojama nanodalelių citotoksiškumo tyrimui ir pirminių DNR pažeidimų analizei šarminiu kometos testu. Iš viso atliekami 5 tyrimų pakartojimai, panaudojant skirtingų donorų kraują (2.5 lentelė).

*Nanodalelių citotoksiškumo analizė*

Nanodalelių citotoksiškumo įvertinimas, kaip sudėtinė kometos testo dalis, buvo atliekamas kiekvieno tyrimo metu,

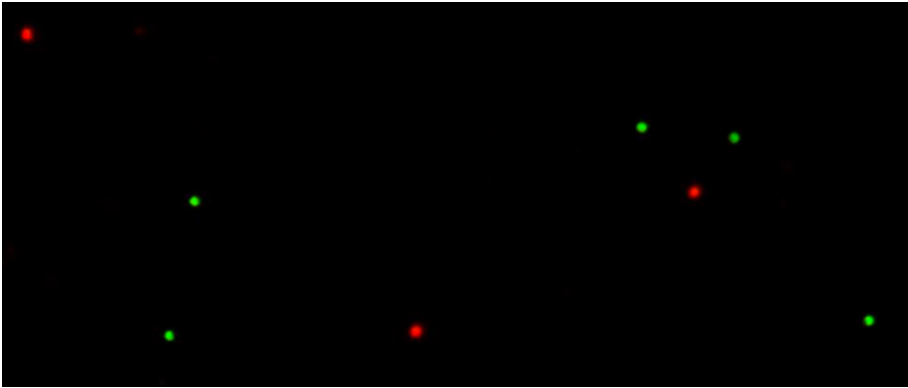
panaudojant vieną iš dviejų arba abu metodus (abu metodai buvo naudojami tuo atveju, jeigu vieno iš jų metu gauti rezultatai parodė, kad tiriamosios ND yra citotoksiškos): ląsteles dažant (A) akridino oranžo / etidžio bromido (*Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija*) – (AO/EB) dažų mišiniu arba (B) tripano mėlio dažais (*Sigma-Aldrich Co., JAV*) (2.3 pav.). Abu metodai paremti dažų patekimu į ląsteles, kurių membranų integralumas yra pažeistas. Skirtingomis nanodalelių koncentracijomis (2.5 lentelė) paveiktų ląstelių gyvybingumas palygintas su neigiama arba tirpiklio kontrole (jei tokia buvo naudota).



**2.3 pav.** Ląstelių gyvybingumo tyrimų schema. A – tyrimas naudojant AO / EB dažų mišinį; B – tyrimas naudojant tripano mėlio dažus. Sukurta naudojant Biorender.com

**Fig. 2.3** Scheme of cell viability assays. A – assay using dual AO/EB staining technique; B – using trypan blue exclusion test. Created with Biorender.com

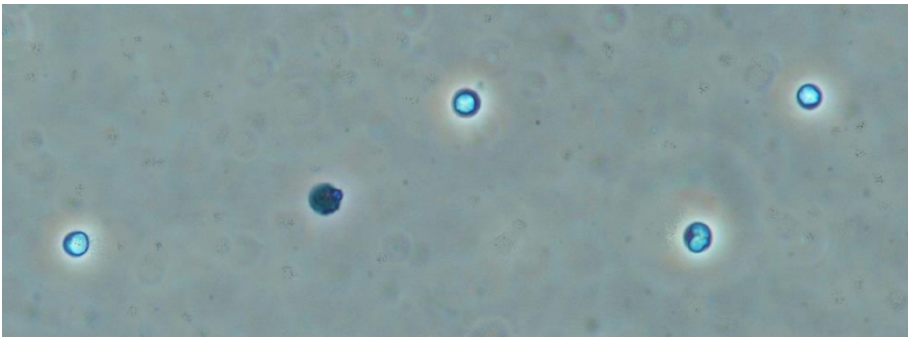
Remiantis Liu ir kt. [110], ant objektinio stiklelio užlašinama 10  $\mu$ L ląstelių suspensijos ir 2  $\mu$ L su DNR besijungiančio dažų mišinio (AO / EB). Viskas sumaišoma pipetuojant ir uždengiama dengiamuoju stikleliu. Mikroskopinė analizė vykdoma naudojant epifluorescencinį Nikon Eclipse 80i (Nikon, Japonija) mikroskopą, bendrąjį filtrą (330–560 nm), vaizdą padidinus 400 kartų. Suskaičiuojamos gyvos (žalios spalvos) ir negyvos (raudonos spalvos) ląstelės (2.4 pav.).



**2.4 pav.** Ląstelių gyvybingumo analizė panaudojant akridino oranžo/ etidžio bromido dažų mišinį. Įvertinamas gyvų (žalia spalva) ir negyvų (raudona spalva) ląstelių skaičius. Originali mikrofotografija

*Fig. 2.4. Cell viability assessment, using a dual AO/EB staining technique. The number of live (green) and dead (red) cells is assessed. Original microphotography*

Remiantis Strober [111], ant objektinio stiklelio užlašinama 10  $\mu$ L ląstelių suspensijos ir 10  $\mu$ L 0,4 % tripano mėlio dažų vandeninio tirpalo. Toks mišinys papipetuojamas, uždengiamas dengiamuoju stikleliu ir 30 s. palaikomas kambario temperatūroje. Analizė atliekama Nikon ECLIPSE Ti-S šviesiniu mikroskopu, vaizdą padidinus 400 kartų. Skaičiuojamos gyvos (šviesios, nenusidažiusios) ir negyvos (tamsiai mėlynos, nusidažiusios) ląstelės (2.5 pav.).



**2.5 pav.** Ląstelių gyvybingumo analizė panaudojant tripano mėlio dažų tirpalą. Įvertinamas gyvų (šviesios spalvos) ir negyvų (tamsiai mėlynos spalvos) ląstelių skaičius. Originali mikrofotografija

*Fig. 2.5. Cell viability assessment, using a trypan blue exclusion test. The number of live (bright) and dead (dark) cells is assessed. Original microphotography*

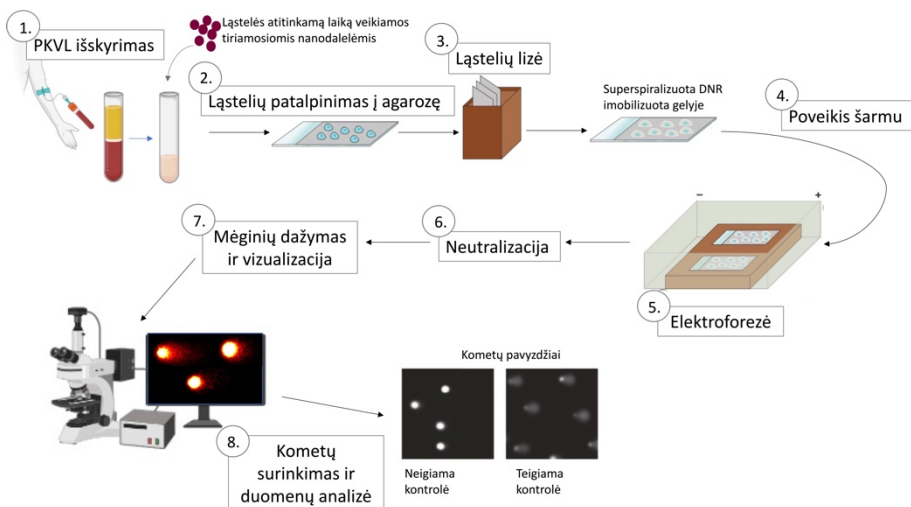
Naudojant vieną iš metodų analizuojami visi tiriamieji mėginiai. Iš kiekvieno mėginio surenkama ne mažiau 100 ląstelių ir apskaičiuojamas procentinis gyvybingų ir negyvybingų ląstelių skaičius, remiantis formule [112]:

$$\% \text{ gyvybingos ląstelės} = \frac{\text{gyvų ląstelių skaičius}}{\text{bendras ląstelių skaičius}} \times 100$$

### *Kometos testo eiga*

Dieną prieš atliekant tyrimą, objektiniai stikleliai su nušlifuoti kraštais padengiami 1 % normalios lydymosi temperatūros (angl. *normal melting point* (NMP)) agarozė (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija) ir paliekami sustingti horizontalioje pozicijoje. Taip pat paruošiami reikalingi buferiai: lizės, neutralizacijos ir šarminis (2.1 lentelė).

Tyrimo dieną išlydoma 1 % žemos lydymosi temperatūros (angl. *low melting point* (LMP)) agarozė (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija), naudojant Eppendorf Thermomixer comfort termomaišytuvą. Ant iš vakaro paruoštų objektinių stiklelių užlašinama 40 µL išlydytos 1 % LMP agarozės ir 40 µL tiriamosios ląstelių suspensijos (galutinė agarozės koncentracija – 0,5 %). Mišinys sumaišomas pipetuoiant ir uždengiamas dengiamaisiais stikleliais (2.6 pav., 2). Procedūra su tuo pačiu mėginiu pakartojama: ant vieno objekcinio stiklelio paruošiami du identiški agarozės su įterptomis ląstelėmis, kvadratėliai. Iš kiekvieno jų vėliau analizuojama po 50 ląstelių (vienam tiriamajam mėginiui iš viso surenkama po 100 ląstelių). Paruošti mikroskopiniai stikleliai su į agarozę įterptomis ląstelėmis 10 min. laikomi šaldytuve, 4 °C temperatūroje.



**2.6 pav.** Šarminio Kometos tyrimo schema. Modifikuota pagal Moller ir kt. [113]

*Fig. 2.6. Schematic of an alkaline comet assay. Modified, according to Moller et al.*

Sustingus agarozei, dengiamieji stikleliai nuimami nuo visų mėginių ir preparatai įdedami į vonelę su atšaldytu lizės buferiu (2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris HCl (Carl Roth GmbH+Co. KG, Vokietija), pH 10). 1% Triton X-100 (Carl Roth GmbH+Co. KG, Vokietija) ir 10 % DMSO (Sigma-Aldrich Co., JAV) pridedama prieš buferio naudojimą). Šios procedūros metu denatūruojamos ląstelių membranos, įvairūs baltymai ir lieka tik agarozės gelyje imobilizuota superspiralizuota DNR. Poveikis lizės buferiu vykdomas 90 min., 4 °C temperatūroje (2.6 pav., 3).

Pasibaigus lizės procedūrai, stikleliai perkeliama į iki 5 °C temperatūros atšaldytą elektroforezės vonelę COMET – 20 SYSTEM (Scie Plas, Jungtinė Karalystė) ir užpilami 540 mL iki 4 °C temperatūros atšaldytu šarminiu buferiu (1 mM Na<sub>2</sub>EDTA ir 300 mM NaOH (Carl Roth GmbH+Co. KG, Vokietija), pH ≥ 13). Šiame buferyje mėginiai laikomi 20 min., kad įvyktų šarmui jautrių vietų, t.y. viengrandinių DNR trūkių, apurininųjų ir apirimidininųjų vietų, hidrolizė iki dvigrandinių DNR trūkių (2.6 pav., 4). Praėjus 20 min.



įjungtas elektros srovės šaltinis ir 30 min. vykdyta elektroforezė ( $\approx 1$  V/cm) (2.6 pav., 5).

Po elektroforezės mėginiai nedelsiant perkelti į indą su atšaldytu neutralizacijos tirpalu (0,4 M Tris HCl (Carl Roth GmbH+Co. KG, Vokietija), pH 7,5) ir laikyti šaldytuve, 4 °C temperatūroje 30 min. (2.6 pav., 6)

Po neutralizacijos procedūros mėginiai dažomi su į DNR interkalijuojančiu dažu – etidžio bromidu (2.6 pav., 7). Dažymas vykdomas tamsoje. Ant kiekvieno agarozės su ląstelėmis kvadratėlio pilama po 80  $\mu$ L etidžio bromido dažo, tokie mėginiai 5 min. paliekami tamsoje, kambario temperatūroje. Vėliau stikleliai 5 min. pamerkiami į distiliuoto vandens vonelę, kad nusiplautų dažo perteklius. Po plovimo mėginiai uždengiami dengiamaisiais stikleliais ir laikomi tamsoje, šaldytuve 4 °C temperatūroje iki analizės.

Mėginių analizė atliekama naudojant epifluorescentinį Nikon Eclipse 80i mikroskopą (Nikon, Japonija), vaizdas padidinamas 400 kartų ir naudojamas 3 filtras (510–560 nm) (2.6 pav., 8). Kometų analizė atliekama naudojant programą LUCIA (Čekija). Kiekviename mėginyje išanalizuojama po 100 kometų ir įvertinamas kiekvienoje iš jų, esantis procentinis DNR kiekis kometos galvoje ir uodegoje.

#### 2.4.7 Mikrobranduolių testas

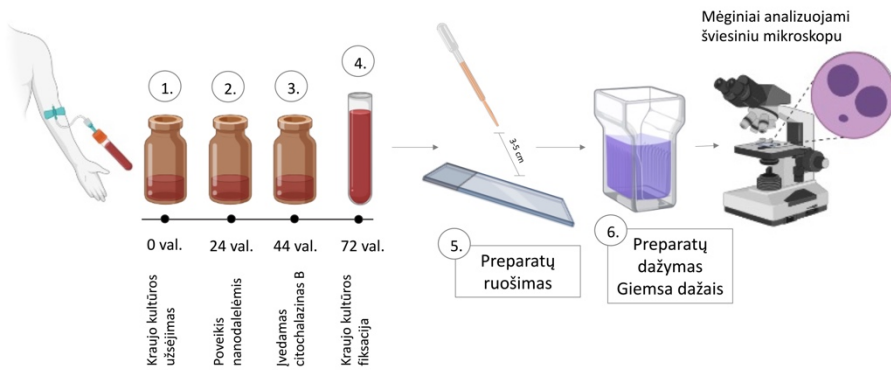
Nanodalelių sukeltos chromosomų pažaidos įvertintos sustabdytos citokinezės mikrobranduolių testu, remiantis OECD rekomendacijomis [97]. Tyrimams naudotas visas donorų periferinis kraujas, paimtas iš donorų alkūnės venos į mėgintuvėlius su ličio heparinu (Vacutainer®, Beliver Industrial Estate, JK). Vieno tipo nanodalelės tirtos trijų skirtingų donorų kraujo mėginiuose (2.6 lentelė).

**2.6 lentelė.** Sustabdytos citokinezės mikrobranduolių testu tirtos naudotos nanodalelių koncentracijos ir tiriamųjų donorų ID

**Table 2.6.** Nanoparticle concentrations used in the micronucleus assay and the IDs of the study donors

Nanodalelės / <i>Nanoparticles</i>	Tirtos ND koncentracijos ( $\mu\text{g/mL}$ ) / <i>Concentrations</i>	Donorų ID / <i>Donor ID</i>
10–30 nm $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$	20, 30, 40, 50, 60	D1, D2, D3
<50 nm $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$	20, 30, 40, 50, 60	D1, D2, D3
35 nm PVP-Ag-ND	5, 15, 20, 30	D2, D7, D9
13 nm $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$	20, 40, 80, 100	D2, D7, D9
50 nm $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$	20, 40, 80, 100	D2, D7, D9
10–20 nm $\text{SiO}_2\text{-ND}$	50, 100, 150, 200	D2, D6, D7
80 nm PS-ND	25, 50, 75, 100, 125	D2, D7, D9

Pirmiausiai paruošiamas ląstelių kultivavimui reikalingas mitybinis mišinys, kurį sudaro 13 dalių ląstelių mitybinė terpė RPMI 1640, 2 dalys embrioninis veršiukų serumas (Sigma-Aldrich Co., JAV), fitohemagliutininas (FHA) (10  $\mu\text{L/mL}$  kultūros) (Biological Industries, Izraelis) ir 1 dalis heparinizuoto kraujo. Mišinys išpilstomas į sterilius buteliukus po 10 mL ir buteliukai uždengiami steriliais guminiais kamšteliais. Kraujo kultūra kultivuojama 72 val. (37 °C temperatūroje, 5 %  $\text{CO}_2$ ) (2.7 pav., 1–4).



**2.7 pav.** Sustabdytos citokinezės mikrobranduolių tyrimo schema. Sukurta naudojant Biorender.com

**Fig. 2.7** A Schematic of micronucleus assay. Created with Biorender.com

Nanodalelių tiriamosios koncentracijos (2.6 lentelė) įvedamos 24-tą ląstelių kultūros augimo valandą. Tyrimuose naudojama teigiama kontrolė – dokсорubicino hidrochloridas (galutinė koncentracija 0,02

µg/mL) (Teva Pharma B.V., Nyderlandai), neigiama kontrolė – tik ląstelių suspensija ir jei buvo naudojama – tirpiklio kontrolė. 44 augimo valandą į kiekvieną buteliuką įlašinama citokinezę stabdančio reagento citochalazino B, kurio galutinė koncentracija yra 6 µg/mL (AppliChem GmbH, Vokietija). Praėjus 72 val. nuo kultivavimo pradžios, kultūra fiksuojama.

Kraujo kultūros fiksacija pradedama mėginius suplakant, perpilant į stiklinius centrifugos mėgintuvėlius ir centrifuguojant 8 min. 400 × g greičiu. Viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbiamas, kiekviename mėgintuvėlyje paliekant ≈1 mL suspensijos. Nuosėdos suplakamos ir resuspenduojamos ≈10 mL 4 °C temperatūros 0,075 M KCl hipotoninio tirpalo (Sigma-Aldrich Co., JAV). Kultūra nedelsiant centrifuguojama 8 min. 400 × g greičiu. Paruošiamas fiksatorius *ex tempore*, sudarytas iš ledinės acto rūgšties (Sigma-Aldrich Co., JAV) ir metanolio (Fluka, Sigma-Aldrich Co., JAV) mišinio (santykiu 1:5). Po centrifugavimo, viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbiamas, paliekant ≈1 mL suspensijos. Pirmą kartą fiksuojant, fiksatorius skiedžiamas 0,9 % NaCl tirpalu (1:1). Nuosėdos resuspenduojamos ir užpilamos nedideliu kiekiu (≈1–2 mL) fiksatoriaus. Suspensija gerai suplakama, ir mėgintuvėlis pilnai užpilamas atskiestu fiksatoriumi (iki 8–10 mL). Kultūra 20 min. laikoma kambario temperatūroje ir po to centrifuguojama 8 min. 400 × g greičiu. Susiformavęs viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbiamas, mėgintuvėliuose paliekant ≈1 mL suspensijos. Fiksavimo procedūra kartojama dar du kartus, naudojant neskiestą fiksatorių ir juo užpilant visą centrifugos mėgintuvėlį. Pasibaigus fiksacijai, mėginiai uždengiami sandarinimo plėvele Parafilm® M (Bemis, JAV) ir laikomi šaldiklyje –20 °C temperatūroje iki kol bus ruošiami preparatai.

Limfocitų preparatų ruošimas prasideda nuo objektinių stiklelių plovimo distiliuotu vandeniu ir atšaldymo distiliuoto vandens vonelėje, –20 °C temperatūroje, kad ant jų susiformuotų ledo kristalų sluoksnis. Tuo metu kraujo kultūra centrifuguojama 8 min. 400 × g greičiu, viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbiamas, paliekant ≈1 mL ląstelių suspensijos. Naudojant Pastero pipetę, nuosėdos suspenduojamos

fiksatoriaus likutyje. 4–5 ląstelių suspensijos lašai lašinami ant nuriebalintų ir atšaldytų objektinių stiklelių, palenktų 20–30° kampu iš 3–5 cm aukščio (2.7 pav., 5). Tokie paruošti stikleliai paliekami horizontalioje pozicijoje džiūti kambario temperatūroje vieną parą.

Preparatų dažymui naudojami atskiesti Giemsa dažai (1 dalis dažų ir 20 dalių distiliuoto vandens) (Sigma-Aldrich Co., JAV). Preparatai 5–10 min. laikomi dažuose, nuplaunami tekančio vandens srove, praskalaujami distiliuotu vandeniu ir paliekami išdžiūti.

Preparatams išdžiūvus, jų analizė atliekama automatizuota vaizdų analizės sistema LUCIA, šviesiniu mikroskopu Nikon Eclipse 90i (Nikon, Japonija), 20× didinančiu objektyvu. Suradus mikrobranduolį, jis tiriamas 100× didinančiu objektyvu su imersiniu aliejumi (Sigma-Aldrich Co., JAV). Įvertinamas mikrobranduolių skaičius ne mažiau nei 1000-yje dvibranduolių ląstelių, vadovaujantis Fenech et al. [114] aprašytais kriterijais.

Taip pat mikroskopu Euromex iScope IS.1152-EPL (Euromex, Nyderlandai), 20× didinančiu objektyvu analizuotas ląstelių proliferacijos indeksas (angl. *cytochalsin blocked proliferation index (CBPI)*) arba branduolio dalijimosi indeksas – BDI, kuris vertina tiriamosios medžiagos įtaką branduolių proliferacijos greičiui. Proliferacijos indeksas analizuotas 500 ląstelių ir apskaičiuotas pagal formulę [97]:

$$CBPI = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3}{n},$$

kur M1, M2 ir M3 žymi, atitinkamai, vienbranduolių, dvibranduolių ir tris arba daugiau branduolių turinčias ląsteles, o n žymi bendrą analizuotų ląstelių skaičių.

#### 2.4.8 Seseinių chromatidžių mainų testas

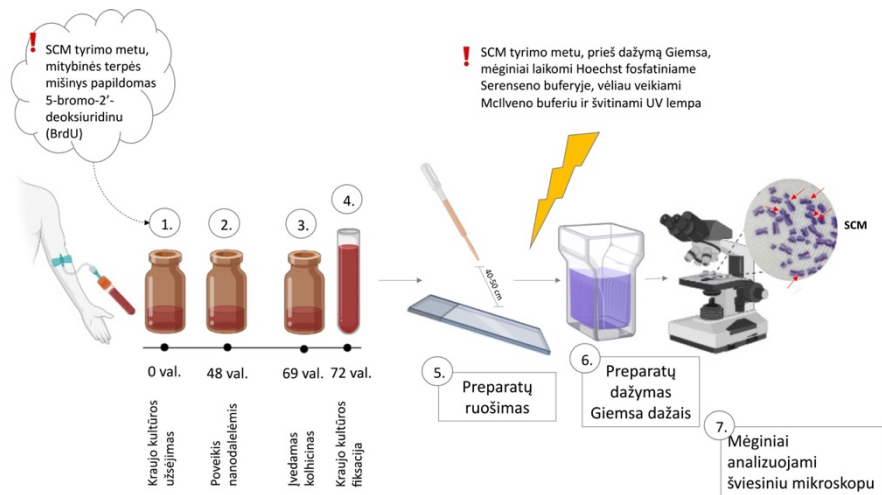
Papildomai Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND sukeltas genotoksiškumas buvo įvertinamas seserinių chromatidžių mainų (SCM) testu. Tyrimams naudotas visas donorų periferinis kraujas (2.7 lentelė).

**2.7 lentelė.** Sesiinių chromatidžių mainų (SCM) testu tirtų nanodalelių koncentracijos ir donorų ID

**Table 2.7.** Nanoparticle concentrations used in the sister chromatid exchange assay and the IDs of the study donors

Nanodalelės / Nanoparticles	Tirtos ND koncentracijos (µg/mL) / Concentrations	Donorų ID / Donor ID
10–30 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ND	20, 30, 40, 50, 60	D2, D3, D4
<50 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ND	20, 30, 40, 50, 60	D2, D3, D4

Kraujo mėginiai imti iš donorų alkūninės venos į mėgintuvėlius su ličio heparinu (Vacutainer®, Beliver Industrial Estate, JK). Paruošiamas ląstelių kultivavimui reikalingas mitybinis mišinys, kurį sudaro 13 dalių ląstelių mitybinės terpės RPMI 1640, 2 dalys embrioninio veršiukų serumo, fitohemagliutinas (FHA) (10 µL/mL kultūros) ir 5-bromo-2'-deoksiuridinas – BrdU (galutinė koncentracija 10 g/mL). Vėliau į mitybinį mišinį įpilama 1 dalis heparinizuoto kraujo, gautas mišinys išpilstomas į sterilius buteliukus po 10 mL ir buteliukai uždengiami steriliais guminiiais kamšteliais. Kraujo kultūra iš viso kultivuojama 72 valandas (37 °C temperatūroje, 5 % CO<sub>2</sub>) (2.8 pav., 1–4).



**2.8 pav.** Sesiinių chromatidžių mainų testo schema. Sukurta naudojant Biorender.com

**Fig. 2.8.** A schematic of the sister chromatid exchange assay Created with Biorender.com

Tiriamosios nanodalelių koncentracijos (2.7 lentelė) į ląstelių kultūrą įvedamos 48-tą kultivavimo valandą (2.8 pav., 1–4). Teigiamai kontrolei buvo naudojamas metil-metansulfonatas (MMS), kurio į mėgintuvėlius įvesta po 0,013  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . Neigiamai kontrolei į mėgintuvėlius nebuvo įnešta jokių papildomų medžiagų. Likus trims valandoms iki kultivavimo pabaigos (69-tą valandą), į buteliukus įvestas kolhicinas (galutinė koncentracija 0,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Praėjus 72 valandoms nuo ląstelių kultivavimo pradžios, kultūra fiksuojama.

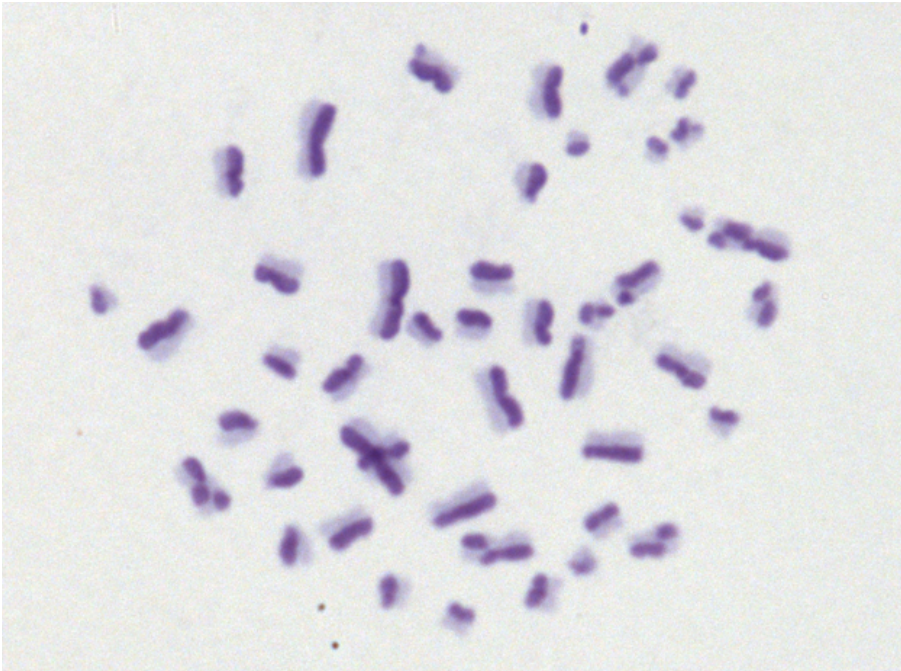
Pasibaigus kultivavimo laikui, kultūra perpilama į centrifugos mėgintuvėlius ir centrifuguojama 10 min. 600  $\times$  g greičiu. Po centrifugavimo viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbiamas, mėgintuvėliuose paliekant apie 1 mL suspensijos. Ant suspensijos užpilama  $\approx$  10 mL 40  $^{\circ}\text{C}$  temperatūros 0,075 M KCl hipotoninio tirpalo. Tokie mėginiai laikomi inkubatoriuje 37  $^{\circ}\text{C}$  temperatūroje 30 min. Po inkubacijos, kraujo kultūra centrifuguojama 10 min. 600  $\times$  g greičiu. Tuo metu, paruošiamas fiksatorius *ex tempore* (acto rūgštis ir metanolio mišinys santykiu 1:3). Po centrifugavimo, viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbiamas, mėgintuvėliuose paliekant apie 1 mL suspensijos. Fiksuojant pirmą kartą nuosėdos užpilamos nedideliu kiekiu (apie 1–2 mL) fiksatoriaus. Suspensija nedelsiant suplakama ir fiksatoriaus pripilama iki mėgintuvėlių viršaus (apie 10 mL). Ląstelės laikomos šaldiklyje – 20  $^{\circ}\text{C}$  temperatūroje 30 min. Po to mėginiai centrifuguojami 10 min. 600  $\times$  g greičiu, o susiformavęs viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbiamas, paliekant apie 1 mL suspensijos. Fiksavimo procedūra kartojama dar du kartus užpilant fiksatorių vienu užpylimu. Pasibaigus fiksacijai, mėginiai uždengti sandarinimo plėvele Parafilm® M ir laikyti šaldiklyje –20  $^{\circ}\text{C}$  temperatūroje iki kol bus ruošiami preparatai.

Chromosomų preparatų ruošimas prasideda objektinių stiklelių plovimu distiliuotu vandeniu ir atšaldymu distiliuoto vandens vonelėje, –20  $^{\circ}\text{C}$  temperatūroje, kad ant jų susiformuotų ledo kristalų sluoksnis. Užfiksuota kraujo kultūra centrifuguojama 10 min. 600  $\times$  g greičiu. Viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbiamas, o nuosėdos suspenduojamos fiksatoriaus likutyje (0,5–1 mL), naudojant Pastero pipetę. Ląstelių

suspensija (4–5 lašai) lašinama ant atšaldytų objektinių stiklelių, palenktų 20–30° kampu, iš 40–50 cm aukščio. Preparatai džiovinti 3–4 kartus pervedant objektinį stiklėlį virš spiritinės lempelės liepsnos ir 24 valandas paliekami baigti džiūti horizontalioje pozicijoje, kambario temperatūroje.

Paruošti preparatai dažomi, naudojant modifikuotą Lazutka [115] metodiką. Pirmiausiai mėginiai 15 min. dažomi Hoechst 33258 (Sigma Chemical Co., JAV) fluorescenciniais dažais (1 mL Hoechst 33258 koncentruoto (100 µg/mL) tirpalo ir 9 mL Serenseno buferio (Riedel-de-Haen, Vokietija)) tamsoje. Tuomet stikleliai nuplaunami distiliuotu vandeniu ir džiovinami. Gaminamas citratinis (McIveno) buferis (pH 8–8,5) iš 0,1 M citrinos rūgšties  $C_3H_4(OH)COOH)_3$  ir iš 0,2 M  $Na_2PO_4$  (Sigma Chemical Co., JAV), atitinkamai: 0,55 mL ir 19,45 mL. Ant preparatų užlašinama po 3 lašus citratinio buferio, mėginiai uždengiami dengiamaisiais stikleliais ir švitinami 14 min. 20 s., 400 W galingumo 32 UV lempa, 20 cm atstumu. Praėjus 5 min. nuo švitinimo pradžios, ties dengiamųjų stiklelių susidūrimais lašinamas citratinis buferis. Tuomet preparatai nuplaunami distiliuotu vandeniu ir paliekami džiūti. Giemsa dažais (1 dalis dažų ir 9 dalys distiliuoto  $H_2O$ ) preparatai dažomi  $\approx 7$  min., po to nuplaunami distiliuotu vandeniu, išdžiovinami ir analizuojami.

Preparatams išdžiūvus, atliekama jų analizė Nikon Eclipse 90i mikroskopu (Nikon, Japonija) vaizdą padidinus 1000×. Analizei renkamos metafazinės plokštelės, turinčios 44–47 chromosomas. SCM skaičiuojami gerai nudažytose, du replikacinius ciklus praėjusiose ląstelėse (2.9 pav.).



**2.9 pav.** Ląstelė po dviejų replikacinių ciklų. Metafazinė plokštelė nudažyta diferencialiniu dažymo metodu (1000×) (aut. mikrofotografija)

*Fig. 2.9. A cell that has undergone two replication cycles. The metaphase plate is stained using the differential staining technique (1000×) (original microphotography)*

Skaičiuojamos mainų vietos tarp šviesiosios ir tamsiosios chromatidžių dalių. Kiekvienai koncentracijai analizuojama po 50 ląstelių, esančių antrajame ląstelės dalijimosi cikle. Apskaičiuojamas vidutinis SCM dažnis vienai ląstelei bei replikacinis indeksas (RI), kuris apibūdina ląstelių dalijimosi greitį tirtoje kultūroje. Kiekvienam variantui analizuojama po 200 metafazinių plokštelių. RI apskaičiuojamas remiantis formule [115,116]:

$$RI = \frac{(1 \times M1) + (2 \times M2) + (3 \times M3)}{n},$$

Kur M1, M2 ir M3 yra metafazinių ląstelių, esančių, atitinkamai, pirmame, antrame, trečiame/ketvirtame ląstelės cikle, skaičių, o n žymi bendrą analizuotų ląstelių skaičių.



#### 2.4.9. Statistinė analizė

Statistiniai metodai buvo naudojami atsižvelgiant į duomenų pobūdį ir reikalingos analizės tipą. Nanodalelių citotoksiškumo tyrimų rezultatai buvo analizuojami t-testu. Genotoksiškumo tyrimų rezultatai buvo vertinami priklausomai nuo naudoto testo: šarminio Kometos testo rezultatų analizei buvo naudojamas Mann Whitney U testas, SCM duomenų analizei – Welch testas (angl. *unequal variances t-test (Welch's)*), o SCMB testo rezultatams – z-testas proporcijoms (angl. *z-test for proportions*) (<http://www.statskingdom.com/>, prisijungta 2024 liepos 24 d.). Kadangi genotoksiškumo tyrimai buvo kartojami kelis kartus, naudojant skirtingų donorų periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles, šių duomenų suvidurkinimas ir tokių verčių naudojimas statistinei analizei lemtų statistinės galios praradimą, todėl kiekvieno atskiro eksperimento p reikšmės buvo sudedamos ir vertinamos naudojant Fišerio kombinuotąjį tikimybių testą [117]. Pirmiausiai, F reikšmė buvo apskaičiuota pagal formulę  $Fp = -2 \sum_{i=1}^n \ln(P_i)$ , kur n žymi eksperimentų skaičių, o  $P_i$  – i eksperimento apskaičiuotąją p reikšmę. Šio testo pasiskirstymas –  $\chi^2$ , kai laisvės laipsnis (angl. *degree of freedom – df*) lygus 2n. Kombinuota p reikšmė apskaičiuota kaip dešinėsios uodegos tikimybė (angl. *right-tail probability*),  $P_{\chi^2(2n)}(F_p > f_p)$ , kur  $f_p$  yra stebima  $F_p$  reikšmė. Siekiant sumažinti pirmojo tipo klaidos tikimybę, kombinuota p reikšmė buvo koreguojama, panaudojant Bonferroni korekciją, kur kiekviena apskaičiuota p reikšmė buvo padauginta iš n. Be to, visuose genotoksiškumo tyrimuose buvo naudojamas Jonckheere-Terpstra tendencijos testas, siekiant įvertinti dozinę priklausomybę, naudojant Real Statistics Resource Pack programinę įrangą [118].

### 3. REZULTATAI

#### 3.1 Nanodalelių charakterizavimas ląstelių mitybinėje terpėje

Visų tiriamųjų nanodalelių hidrodinaminis dydis ir aglomeracijos lygis ląstelių mitybinėje terpėje įvertintas nanodalelių sekimo analizės (angl. *nanoparticle tracking analysis* – *NTA*) metodu, Nanosight analizatoriumi (Nanosight LM10, Malvern Panalytical Ltd., Malvern, JK). Matavimai atlikti iškart po nanodalelių koloidinio tirpalo ultragarsinio dispergavimo t. y. 0 val., praėjus 1 val. arba 3 val. (priekšingai nuo tiriamųjų dalelių) ir praėjus 24 val. po tirpalo ultragarsinio dispergavimo. Matavimų metu fiksuotas didžiausias matomas pikas, žymintis didžiausią kiekį tam tikro dydžio dalelių tirpale, ir vidutinis dalelių dydžio pasiskirstymas koloidiniame tirpale (3.1 lentelė). Kai kurių nanodalelių dydis ir forma papildomai įvertintas transmisine elektronine mikroskopija – TEM (10–30 ir <50 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND), o hidrodinaminis dydis ir dalelių stabilumas koloidiniame tirpale papildomai įvertintas dinaminės šviesos sklaidos (angl. *dynamic light scattering* – DLS) metodu, Nanosizer analizatoriumi (35 nm PVP-Ag, 5 ir 40 nm Au-ND).

**3.1 lentelė.** Nanodalelių hidrodinaminio dydžio analizė ląstelių mitybinėje terpėje RPMI 1640 Nanosight analizatoriumi laike, praėjus 0, 1 arba 3 ir 24 val. po sonikavimo. SN – standartinis nuokrypis automatiškai apskaičiuotas Nanosight analizatoriaus

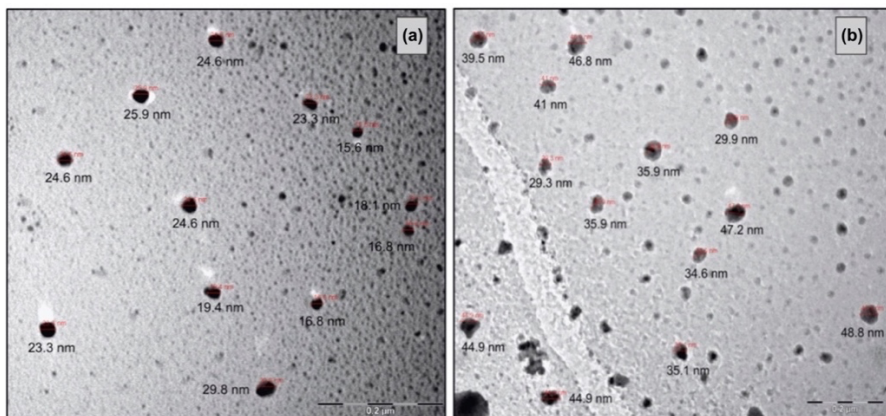
**Table 3.1.** Analysis of the hydrodynamic size of nanoparticles in RPMI 1640 cell culture medium using Nanosight analyzer over time, at 0, 1 or 3, and 24 h after sonication. SD – standart deviation automatically calculated by the Nanosight analyzer

Pirminis ND dydis, (nm) / Primary size of NPs (nm)	Laikas po ultragarsinio dispergavimo (val.) / Time after sonication, h	Didžiausias pikas (nm) / Highest peak, nm	Vidutinis ND dydis tirpale (nm) ir SN / Average NP size in the solution, nm (SD)
10–30 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ND	0	17	77 (59)
10–30 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ND	1	14	94,5 (75)
10–30 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ND	24	52/88	82,8 (43)
<50 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ND	0	86	153,6 (79)
<50 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ND	1	83	132,2 (67)
<50 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ND	24	56	90,2 (71)

3.1 lentelė. Tęsinys  
 Table 3.1. Continued

<b>Pirminis ND dydis, (nm) / Primary size of NPs (nm)</b>	<b>Laikas po ultragarsinio dispergavimo (val.) / Time after sonication, h</b>	<b>Didžiausias pikas (nm) / Highest peak, nm</b>	<b>Vidutinis ND dydis tirpale (nm) ir SN / Average NP size in the solution, nm (SD)</b>
<b>35 nm PVP-Ag-ND</b>	0	115	138,5 (66,8)
<b>35 nm PVP-Ag-ND</b>	1	98	205,8 (103,7)
<b>35 nm PVP-Ag-ND</b>	24	103	205,7 (90,6)
<b>5 nm Au-ND</b>	0	66	106,4 (63,4)
<b>5 nm Au-ND</b>	3	74	167,9 (87,3)
<b>5 nm Au-ND</b>	24	70	124,9 (62,3)
<b>40 nm Au-ND</b>	0	73	122,3 (67,1)
<b>40 nm Au-ND</b>	3	156	170,6 (44,7)
<b>40 nm Au-ND</b>	24	82	90,8 (20,7)
<b>13 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND</b>	0	173	191,4 (80)
<b>13 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND</b>	1	122	254,2 (106,4)
<b>13 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND</b>	24	130	162,2 (78,7)
<b>50 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND</b>	0	109	209,9 (106)
<b>50 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND</b>	1	77	147,8 (87,6)
<b>50 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND</b>	24	74	127,5 (66,1)
<b>10-20 nm SiO<sub>2</sub>-ND</b>	0	335	321,7 (107,7)
<b>10-20 nm SiO<sub>2</sub>-ND</b>	1	147	223,4 (95,8)
<b>10-20 nm SiO<sub>2</sub>-ND</b>	24	390	312,1 (108,7)
<b>80 nm PS-ND</b>	0	79	114,9 (45,9)
<b>80 nm PS-ND</b>	3	105	202 (103,1)
<b>80 nm PS-ND</b>	24	17	47,5 (34,1)

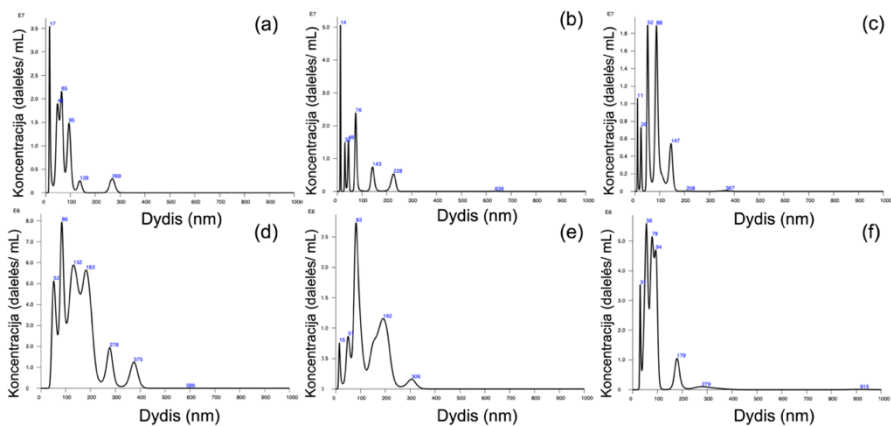
Tiriant kobalto (II, III) oksido nanodaleles (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND), jų forma ir dydis 0,9 % NaCl tirpale įvertinti transmisinės elektroninės mikroskopijos (TEM) metodu. TEM vaizdai parodė, kad nanodalelės buvo netaisyklingos formos ir iš dalies atitiko gamintojo nurodytą dydį, t. y. maždaug 10–30 nm (3.1 pav. a) ir <50 nm (3.1 pav. b).



**3.1 pav.** Kobalto oksido nanodalelių TEM nuotraukos (a – 10–30 nm; b – <50 nm)

**Fig. 3.1.** TEM images of cobalt oxide nanoparticles (a – 10–30 nm; b – <50 nm)

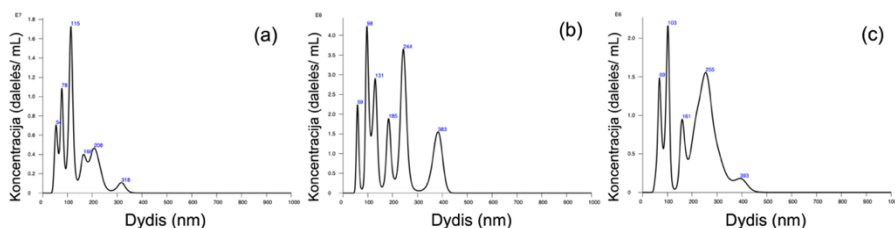
NTA analizė pirmiausiai atlikta su  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  dalelėmis, kurių pirminis dydis buvo 10–30 nm. Nustatyta, kad iškart po ultragarsinio dispergavimo, vidutinis dalelių dydis buvo 77 nm, o dauguma dalelių tirpale buvo 17 nm dydžio. Praėjus 1 ir 24 val. po ultragarsinio dispergavimo, vidutinis dalelių dydis buvo, atitinkamai, 94,5 nm ir 82,8 nm, kur dauguma dalelių buvo, atitinkamai, 14 nm ir 52/88 nm dydžio (3.2 pav. (a–c), 3.1 lentelė). Skirtinga tendencija stebėta dalelių, kurių pirminis dydis buvo <50 nm, hidrodinaminio dydžio matavimuose. Iškart po ultragarsinio dispergavimo vidutinis dalelių dydis buvo 153,6 nm, kur dauguma dalelių buvo 86 nm dydžio. Tačiau praėjus 1 ir 24 val. po ultragarsinio dispergavimo, vidutiniai dalelių dydžiai koloidiniame tirpale sumažėjo, atitinkamai, iki 132,2 nm ir 90,2 nm, o didžiausias dalelių kiekis tirpale buvo, atitinkamai, 83 nm ir 56 nm dydžio (3.2 pav. (d–f), 3.1 lentelė). Toks dalelių dydžio mažėjimas laike, gali būti paaiškintas daliniu didelių aglomeratų nusėdimu ant mėgintuvėlio dugno.



**3.2 pav.** Kobalto oksido nanodalelių hidrodinaminio dydžio analizė Nanosight analizatoriumi praėjus 0, 1 ir 24 val. po ultragarsinio dispergavimo (10–30 nm, atitinkamai, a–c); <50 nm, atitinkamai, d–f)

**Fig. 3.2.** Hydrodynamic size analysis of cobalt oxide nanoparticles using Nanosight analyzer at 0, 1, and 24 h after sonication (10–30 nm, respectively, a–c; <50 nm, respectively, d–f). X-axis – size (nm), Y-axis – concentration (particles/mL)

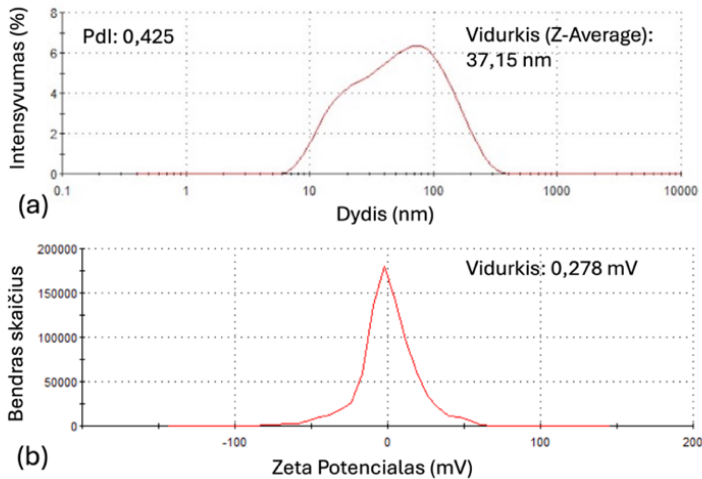
Tyrimuose su 35 nm dydžio PVP-Ag-ND nustatyta, kad iškart po koloidinio tirpalo ultragarsinio dispergavimo (0 val.) didžiausias pikas stebėtas ties 115 nm, o vidutinis ND dydis tirpale buvo 138,5 nm. Tai atitinka 3–4 kartus didesnes reikšmes negu nurodyta gamintojo. Praėjus 1 val. po ultragarsinio dispergavimo, didžiausias pikas išliko panašus – 98 nm, tačiau vidutinis dalelių dydis padidėjo 6 kartus, palyginti su pirminiu ND dydžiu. Po ultragarsinio dispergavimo praėjus 24 val., ND dydis RPMI 1640 terpėje išliko stabilus, lyginant su ND dydžiu praėjus 1 val. po ultragarsinio dispergavimo (didžiausias pikas – 103 nm, vidutinis dydis – 205,7 nm) (3.3 pav., 3.1 lentelė).



**3.3 pav.** Sidabro nanodalelių hidrodinaminio dydžio analizė Nanosight analizatoriumi praėjus 0, 1 ir 24 val. po ultragarsinio dispergavimo, atitinkamai, a, b ir c

**Fig. 3.3.** *Hydrodynamic size analysis of silver nanoparticles using Nanosight analyzer at 0, 1, and 24 h after sonication (respectively, a-c). X-axis – size (nm), Y-axis – concentration (particles/mL)*

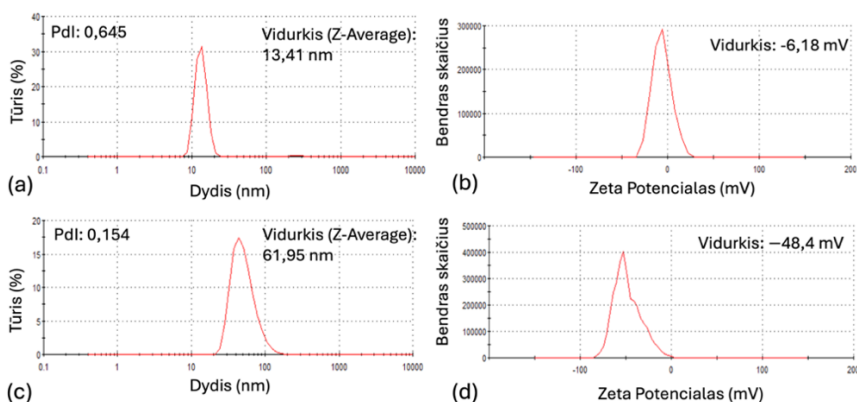
Sidabro nanodalelių dydžio pasiskirstymas koloidiniame tirpale, papildomai buvo įvertintas DLS metodu. Nustatyta, kad vidutinis nanodalelių dydis tirpale buvo 37,15 nm ir iš dalies atitiko gamintojo nurodymus (35 nm) (3.4 pav. a). Be to, tirpalo polidispersinis indeksas (PDI) – 0,425, leidžia daryti prielaidą, kad tiriamasis nanodalelių tirpalas yra sąlyginai monodispersinis (PDI > 0,7 žymi didelį ND dydžio pasiskirstymą tirpale). Papildomai buvo įvertintas nanodalelių tirpalo stabilumas, vertinant zeta ( $\zeta$ ) potencialą. Vidutinė zeta potencialo reikšmė Ag-ND tirpale – 0,278 mV (3.4 pav. b). Nanodalelės, kurių zeta potencialo reikšmės yra tarp –30 ir +30 mV laikomos nestabiliomis ir linkusiomis agreguoti dėl išaugusios traukos ir sumažėjusios atstūmimo jėgos [119].



**3.4 pav.** Sidabro nanodalelių (a) dydžio pasiskirstymo analizė dinaminės šviesos sklaidos (DLS) metodu ir (b) zeta potencialo įvertinimas NanoSizer analizatoriumi

**Fig. 3.4.** Size distribution analysis of silver nanoparticles by DLS method (a). X-axis – size (nm) Y-axis – intensity (%). Zeta potential assessment using NanoSizer analyzer (b). X-axis –zeta potential (mV), Y-axis – total count

Aukso nanodalelių dydžio pasiskirstymas koloidiniame tirpale ir tirpalo polidispersinis indeksas taip pat buvo nustatytas DLS metodu, o tirpalo stabilumas nustatytas įvertinus zeta potencialo reikšmes Nanosizer analizatoriumi. Nustatyta, kad mažesnių Au-ND (pirminis dydis 5 nm) vidutinis dydis tirpale – 13, 41 nm, polidispersinis indekas – 0,645, o zeta potencialas – –6,18 mV (3.5 pav. a, b). Šios nanodalelės yra polidispersiškos, koloidinis tirpalas nėra stabilus ir dalelės gali aglomeruoti. Tyrimų su didesnėmis Au-ND (pirminis dydis 40 nm) metu nustatyta, kad vidutinis nanodalelių dydis – 61,95 nm, Pdl – 0,154, zeta potencialas – –48,4 mV. Šių nanodalelių dydis iš dalies atitinka gamintojo nurodymus, koloidiniame tirpale visos dalelės yra panašaus dydžio (monodispersiškos), o pats tirpalas yra stabilus (3.5 pav. c, d).



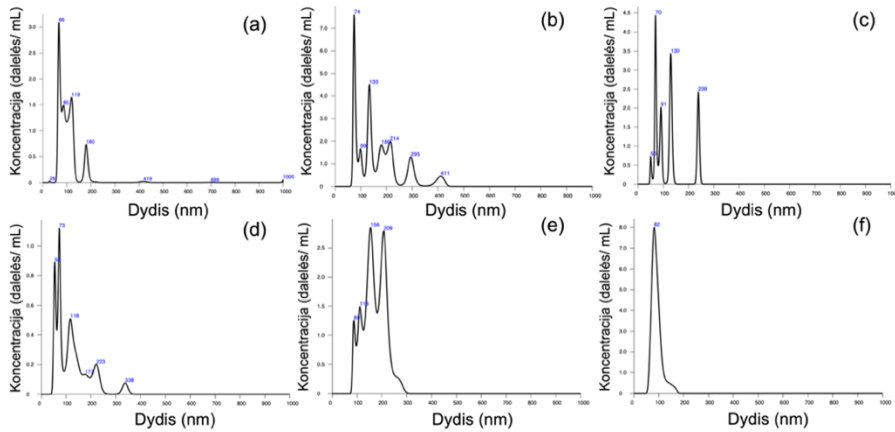
**3.5 pav.** Aukso nanodalelių dydžio pasiskirstymo analizė dinaminės šviesos sklaidos (DLS) metodu (a – 5 nm, c – 40 nm) ir zeta potencialo įvertinimas (b – 5 nm, d – 40 nm) Nanosizer analizatoriumi

**Fig. 3.5.** Size distribution analysis of gold nanoparticles by DLS method ((a) – 5 nm, (c) – 40 nm). X-axis – size (nm), Y-axis – volume (%). Zeta potential assessment using NanoSizer analyzer ((b) – 5 nm, (d) – 40 nm). X-axis – zeta potential (mV), Y-axis – (b, d) total count

Nanodalelių hidrodinaminis dydis ląstelių mitybinėje terpėje RPMI 1640, praėjus 0, 3 ir 24 val. po ultragarsinio dispergavimo procedūros buvo įvertintas nanodalelių sekimo analizės metodu, Nanosight analizatoriumi (3.6 pav., 3.1 lentelė). Mažesnės nanodalelės buvo linkusios aglomeruoti ląstelių mitybinėje terpėje, vidutinis nanodalelių dydis buvo 20–30 kartų didesnis nei jų pirminis dydis (5 nm). Nepriklausomai nuo inkubavimo laiko (0 val., 3 val. ar 24 val.), didžiausi stebėti pikai buvo panašūs, atitinkamai, ties 66, 74 ir 70 nm, o vidutiniai ND dydžiai tirpale buvo, atitinkamai, 106,4 nm, 167,0 nm ir 124,9 nm (3.6 pav. (a–c), 3.1 lentelė). Priešingai, mėginiuose su didesnėmis nanodalelėmis (pirminis dydis 40 nm), aglomeracijos lygis buvo mažesnis, vidutinis dalelių dydis buvo 2–4 kartus didesnis nei jų pirminis dydis. Iškart po sonikavimo, didžiausias pikas stebėtas ties 73 nm, o vidutinis ND dydis tirpale – 122,3 nm. Praėjus 3 val. po sonikavimo procedūros, didžiausias pikas išaugo iki 156 nm (vidutinis dydis – 170,6 nm). Įdomu tai, kad po 24 val. inkubacijos tiek vidutinis nanodalelių dydis tirpale, tiek didžiausias stebėtas pikas sumažėjo, atitinkamai, iki 90,8 nm ir 82,0 nm (3.6 pav. (d–f), 3.1 lentelė). Tai iš



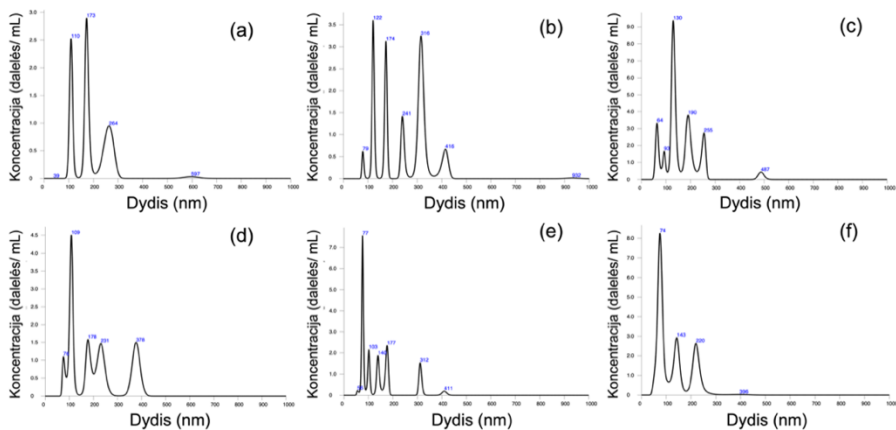
dalies patvirtina zeta potencialo analizės metu padarytas išvadas apie aukštesnį, 40 nm dydžio, Au-ND koloidinio tirpalo stabilumą.



**3.6 pav.** Aukso nanodalelių hidrodinaminio dydžio analizė Nanosight analizatoriumi praėjus 0, 3 ir 24 val. po ultragarsinio dispergavimo (5 nm, atitinkamai, a-c; 40 nm, atitinkamai, d-f)

**Fig. 3.6.** Hydrodynamic size analysis of gold nanoparticles using Nanosight analyzer at 0, 3, and 24 h after sonication (5 nm, respectively, a-c; 40 nm, respectively, d-f). X-axis – size (nm), Y-axis – concentration (particles/mL)

Tyrimuose su 13 ir 50 nm dydžio  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -ND nustatyta, kad mažesnės nanodalelės (13 nm) yra linkusios aglomeruoti ląstelių mitybinėje terpėje. Vidutinis dalelių dydis praėjus 0 val., 1 val. ir 24 val. po ultragarsinio dispergavimo padidėjo, atitinkamai, 14,7, 19,6 ir 12,5 kartų, lyginant su pirminiu, gamintojo nurodytu dydžiu. O didžiausi pikai stebėti, atitinkamai, ties 173 nm, 122 nm ir 130 nm (3.7 pav. (a–c), 3.1 lentelė)

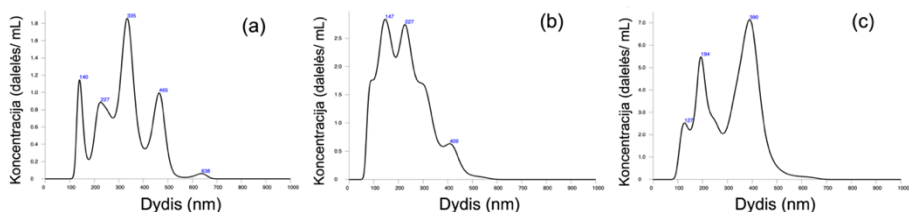


**3.7 pav.** Aliuminio oksido nanodalelių hidrodinaminio dydžio analizė Nanosight analizatoriumi praėjus 0, 1 ir 24 val. po ultragarsinio dispergavimo (13 nm, atitinkamai, a–c); 50 nm, atitinkamai, d–f)

**Fig. 3.7.** Hydrodynamic size analysis of alumina oxide nanoparticles using Nanosight analyzer at 0, 1, and 24 h after sonication (13 nm, respectively, a–c; 50 nm, respectively, d–f). X-axis – size (nm), Y-axis – concentration (particles/mL)

Palyginimui, didesnės aliuminio oksido nanodalelės (50 nm) ląstelių mitybinėje terpėje buvo stabilesnės ir dalinai išlaikė savo pirminį dydį (74–77 nm), o vidutinis dalelių dydis skirtingų matavimų metu (0 val., 1 val., 24 val. po ultragarsinio dispergavimo), atitinkamai, buvo tik 4, 3 ir 2,5 kartus didesnis nei pirminis ND dydis (3.7 pav. (d–f), 3.1 lentelė).

Silicio dioksido nanodalelių hidrodinaminio dydžio analizės metu nustatyta, kad nepriklausomai nuo tirpalo inkubacijos laiko (0 val., 1 val. ar 24 val.) vidutinis SiO<sub>2</sub>-ND dydis tirpale buvo 20–30 kartų didesnis nei jų pirminis dydis (10–20 nm), o didžiausi pikai stebėti, atitinkamai, ties 335 nm, 147 nm ir 390 nm (3.8 pav., 3.1 lentelė).

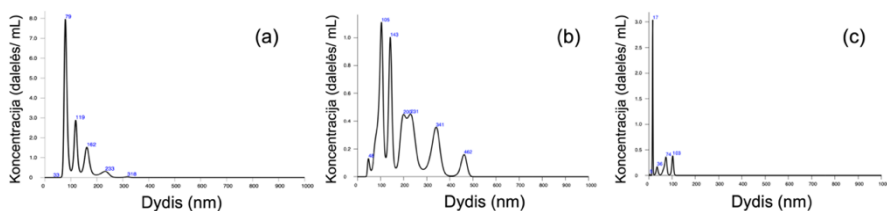


**3.8 pav.** Silicio dioksido nanodalelių hidrodinaminio dydžio analizė Nanosight analizatoriumi praėjus 0, 1 ir 24 val. po ultragarsinio dispergavimo, atitinkamai, a–c

**Fig. 3.8.** *Hydrodynamic size analysis of silica nanoparticles using Nanosight analyzer at 0, 1, and 24 h after sonication (respectively, a–c). X-axis – size (nm), Y-axis – concentration (particles/mL)*

Taigi, nors silicio dioksido nanodalelių aglomeracija ląstelių mitybinėje terpėje buvo akivaizdi, svarbu paminėti, kad dalelės, kurių dydis yra apie 10 nm, tirpale gali būti uždengiamos didesnių aglomeratų, ir dėl to matavimo metu mažesnės frakcijos nėra fiksuojamos [120].

Priešingai, tyrimuose su polistireno nanodalelėmis nustatyta, kad iškart po ultragarsinio dispergavimo didžiausias pikas, žymintis didžiausią tam tikro dydžio dalelių kiekį, buvo 79 nm, o vidutinis dalelių dydis RPMI 1640 ląstelių mitybinėje terpėje buvo 114,9 nm. Praėjus 3 val. po ultragarsinio dispergavimo, nustatyta, kad daugiausia dalelių buvo 105 nm dydžio, o vidutinis dalelių dydis tirpale – 202 nm. Įdomu tai, kad po ilgalaikės inkubacijos (24 val.), aglomeracijos lygis



sumažėjo. Nustatyta, kad vidutinis PS-ND dydis tirpale siekė 47,5 nm, daugiausiai dalelių tirpale buvo 17 nm dydžio (3.9 pav., 3.1 lentelė).

**3.9 pav.** Polistireno nanodalelių hidrodinaminio dydžio analizė Nanosight analizatoriumi praėjus 0, 3 ir 24 val. po ultragarsinio dispergavimo, atitinkamai, a, b ir c

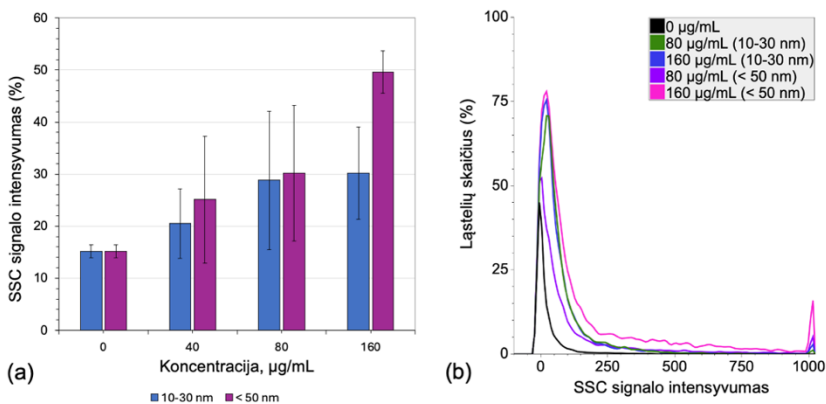
**Fig. 3.9.** *Hydrodynamic size analysis of polystyrene nanoparticles using Nanosight analyzer at 0, 3, and 24 h after sonication (respectively, a–c). X-axis – size (nm), Y-axis – concentration (particles/mL)*

Tikėtina, kad žemesnis aglomeracijos lygis ir mažesnis ND dydis po 24 valandų inkubacijos matomas dėl galimo didesnių aglomeratų nusėdimo į mėgintuvėlio dugną.

### 3.2 Nanodalelių patekimo į ląstelę analizė

Nanodalelių patekimas į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles vertintas FACSCalibur tėkmės citometru (BD Biosciences) skirtingų donorų ląsteles 24 val. veikiant skirtingomis nanodalelių koncentracijomis (2.4 lentelė). Nanodalelių internalizacija nustatyta vertinant šoninės šviesos sklaidos (SSC) intensyvumą. Santykinis ND internalizacijos lygis, išreikštas kartais (angl. *fold-increase*), kuris buvo apskaičiuotas lyginant SSC intensyvumą ląstelėse paveiktose nanodalelėmis su SSC intensyvumu neigiamoje kontrolėje (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

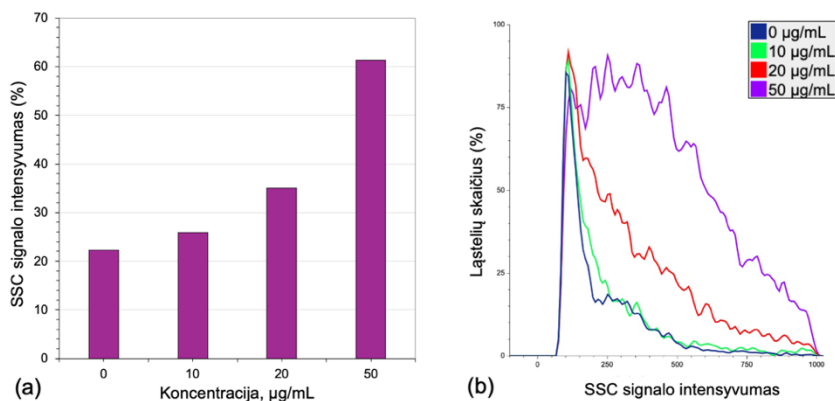
Kobalto oksido nanodalelių tyrimo metu nustatyta, kad  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND efektyviai pateko į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles (3.10 pav.). Lyginant su neigiama kontrole, SSC intensyvumas padidėjo beveik 1,4, 1,9, ir 2 karto, kai ŽPKVL buvo veikiamos, atitinkamai, 40, 80 ir 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  10–30 nm  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND. Ląsteles veikiant tomis pačiomis  $<50$  nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND koncentracijomis, SSC intensyvumas, palyginti su neigiama kontrole, padidėjo, atitinkamai, 1,7, 2 ir 3,3 karto (3.10 pav).



**3.10 pav.**  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND (10–30 nm ir <50 nm) patekimo į žmogaus periferinio kraujo vienbrandoles ląsteles analizė tėkmės citometrijos metodu, analizuojant šoninės šviesos išsklaidymo (SSC) intensyvumą. (a) Grafikas, vaizduojantis SSC intensyvumo procentinę išraišką (n=2). Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). (b) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis SSC intensyvumo pokytį ND paveiktose ląstelėse

**Fig. 3.10.** Analysis of the uptake of  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs (10–30 nm and <50 nm) into human PBMCs using flow cytometry, analyzing the intensity of side scatter (SSC). (a) Graph depicting the SSC intensity changes. X-axis – concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ), Y-axis – total count (%). Error bars represent the standard error of the mean (SEM). (b) Representative flow cytometry histogram showing changes in SSC intensity in nanoparticle-treated cells. X-axis – SSC intensity, Y-axis – total count (%)

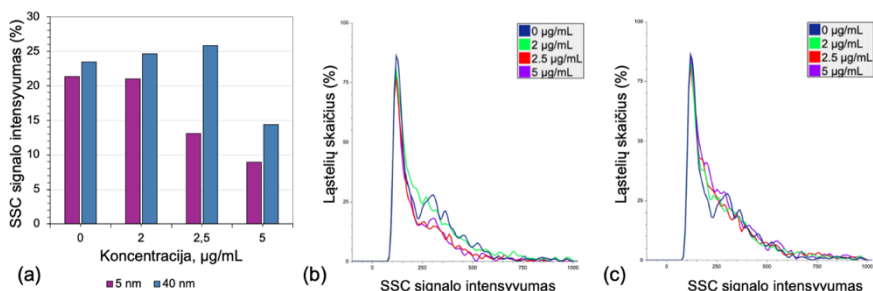
35 nm dydžio PVP-Ag-ND patekimo į ląstelę analizės metu nustatyta, kad 35 nm dydžio PVP-Ag-ND taip pat efektyviai patenka į ŽPKVL. Lyginant su neigiama kontrole, SSC intensyvumas ląstelėse, paveiktose PVP-Ag-ND (10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ ), padidėjo, atitinkamai 1,16, 1,57 ir 2,75 kartus. Be to, nustatyta statistiškai reikšminga priklausomybė tarp Ag-ND koncentracijos ir ND internalizacijos lygio ( $R^2 = 0,99$ ,  $P = 0,006$ ) (3.11 pav.).



**3.11 pav.** PVP-Ag-ND (35 nm) patekimo į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles analizė tėkmės citometrijos metodu, analizuojant šoninės šviesos išsklaidymo (SSC) intensyvumą. (a) Grafikas, vaizduojantis SSC intensyvumo procentinę išraišką. (b) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis SSC intensyvumo pokytį ND paveiktose ląstelėse

**Fig. 3.11.** Analysis of the uptake of PVP-Ag-NPs into human PBMCs using flow cytometry, analyzing the intensity of side scatter light (SSC). (a) Graph depicting the SSC intensity changes. X-axis – concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ), Y-axis – total count (%). (b) Representative flow cytometry histogram showing changes in SSC intensity in nanoparticle-treated cells. X-axis – SSC intensity, Y-axis – total count (%)

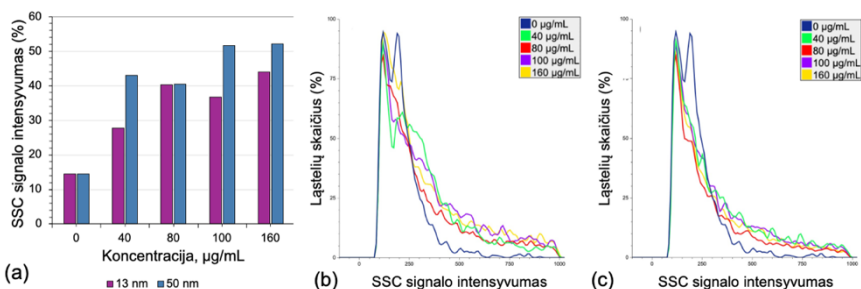
Įdomu tai, kad aukso nanodalelių vidualąstelinė internalizacija buvo ribota – po 24 val. poveikio 5 nm Au-ND, SSC intensyvumas ŽPKVL nepakito arba tapo mažesnis, lyginant su neigiama kontrole (3.12 pav., a, b), o ląsteles veikiant 40 nm dydžio Au-ND, stebėtas tik nežymus, 1,05 ir 1,1 kartų, SSC intensyvumo padidėjimas, atitinkamai, ties 2 ir 2,5  $\mu\text{g/mL}$  koncentracijomis, lyginant su neigiama kontrole (3.12 pav., a, c).



**3.12 pav.** 5 ir 40 nm dydžio Au-ND patekimo į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles analizė tėkmės citometrijos metodu, analizuojant šoninės šviesos išsklaidymo (SSC) intensyvumą. (a) Grafikas, vaizduojantis SSC intensyvumo procentinę išraišką. (b-c) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis SSC intensyvumo pokytį, atitinkamai, 5 ir 40 nm dydžio Au-ND paveiktose ląstelėse

**Fig. 3.12.** Analysis of the uptake of Au-NPs (5 nm and 40 nm) into human PBMCs using flow cytometry, analyzing the intensity of side scatter (SSC). (a) Graph depicting the SSC intensity changes. X-axis – concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ), Y-axis – total count (%). (b-c) Representative flow cytometry histogram showing changes in SSC intensity in, respectively, 5 nm and 40 nm size nanoparticle-treated cells. X-axis – SSC intensity, Y-axis – total count (%)

Priešingai, aliuminio oksido nanodalelės į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles pateko efektyviai. Lyginant su neigiama kontrole, 13 nm dydžio  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$  (40, 80, 100, 160  $\mu\text{g/mL}$ ) SSC intensyvumą padidino, atitinkamai, 1,9, 2,8, 2,5 ir 3 karto (3.13 pav. a, b). Po 24 val. poveikio 50 nm dydžio  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$ , SSC intensyvumas PKVL padidėjo, atitinkamai, 2,9, 2,8, 3,5 ir 3,6 kartus (3.13 pav. a, c). Nors didesnės nanodalelės į ląsteles pateko efektyviau, lyginant su mažesnėmis, statistiškai reikšminga priklausomybė tarp  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$  koncentracijos ir internalizacijos lygio buvo stebėta tik su 13 nm dydžio ND ( $R^2 = 0,85$ ,  $P = 0,026$ ).

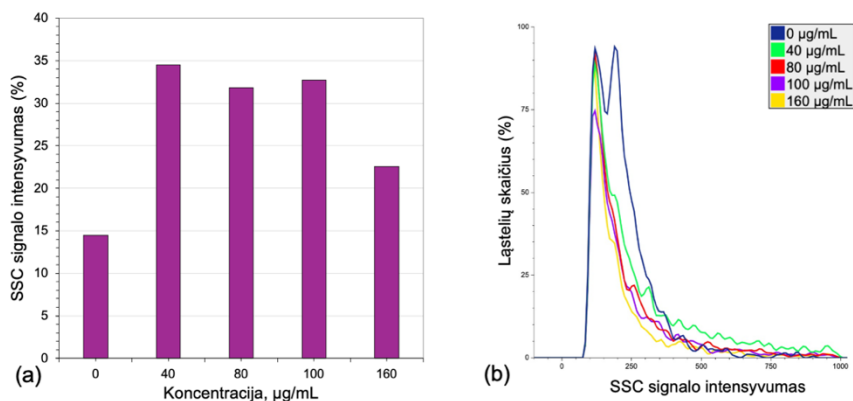


**3.13 pav.** 13 ir 50 nm dydžio aliuminio oksido nanodalelių patekimo į žmogaus periferinio kraujo vienbrandoles ląsteles analizė tėkmės citometrijos metodu, analizuojant šoninės šviesos išsklaidymo intensyvumą (SSC). (a) Grafikas, vaizduojantis SSC intensyvumo procentinę išraišką. (b–c) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis SSC intensyvumo pokytį, atitinkamai, 13 ir 50 nm dydžio  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ND paveiktose ląstelėse

**Fig. 3.13.** Analysis of the uptake of gold nanoparticles (13 nm and 50 nm) into human PBMCs using flow cytometry, analyzing the intensity of side scatter (SSC). (a) Graph depicting the SSC intensity changes. X-axis – concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Y-axis – total count (%). (b–c) Representative flow cytometry histogram showing changes in SSC intensity in, respectively, 13 nm and 50 nm size nanoparticle-treated cells. X-axis – SSC intensity, Y-axis – total count (%)

Panaši tendencija stebėta ir tyrimuose su silicio dioksido nanodalelėmis. Tyrimo metu nustatyta, kad silicio dioksido nanodalelės efektyviai patenka į žmogaus periferinio kraujo vienbrandoles ląsteles. Po 24 val. poveikio skirtingomis  $\text{SiO}_2$ -ND koncentracijomis (40, 80, 100, 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), SSC intensyvumas ŽPKVL padidėjo, atitinkamai, beveik 2,4, 2,2, 2,3 ir 1,6 kartus, lyginant su neigiama kontrole (3.14 pav.).

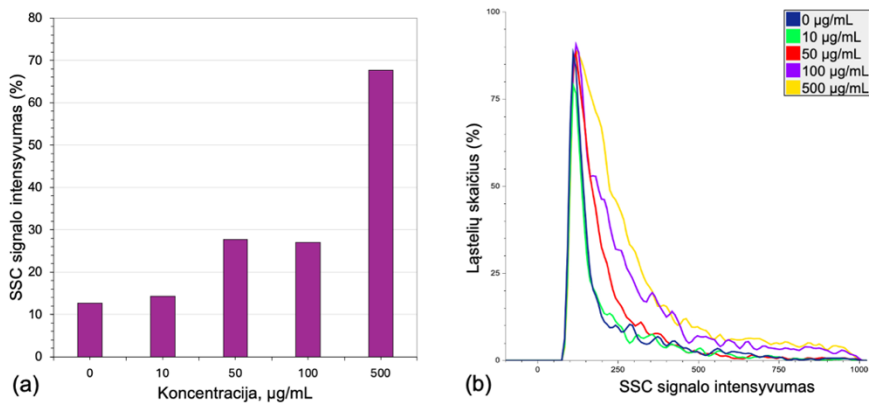




**3.14 pav.** Silicio dioksido nanodalelių patekimo į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles analizė tėkmės citometrijos metodu, analizuojant šoninės šviesos išsklaidymo intensyvumą (SSC). (a) Grafikas, vaizduojantis SSC intensyvumo procentinę išraišką. (b) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis SSC intensyvumo pokytį, SiO<sub>2</sub> ND paveiktose ląstelėse

**Fig. 3.14.** Analysis of the uptake of silica nanoparticles into human peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry, analyzing the intensity of side scatter (SSC). (a) Graph depicting the SSC intensity changes. X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – total count (%). (b) Representative flow cytometry histogram showing changes in SSC intensity in nanoparticle-treated cells. X-axis – SSC intensity, Y-axis – total count (%)

Polistireno nanodalelių viduląstelinės internalizacijos analizės metu nustatyta statistiškai reikšminga priklausomybė tarp PS-ND koncentracijos ir SSC intensyvumo ( $R^2 = 0,97$ ,  $P = 0,002$ ). Lyginant su neigiama kontrole, po 24 val. poveikio skirtingomis PS-ND koncentracijomis (10, 50, 100, 500 µg/mL) SSC intensyvumas žmogaus PKVL padidėjo, atitinkamai, beveik 1,13, 2,2, 2,13, 5,4 kartus (3.15 pav.).



**3.15 pav.** Polistireno nanodalelių patekimo į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles analizė tėkmės citometrijos metodu, analizuojant šoninės šviesos išsklaidymo intensyvumą (SSC). (a) Grafikas, vaizduojantis SSC intensyvumo procentinę išraišką. (b) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis SSC intensyvumo pokytį, PS-ND paveiktose ląstelėse

**Fig. 3.15.** Analysis of the uptake of polystyrene nanoparticles into human peripheral blood mononuclear cells using flow cytometry, analyzing the intensity of side scatter (SSC). (a) Graph depicting the SSC intensity changes. X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – total count (%). (b) Representative flow cytometry histogram showing changes in SSC intensity in nanoparticle-treated cells. X-axis – SSC intensity, Y-axis – total count (%)

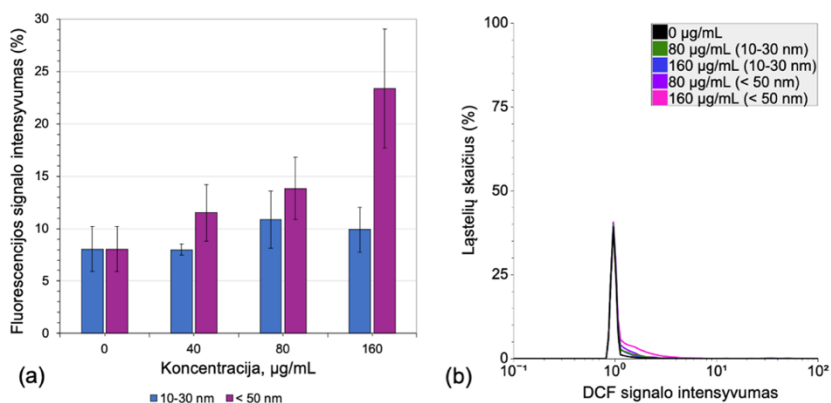
Apibendrinant gautus rezultatus,  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -, PVP-Ag-,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -,  $\text{SiO}_2$ - ir PS-ND efektyviai pateko į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles po 24 val. poveikio. Deja, 5 ir 40 nm dydžio Au-ND viduląstelinė internalizacija buvo ribota. Įdomu tai, kad 50 nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4$ - ir  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -ND į ląsteles pateko efektyviau, nei, atitinkamai, 10–30 nm  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND ir 13 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -ND.

### 3.3 ROS formavimosi analizė

Nanodalelių gebėjimas indukuoti reaktyviasias deguonies formas žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse įvertintas FACSCalibur tėkmės citometru, skirtingų donorų ląsteles 24 val. veikiant skirtingomis nanodalelių koncentracijomis (2.4 lentelė). Reaktyviųjų deguonies formų lygis nustatytas panaudojus 2,7-dichlordihidrofluoresceino diacetatą ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ) ir lyginant DCF

fluorescencijos intensyvumą mėginiuose, paveiktuose ND ir neigiamos kontrolės mėginiuose (0  $\mu\text{g/mL}$ ).

Tyrimuose su kobalto oksido nanodalelėmis nustatyta, kad neigiamos kontrolės mėginiuose vidutinis ROS lygis siekė 8,01 %, o 10–30 nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  (40, 80, 160  $\mu\text{g/mL}$ ), sukėlė nežymų ROS kiekio padidėjimą. Nanodalelėmis paveiktuose mėginiuose stebėtas DCF fluorescencijos intensyvumas siekė, atitinkamai, 8,00 %, 10,88 % ir 9,90 %. Priešingai, didesnės, <50 nm dydžio,  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$ , DCF fluorescencijos intensyvumą padidino, atitinkamai, iki 11,51 %, 13,84 % ir 23,36 % (3.16 pav.).

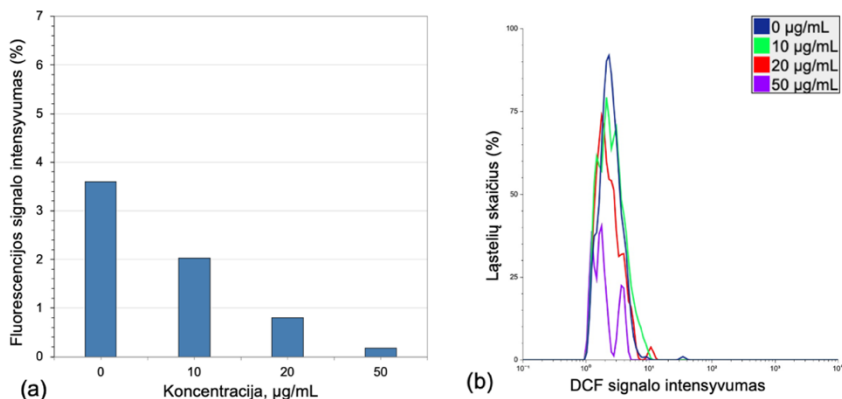


**3.16 pav.** ROS lygis žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse, po 24 val. poveikio skirtingomis 10–30 nm ir <50 nm  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  koncentracijomis (40–160  $\mu\text{g/mL}$ ). (a) Grafikas, vaizduojantis DCF fluorescencijos intensyvumo procentinę išraišką. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). (b) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis DCF fluorescencijos intensyvumo pokytį ND paveiktose ląstelėse ( $n=2$ )

**Fig. 3.16.** ROS levels in human PBMCs after 24 h of exposure to different concentrations of 10–30 nm and <50 nm  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-NPs}$  (40–160  $\mu\text{g/mL}$ ). (a) Error bars represent the standard error of the mean (SEM). X-axis – concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ), Y-axis – total count (%). (b) Representative flow cytometry histogram showing changes in DCF fluorescence intensity in nanoparticle-treated cells ( $n=2$ ). X-axis – DCF fluorescence intensity, Y-axis – total count (%)

Įdomu tai, kad nepaisant efektyvios internalizacijos į ŽPKVL, PVP-Ag-ND paveiktose ląstelėse ROS lygio didėjimas nebuvo stebimas. Priešingai, didėjant nanodalelių koncentracijai (10, 20, 50  $\mu\text{g/mL}$ ), DCF fluorescencijos intensyvumas, lyginant su neigiamą

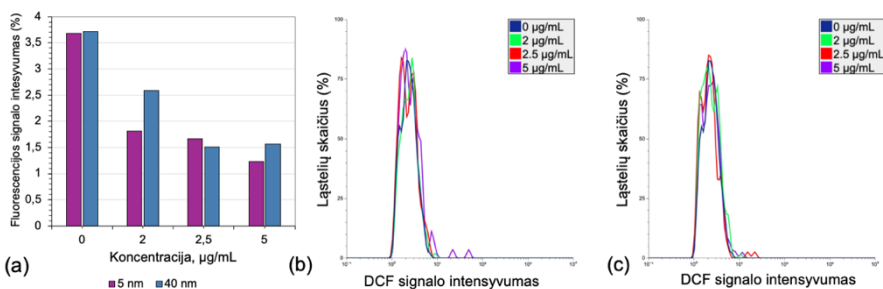
kontrolė (3,6 %), mažėjo (atitinkamai, 2,03 %, 0,80 %, 0,17 %) (3.17 pav.).



**3.17 pav.** Reaktyviųjų deguonies formų lygis žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse, po 24 val. poveikio skirtingomis PVP-Ag-ND koncentracijomis (10–50 µg/mL). (a) Grafikas, vaizduojantis DCF fluorescencijos intensyvumo procentinę išraišką. (b) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis DCF fluorescencijos intensyvumo pokytį, ND paveiktose ląstelėse

**Fig. 3.17** ROS levels in human PBMCs after 24 h of exposure to different concentrations of PVP-Ag-NPs (10–50 µg/mL). (a) Graph depicting the percentage expression of DCF fluorescence intensity. X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – total count (%). (b) Representative flow cytometry histogram showing changes in DCF fluorescence intensity in nanoparticle-treated cells. X-axis – DCF fluorescence intensity, Y-axis – total count (%).

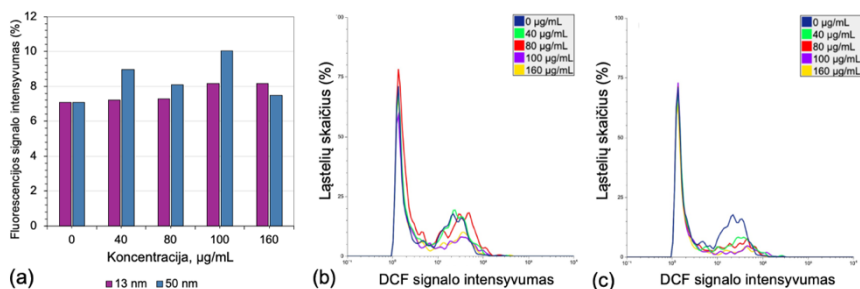
Panaši tendencija stebėta ir su Au-ND, kai nepriklausomai nuo nanodalelių dydžio (5 ar 40 nm), nė viena tirtoji ND koncentracija nepadidino DCF fluorescencijos intensyvumo, lyginant su neigiama kontrole (atitinkamai, 3.18 pav., a, b ir a, c).



**3.18 pav.** Reaktyviųjų deguonies formų lygis žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse po 24 val. poveikio skirtingomis 5 ir 40 nm dydžio Au-ND koncentracijomis (2–5 µg/mL). (a) Grafikas, vaizduojantis DCF fluorescencijos intensyvumo procentinę išraišką. (b-c) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis DCF fluorescencijos intensyvumo pokytį, atitinkamai, 5 ir 40 nm dydžio Au-ND paveiktose ląstelėse

**Fig. 3.18.** ROS levels in human PBMCs after 24 h of exposure to different concentrations of 5 nm and 40 nm Au-NPs (10–50 µg/mL). (a) Graph depicting the percentage expression of DCF fluorescence intensity. X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – total count (%). (b-c) Representative flow cytometry histogram showing changes in DCF fluorescence intensity in, respectively, 5 and 40 nm size Au-NPs-treated cells. X-axis – DCF fluorescence intensity, Y-axis – total count (%)

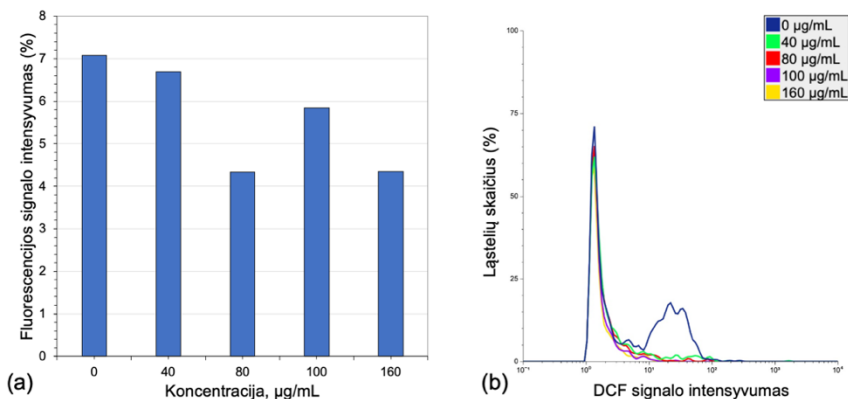
Tyrimuose su Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND nustatyta, kad Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND paveiktose ląstelėse, ROS lygis padidėjo nežymiai, lyginant su neigiama kontrole (7,1 %). Aukščiausias DCF fluorescencijos intensyvumo lygis, ląstelėse paveiktose 13 nm dydžio ND, buvo stebėtas ties 160 µg/mL koncentracija (8,17 %) (3.19 pav., a, b), o paveiktose 50 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND, ties 100 µg/mL koncentracija (10,03 %) (3.19 pav., a, c).



**3.19 pav.** Reaktyviųjų deguonies formų lygis žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse po 24 val. poveikio skirtingomis 13 ir 50 nm dydžio Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND koncentracijomis (40–160 µg/mL). (a) Grafikas, vaizduojantis DCF fluorescencijos intensyvumo procentinę išraišką. (b-c) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis DCF fluorescencijos intensyvumo pokytį, atitinkamai, 13 ir 50 nm dydžio Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND paveiktose ląstelėse

**Fig. 3.19.** ROS levels in human PBMCs after 24 h of exposure to different concentrations of 13 nm and 50 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs (40–160 µg/mL). (a) Graph depicting the percentage expression of DCF fluorescence intensity. X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – total count (%). (b-c) Representative flow cytometry histogram showing changes in DCF fluorescence intensity in, respectively, 13 and 50 nm size Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs-treated cells. X-axis – DCF fluorescence intensity, Y-axis – total count (%)

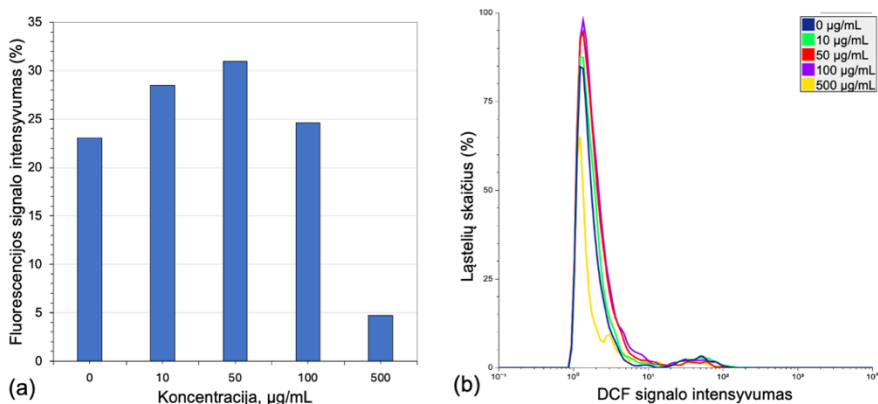
Reaktyviųjų deguonies formų lygio didėjimas periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse po poveikio SiO<sub>2</sub>-ND nebuvo nustatytas. Nė viena tirtoji ND koncentracija nepadidino DCF fluorescencijos intensyvumo, lyginant su neigiama kontrole (3.20 pav.).



**3.20 pav.** Reaktyvių deguonies rūšių formų žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse po 24 val. poveikio skirtingomis SiO<sub>2</sub>-ND koncentracijomis (40–160 µg/mL). (a) Grafikas, vaizduojantis DCF fluorescencijos intensyvumo procentinę išraišką. (b) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis DCF fluorescencijos intensyvumo pokytį SiO<sub>2</sub>-ND paveiktose ląstelėse

**Fig. 3.20.** ROS levels in human PBMCs after 24 h of exposure to different concentrations of SiO<sub>2</sub>-NPs (40–160 µg/mL). (a) Graph depicting the percentage expression of DCF fluorescence intensity. X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – total count (%) (b) Representative flow cytometry histogram showing changes in DCF fluorescence intensity in nanoparticle-treated cells. X-axis – DCF fluorescence intensity, Y-axis – total count (%)

Tyrimuose su polistireno nanodalelėmis nustatyta, kad trys tirtos PS-ND koncentracijos (10, 50, 100 µg/mL) DCF fluorescencijos intensyvumą padidino iki, atitinkamai, 28,50 %, 30,97 % ir 24,65 %, kai neigiamoje kontrolėje DCF intensyvumas buvo 23,08 % (3.21 pav.).



**3.21 pav.** Reaktyvių deguonies formų lygis žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse po 24 val. poveikio skirtingomis PS-ND koncentracijomis (10–500 µg/mL). (a) Grafikas, vaizduojantis DCF fluorescencijos intensyvumo procentinę išraišką. (b) Pavyzdinis tėkmės citometrijos histogramos vaizdas, rodantis DCF fluorescencijos intensyvumo pokytį PS-ND paveiktose ląstelėse

**Fig. 3.21.** ROS levels in human PBMCs after 24 h of exposure to different concentrations of polystyrene nanoparticles (10–500 µg/mL). (a) Graph depicting the percentage expression of DCF fluorescence intensity. X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – total count (%). (b) Representative flow cytometry histogram showing changes in DCF fluorescence intensity in nanoparticle-treated cells. X-axis – DCF fluorescence intensity, Y-axis – total count (%)

Apibendrinant gautus rezultatus, nei viena tirta PVP-Ag-, Au- ir SiO<sub>2</sub>-ND koncentracija neindukavo ROS formavimosi, lyginant su neigiama kontrole. Nežymūs ROS lygio pokyčiai stebėti ląstelėse, paveiktose Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND. Nors 50 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanodalelės indukavo didesnę ROS kiekį, lyginant su 13 nm ND, tačiau, DCF fluorescencijos intensyvumo pokyčiai nebuvo reikšmingi, nepriklausomai nuo ND dydžio. PS-ND ir Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND indukavo reikšmingą reaktyvių deguonies formų lygį ŽPKVL. Įdomu tai, kad <50 nm dydžio Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND nanodalelėmis (40, 80, 160 µg/mL) veiktose ląstelėse stebėtas, atitinkamai, 1,44, 1,3 ir 2,4 kartų didesnis DCF fluorescencijos intensyvumas, lyginant su poveikiu 10–30 nm dydžio Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND.

### 3.4 Nanodalelių genotoksiškumo tyrimai

Nanodalelių gebėjimas indukuoti pirmines DNR pažeidas, t. y. viengrandinius ir dvigrandinius DNR trūkius arba apurinus ir

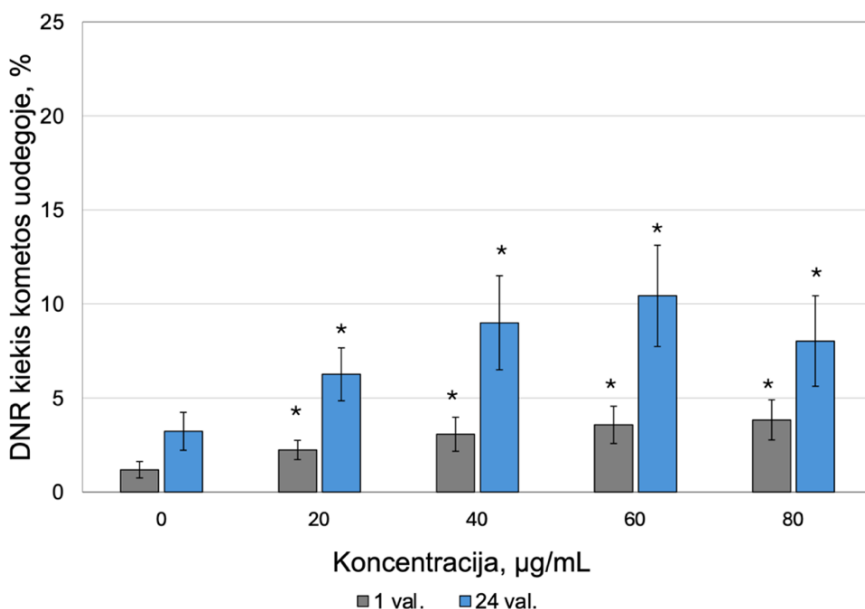


apirimidinines vietas, buvo įvertintas šarminiu kometos testu. 5-ių donorų periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės, 1 val. arba 3 val. ir 24 val. buvo veikiamos skirtingomis nanodalelių koncentracijomis (2.5 lentelė). Prieš kiekvieną tyrimą buvo vertinamas ND citotoksiškumas tripano mėlio arba akridino oranžo / etidžio bromido (AO/EB) testais, siekiant įvertinti necitotoksiškas ND koncentracijas. Nanodalelių aneugeninis ir klastogeninis poveikis žmogaus periferinio kraujo limfocitams, buvo įvertintas sustabdytos citokinezės mikrobranduolių testu. 3-jų donorų periferinis kraujas, 24-ąją ląstelių augimo valandą buvo veikiamas skirtingomis nanodalelių koncentracijomis (2.6 lentelė). Kaip sudėtinė metodo dalis, buvo skaičiuojamas ląstelių sustabdytos citokinezės proliferacijos indeksas (angl. *cytokinesis-blocked proliferation index* – *CBPI*), dar vadinamas branduolio dalijimosi indeksu (BDI).  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND genotoksiškumas papildomai buvo vertinamas seserinių chromatidžių mainų (SCM) testu (2.7 lentelė).

#### 3.4.1 Kobalto oksido nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai

5-ių donorų (D1, D2, D3, D4, D5) periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės, 1 ir 24 valandas buvo veiktos 10–30 nm ir <50 nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND (20–80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Pirminės DNR pažeidos buvo įvertintos šarminiu kometos testu. Teigiamai kontrolei naudotas vandenilio peroksido tirpalas (20  $\mu\text{M}$ ), kuris neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui, nors ir sukėlė reikšmingą DNR kiekio padidėjimą kometos uodegoje (angl. *tail DNA* – % *TDNA*, toliau – TDNR) –  $40,09 \pm 9,80$  % ( $\% \pm \text{SEM}$ ).

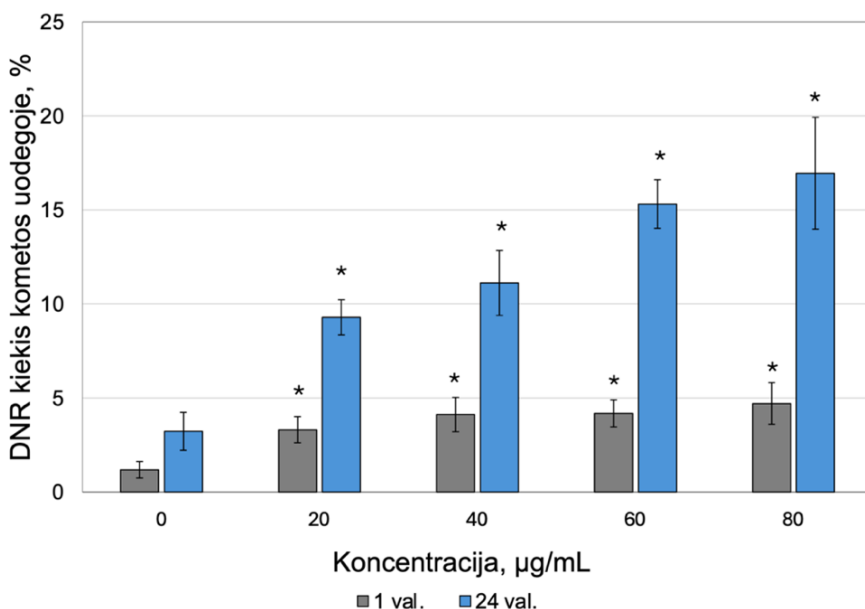
Nė viena tirtoji kobalto oksido nanodalelių koncentracija neturėjo reikšmingo poveikio ląstelių gyvybingumui, nepriklausomai nuo tirtos nanodalelių dydžio ir inkubacijos laiko (1 ar 24 val.) (S1 priedų lentelė). Dėl to pasirinktos ND koncentracijos (20–80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) buvo tirtos šarminiu kometos testu (3.22 pav., 3.23 pav.).



**3.22 pav.** DNR kiekis (%) kometos uodegoje periferinio kraujo vienbranduoles ląstelės 1 val. ir 24 val. poveikus skirtingomis 10–30 nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  koncentracijomis. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole, žymimas (\*) ( $n=5$ )

**Fig. 3.22.** Percentage of DNA in a comet tail of human PBMCs after 1 and 24 h of exposure to 10–30 nm  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-NP}$ . Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ), compared to the untreated control (0 µg/mL) is indicated by an asterisk (\*). X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – tail intensity (%) ( $n=5$ )

Visos tirtos 10–30 nm dydžio (3.22 pav.) ir  $< 50$  nm dydžio (3.23 pav.)  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  statistiškai reikšmingai padidino DNR pažeidimų kiekį tiek po 1 valandos, tiek po 24 valandų poveikio. Tačiau ilgesnis inkubacijos su nanodalelėmis, laikas (24 val.), sukėlė beveik tris kartus daugiau pirminių DNR pažeidimų, lyginant su trumpalaikė inkubacija (1 val.). Taip pat tyrimo metu buvo nustatyta statistiškai reikšminga priklausomybė tarp  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  koncentracijų ir DNR pažeidimų kiekio ( $P < 0,05$ , Jonckheere-Terpstra testas), nors po ilgalaikės inkubacijos (24 val.) su 10–30 nm dalelėmis, ši priklausomybė nebuvo linijinė.



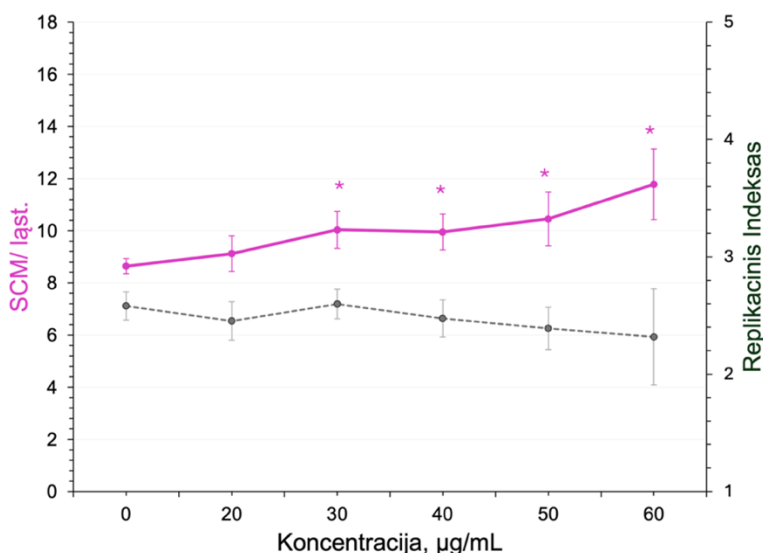
**3.23 pav.** Procentinis DNR kiekis kometos uodegoje periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles 1 val. ir 24 val. paveikus skirtingomis  $<50\text{ nm}$  dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  koncentracijomis. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole, žymimas (\*) ( $n=5$ )

**Fig. 3.23.** Percentage of DNA in a comet tail of human PBMCs after 1 and 24 h of exposure to  $<50\text{ nm}$   $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-NP}$ . Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ), compared to the untreated control ( $0\ \mu\text{g/mL}$ ) is indicated by an asterisk (\*). X-axis – concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ), Y-axis – tail intensity (%) ( $n=5$ )

Apibendrinant šarminiu kometos metodu gautus rezultatus nustatyta, kad tirtos  $10\text{--}30\text{ nm}$  ir  $<50\text{ nm}$  dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  sukėlė statistiškai reikšmingą, nuo koncentracijos priklausomą DNR pažeidimų kiekio padidėjimą. Duomenų analizė Wilcoxon Signed-Rank testu parodė, kad  $<50\text{ nm}$  dydžio ND indukavo statistiškai reikšmingai daugiau DNR trūkių nei mažesnės,  $10\text{--}30\text{ nm}$  dydžio ND ( $P = 0,0012$  (po 1 val.) ir  $P = 0,012$  (po 24 val.)). Po trumpalaikės inkubacijos su  $<50\text{ nm}$   $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  nanodalelėmis reikšminga koreliacija tarp nanodalelių citotoksiškumo ir DNR pažeidimų kiekio nebuvo nustatyta ( $r_s = -0,24$ ,  $P = 0,12$ , Spearmano koreliacija), tačiau po ilgalaikio (24 val.) poveikio nustatyta silpna, bet statistiškai reikšminga koreliacija ( $r_s = -0,33$ ,  $P = 0,03$ ). Priešingai, reikšminga koreliacija nebuvo nustatyta

tyrimuose su 10–30 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND. Įdomu tai, kad tiriant abiejų dydžių nanodaleles buvo pastebėti statistiškai reikšmingi skirtumai ne tik tarp nanodalelių koncentracijų, bet ir tarp donorų po 1 val. poveikio ( $P < 0,005$ , dvifaktorinė ANOVA) ir po 24 val. poveikio su 10–30 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND ( $P = 0,0001$ , dvifaktorinė ANOVA) (S2 priedų lentelė).

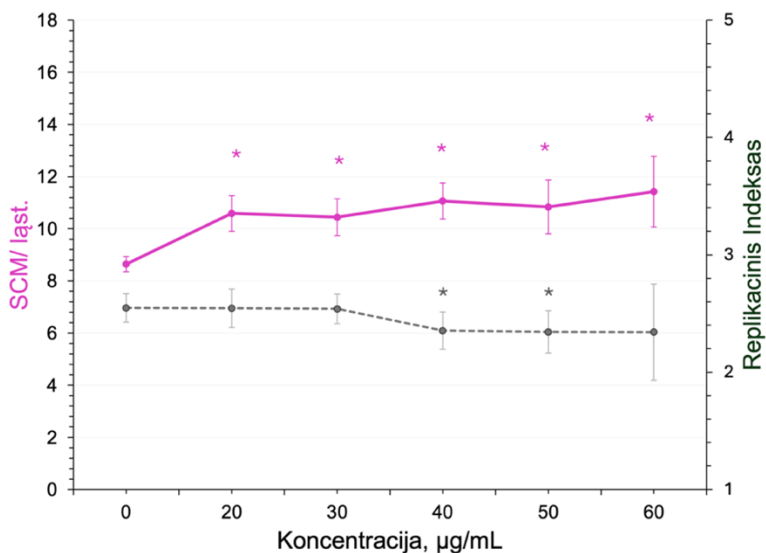
Pirminės DNR pažaidos papildomai tirtos seserinių chromatidžių mainų (SCM) testu, o ND citotoksinis efektas stebėtas vertinant ląstelių replikacinį indeksą (RI). 3-jų donorų (D2, D3, D4) periferinis kraujas buvo veikiamas skirtingomis 10–30 nm (3.24 pav.) ir <50 nm (3.25 pav.) dydžio Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND koncentracijomis (20–60 µg/mL). Kaip teigiama kontrolė naudotas metilmetansulfonatas (MMS), kuris beveik penkis kartus padidino seserinių chromatidžių mainų dažnį ląstelėje, lyginant su neigiama kontrole.



**3.24 pav.** Seserinių chromatidžių mainų dažnis ir periferinio kraujo limfocitų replikacinis indeksas juos paveikus 10–30 nm dydžio Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole, žymimas (\*) ( $n=3$ )

**Fig. 3.24.** Sister chromatid exchange frequency and replication index of human lymphocytes after exposure to 10–30 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ), compared to the untreated control (0 µg/mL), is indicated by an asterisk (\*) ( $n=3$ ). X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – SCE/cell, secondary Y-axis – Replication Index

Statistiškai reikšmingas ir nuo koncentracijos priklausomas ( $P < 0,05$ , Jonckheere-Terpstra testas) seserinių chromatidžių mainų kiekio didėjimas, lyginant su neigiama kontrole, buvo nustatytas ląstelės veikiant 30–60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  10-30 nm dydžio nanodalelėmis (3.24 pav.) ir 20–60  $\mu\text{g}/\text{mL}$   $<50$  nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  (3.25 pav.). Mažesnės nanodalelės neturėjo reikšmingo poveikio ląstelių replikacijos efektyvumui, tačiau dvi  $<50$  nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  koncentracijos (40 ir 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reikšmingai sumažino ląstelių replikacinį indeksą, lyginant su neigiama kontrole (3.25 pav.). Be to, buvo nustatyta statistiškai reikšminga neigiama koreliacija tarp SCM dažnio ir ląstelės replikacinio indekso po poveikio abiejų dydžių (10–30 nm ir  $<50$  nm) nanodalelėmis (atitinkamai,  $r_s = -0,55$ ,  $P = 0,02$  ir  $r_s = -0,47$ ,  $P = 0,005$ ). Dvifaktorinės ANOVA analizės metu nustatyta, kad SCM dažniui reikšmingos įtakos turėjo ne tik 10–30 nm dydžio nanodalelių koncentracijos, bet ir donorai. Nors abu šie faktoriai neturėjo reikšmingos įtakos tyrimuose su  $<50$  nm  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  (S2 priedų lentelė).



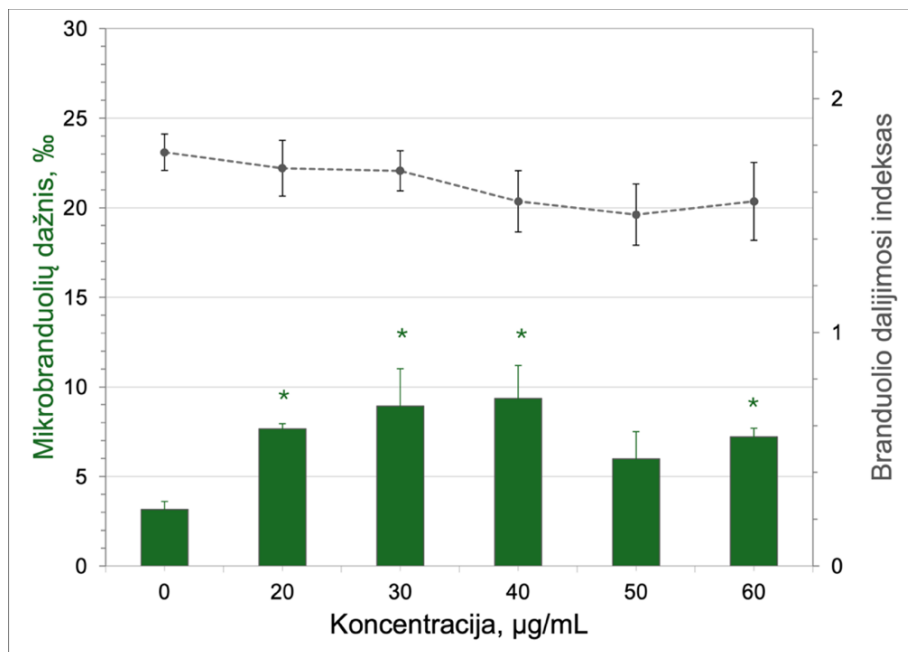
**3.25 pav.** Seserinių chromatidžių mainų dažnis ir periferinio kraujo limfocitų replikacinis indeksas juos paveikus <50 nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole, žymimas (\*) ( $n=3$ )

**Fig. 3.25.** Sister chromatid exchange frequency and replication index of human lymphocytes after exposure to <50 nm  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ), compared to the untreated control (0 µg/mL) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=3$ ). X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – SCE/cell, secondary Y-axis – Replication Index

Siekiant įvertinti  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND aneugeninį ir klastogeninį poveikį buvo atliktas sustabdytos citokinezės mikrobranduolių testas. 3 donorų periferinis kraujas (D1, D2, D3), 24-ąją ląstelių augimo valandą buvo veikiamas skirtingomis 10–30 nm ir <50 nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND (20–60 µg/mL) koncentracijomis. Kaip teigiama kontrolė naudotas doksorubicinas (45 µg/mL), kuris mikrobranduolių dažnį padidino 6,1 karto, lyginant su neigiama kontrole (0 µg/mL).

10–30 nm dydžio nanodalelės reikšmingai padidino mikrobranduolių dažnį, ląsteles veikiant 20, 30, 40, ir 60 µg/mL ND koncentracijomis. Lyginant su neigiama kontrole, mikrobranduolių dažnis padidėjo, atitinkamai, 2,4, 2,8, 2,9 ir 2,3 kartus (3.26 pav.), tačiau dozinė priklausomybė nenustatyta ( $P = 0,12$ , Jonckheere-Terpstra testas). Tačiau  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND, kurių pirminis dydis <50 nm,

sukėlė statistiškai reikšmingą ir nuo koncentracijos priklausomą ( $P = 0,008$ , Jonckheere-Terpstra testas) mikrobranduolių dažnio padidėjimą ties 30, 40, 50, ir 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  koncentracijomis (stebėtas, atitinkamai, 3,3, 3,8, 3,6 ir 3,5 kartų MB dažnio padidėjimas, lyginant su neigiama kontrole) (3.27 pav.).

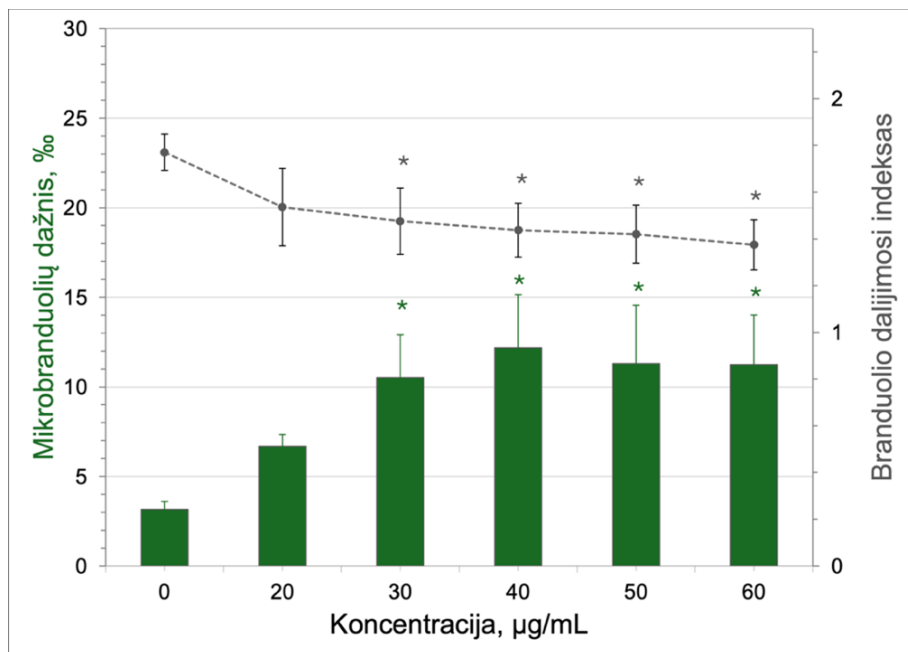


**3.26 pav.** Mikrobranduolių dažnis dvibranduolėse ląstelėse ir branduolio dalijimosi indeksas (BDI), periferinio kraujo limfocitus paveikus 10–30 nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$ . Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole, žymimas (\*) ( $n=3$ )

**Fig. 3.26.** Frequency of micronuclei in binucleated cells and nuclear division index of human lymphocytes after exposure to 10–30 nm  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-NPs}$ . Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ) compared to the untreated control (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=3$ ). X-axis – concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Y-axis – frequency of micronuclei (‰), secondary Y-axis – NDI / CBPI

Tirtų nanodalelių citotoksiškumas buvo apskaičiuotas iš BDI/CBPI duomenų. Nustatyta, kad  $<50$  nm dydžio nanodalelės turėjo stipresnę poveikį ląstelių gyvybingumui, lyginant su mažesnėmis  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$ . Didžiausios tirtos 10-30 nm dydžio nanodalelių koncentracijos (50 ir 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ląstelių gyvybingumą sumažino iki, atitinkamai, 65 % ir 73 %, o tos pačios  $<50$  nm dydžio nanodalelių

koncentracijos, ląstelių gyvybingumą sumažino, atitinkamai, beveik iki 54 % ir 49 % (S3 priedų lentelė). Be to, buvo nustatyta statistiškai reikšminga neigiama koreliacija tarp 10–30 nm (3.26 pav.) ir <50 nm (3.27 pav.)  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND paveiktų ląstelių BDI ir mikrobranduolių dažnio (atitinkamai,  $r_s = -0,56$ ,  $P = 0,01$  ir  $r_s = -0,72$ ,  $P = 0,001$ ).



**3.27 pav.** Mikrobranduolių dažnis dvibranduolėse ląstelėse ir branduolio dalijimosi indeksas (BDI), periferinio kraujo limfocitus paveikus <50 nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND. Paklaidų juostos rodo žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole, žymimas (\*) ( $n=3$ )

**Fig. 3.27.** Frequency of micronuclei in binucleated cells and nuclear division index of human lymphocytes after exposure to <50 nm  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ) compared to the untreated control (0 µg/mL) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=3$ ). X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – frequency of micronuclei (‰), secondary Y-axis – NDI / CBPI

Apibendrinant citogenetinę analizę, abiejų dydžių kobalto nanodalelės reikšmingai padidino DNR pažeidimų kiekį žmogaus periferinio kraujo limfocituose. <50 nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND sukėlė daugiau DNR pažeidimų, lyginant su mažesnėmis  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND. Be to, didesnės nanodalelės statistiškai reikšmingai sumažino ląstelių replikacinį (RI) ir proliferacijos (BDI arba CBPI) indeksus. Įdomu tai,



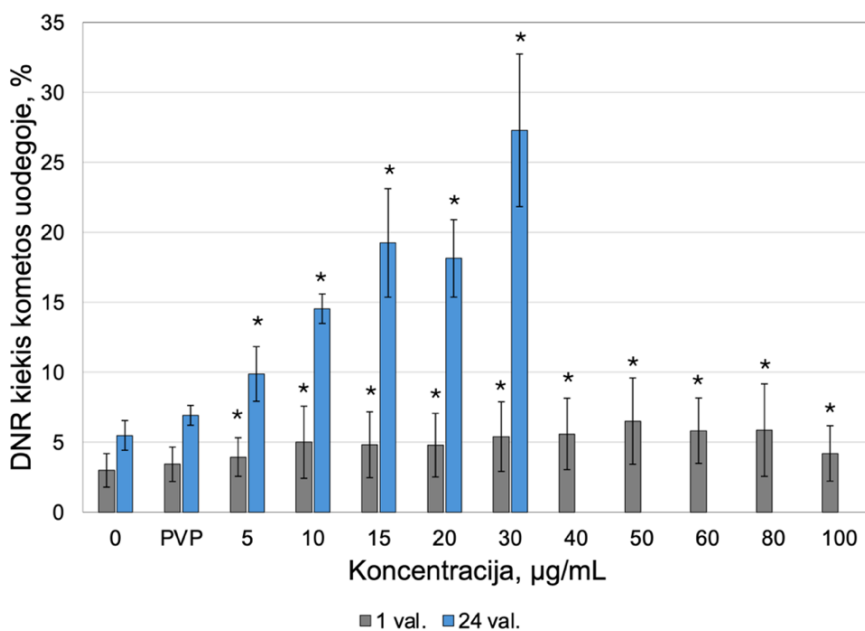
kad kaip ir šarminio kometos testo metu, nustatyti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp donorų, nepriklausomai nuo  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{-ND}$  dydžio (dvifaktorinė ANOVA,  $P < 0,05$ ) (S2 priedų lentelė).

### 3.4.2 Sidabro nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai

PVP-Ag-ND citotoksiškumas nustatytas tripano mėlio ir/ arba AO/EB testais, ŽPKVL, 1 ir 24 val. veikiant skirtingomis ND koncentracijomis. Citotoksiškumo tyrimai su 35 nm dydžio PVP-Ag-ND atlikti su 5 donorų ląstelėmis (D2, D3, D6, D7, D9) ir nustatyta, kad po trumpalaikės inkubacijos (1 val.), kelios ND koncentracijos (20, 80 ir 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) statistiškai reikšmingai sumažino ląstelių gyvybingumą, tačiau gyvybingumas nesumažėjo daugiau nei 20 %. Priešingai, po 24 val. inkubacijos, Ag-ND koncentracijos, didesnės nei 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  turėjo citotoksišną poveikį (S4 priedų lentelė), tad siekiant išvengti klaidingai teigiamų (angl. *false positive*) kometos tyrimo rezultatų, su šiomis ND koncentracijomis tolimesni tyrimai neatlikti.

35 nm PVP-Ag-ND gebėjimas indukuoti pirmines DNR pažeidas buvo įvertintas šarminiu kometos metodu, 5 donorų periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles (D2, D3, D6, D7, D9), 1 ir 24 val. veikiant skirtingomis PVP-Ag-ND koncentracijomis (5–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Kaip teigiama kontrolė naudotas vandenilio peroksido tirpalas (20  $\mu\text{M}$ ), kuris neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui, tačiau sukėlė statistiškai reikšmingą %TDNR padidėjimą (15,45±3,9 % (%±SEM)). Kaip tirpiklio kontrolė naudotas 0,2 % polivinilpirolidono (PVP) tirpalas. Kaip pavaizduota 3.28 paveiksle, tiek po 1 val. inkubacijos, tiek po 24 val. inkubacijos, visos tirtos PVP-Ag-ND koncentracijos indukavo statistiškai reikšmingą DNR pažeidų kiekio padidėjimą, lyginant su tirpiklio kontrole. Kaip ir tikėtasi, DNR pažeidų kiekis buvo nuo 3 iki 5 kartų didesnis, po 24 val. inkubacijos, lyginant su DNR pažeidų kiekiu po trumpalaikės inkubacijos (1 val.). Be to, tik po 24 val. poveikio nustatyta reikšminga DNR pažeidų kiekio priklausomybė nuo PVP-Ag-ND koncentracijos ( $P < 0,001$ , Jonckheere-Terpstra testas). Įdomu tai, kad tiek po ilgalaikės, tiek po trumpalaikės inkubacijos su

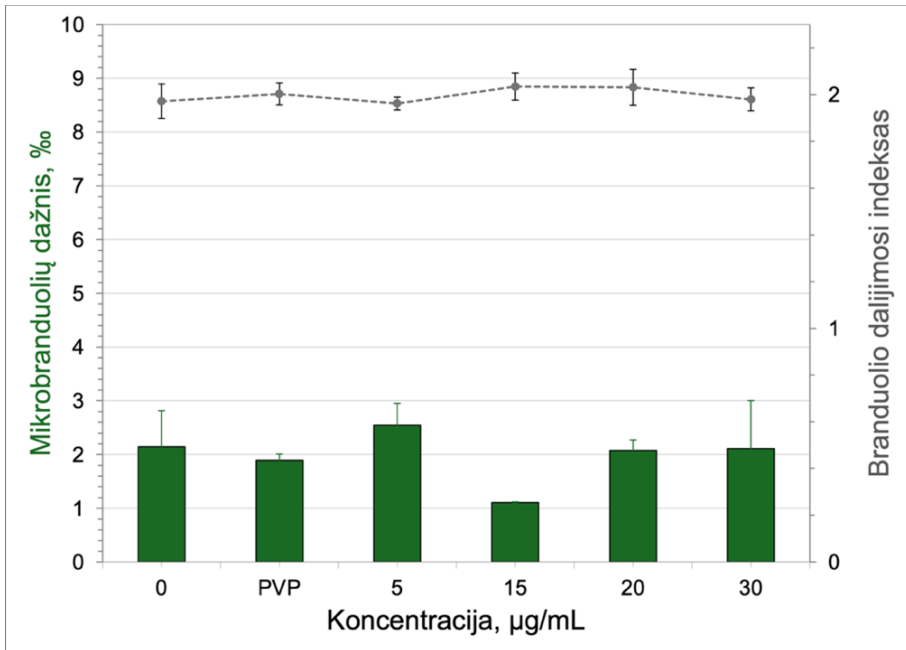
PVP-Ag-ND, nustatyti reikšmingi skirtumai tarp donorų (atitinkamai,  $P < 0,001$  ir  $P = 0,005$ , Dvifaktorinė ANOVA) (S4 priedų lentelė).



**3.28 pav.** DNR kiekis (%) kometos uodegoje periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles 1 val. ir 24 val. paveikus skirtingomis PVP-Ag-ND koncentracijomis. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su tirpiklio (PVP) kontrole, žymimas (\*) ( $n=5$ )

**Fig. 3.28.** Percentage of DNA in a comet tail of human PBMCs after 1 and 24 h of exposure to 35 nm PVP-Ag-NPs. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ), compared to the solvent control (PVP) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=5$ ). X-axis – concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ), Y-axis – tail intensity (%)

35 nm dydžio PVP-Ag-ND sukeltos chromosominės pažaidos ir įtaka ląstelių proliferacijai buvo vertinamos sustabdytos citokinezės mikrobranduolių metodu (3.29 pav.). 3 donorų periferinis kraujas (D2, D6, D9) buvo veikiamas skirtingomis 35 nm dydžio PVP-Ag-ND koncentracijomis (5–30  $\mu\text{g/mL}$ ), 24 ląstelių kultūros augimo valandą. Kaip teigiama kontrolė naudotas dokсорubicinas (45  $\mu\text{g/mL}$ ), kuris reikšmingai padidino ląstelių su mikrobranduoliais (MB) dažnį –  $7,73 \pm 0,78$  % ( $\% \pm \text{SEM}$ ).



**3.29 pav.** Mikrobranduolių dažnis dvibranduolėse ląstelėse ir branduolio dalijimosi indeksas (BDI), periferinio kraujo limfocitus paveikus PVP-Ag-ND. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM) ( $n=3$ )

**Fig. 3.29.** Frequency of micronuclei in binucleated cells and nuclear division index of human lymphocytes after exposure to 35 nm PVP-Ag-NPs. Error bars represent standard error of the mean (SEM) ( $n=3$ ). X-axis – concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ), Y-axis – frequency of micronuclei (%), secondary Y-axis – NDI / CBPI

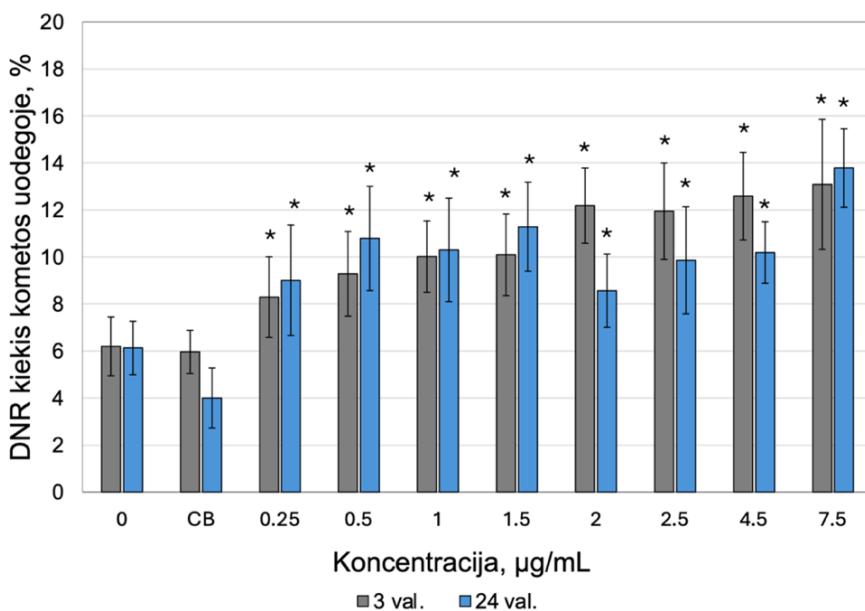
Po poveikio PVP-Ag-ND reikšminga priklausomybė tarp ND koncentracijos ir MB dažnio nebuvo nustatyta ( $P = 0,55$ , Jonckheere-Terpstra testas). Be to, nei viena tirta nanodalelių koncentracija neindukavo nei reikšmingo mikrobranduolių dažnio padidėjimo, nei reikšmingų proliferacijos indekso pokyčių – apskaičiuotas nanodalelių citotoksiškumas neviršijo 4 % (3.29 pav., S6 priedų lentelė). Tačiau, dvifaktoringe ANOVA analize nustatyta statistiškai reikšminga donorų įtaka mikrobranduolių formavimosi dažniui ir branduolio dalijimosi indeksui ( $P = 0,02$ ) (S5 priedų lentelė).

#### 3.4.2 Aukso nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai

Tyrimė naudotos trijų tipų aukso nanodalelės (Au-ND) – 5 nm dydžio sferos, 40 nm dydžio sferos ir 10 nm dydžio nanovamzdeliai.

Dalelių citotoksiškumas tirtas AO/EB dažų mišiniu, o genotoksiškumas įvertintas šarminiu kometos metodu. Kadangi 10 nm nanovamzdeliai turėjo citotoksišią poveikį, tolimesni tyrimai su jais nebuvo atliekami. Priešingai, nei viena tirta 5 nm (0,25–7,5 µg/mL) ir 40 nm (0,25–4,5 µg/mL) Au-ND koncentracija neturėjo reikšmingos įtakos ląstelių gyvybingumui (S7 priedų lentelė). Kaip teigiama kontrolė naudotas vandenilio peroksido tirpalas (20 µM), kuris nesumažino ląstelių gyvybingumo, tačiau sukėlė statistiškai reikšmingą %TDNR padidėjimą ( $14,80 \pm 0,81$  % ( $\% \pm \text{SEM}$ )). Kaip tirpiklio kontrolė naudotas citratinis buferis – CB (0,2 %).

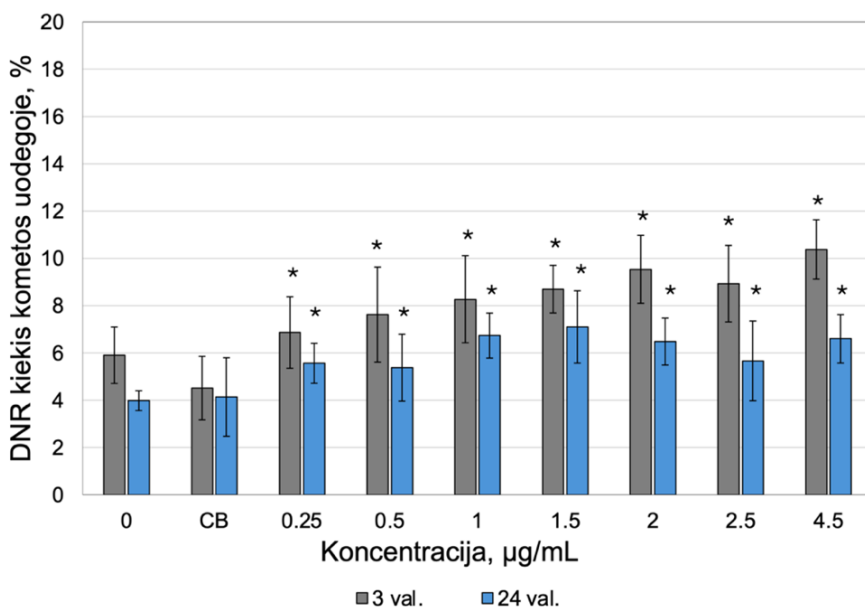
Šarminiu kometos metodu nustatyta, kad po 3 val. ir 24 val. poveikio, visos tirtos 5 nm dydžio nanodalelių koncentracijos sukėlė statistiškai reikšmingus DNR pažeidimų kiekio padidėjimus, lyginant su tirpiklio kontrole. Be to, nepriklausomai nuo inkubacijos laiko su ND, nustatyta, statistiškai reikšminga priklausomybė tarp 5 nm dydžio Au-ND koncentracijų ir DNR pažeidimų masto ( $P < 0,0001$ , Jonckheere-Terpstra testas) (3.30 pav.).



**3.30 pav.** DNR kiekis (%) kometos uodegoje periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles 3 val. ir 24 val. paveikus skirtingomis 5 nm dydžio Au-ND koncentracijomis. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su tirpiklio kontrole (CB), žymimas (\*) ( $n=5$ )

**Fig. 3.30.** Percentage of DNA in a comet tail of human PBMCs after 3 and 24 h of exposure to 5 nm Au-NPs. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ), compared to the solvent control (CB) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=5$ ). X-axis – concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ), Y-axis – tail intensity (%)

Kaip pavaizduota 3.31 paveiksle, visos tirtos 40 nm dydžio aukso nanodalelių koncentracijos taip pat indukavo reikšmingą DNR pažeidimų kiekio padidėjimą, lyginant su tirpiklio kontrole. Taip pat, dozinė priklausomybė nustatyta tiek po 3 val. ( $P=0,0002$ , Jonckheere-Terpstra testas), tiek po 24 val. poveikio ( $P = 0,008$ ).



**3.31 pav.** DNR kiekis (%) kometos uodegoje periferinio kraujo vienbranduoles ląstelės 3 val ir 24 val. paveikus skirtingomis 40 nm dydžio Au-ND koncentracijomis. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su tirpiklio kontrole (CB), žymimas (\*) ( $n=5$ )

**Fig. 3.31.** Percentage of DNA in a comet tail of human PBMCs after 3 and 24 h of exposure to 40 nm Au-NPs. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ), compared to the solvent control (CB) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=5$ ). X-axis – concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ), Y-axis – tail intensity (%)

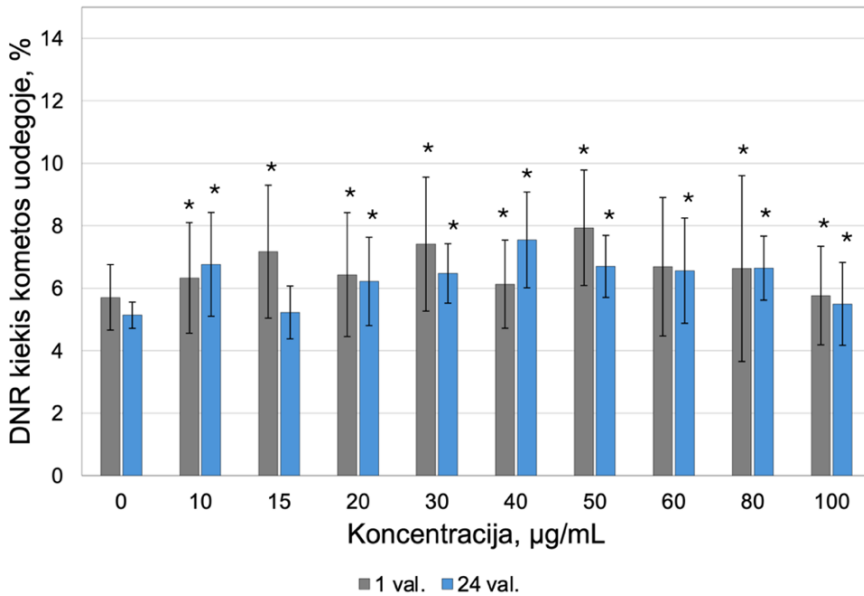
Apibendrinant gautus rezultatus, 10 nm dydžio aukso nanovamzdeliai pasižymėjo citotoksiniu efektu ŽPKVL. Priešingai, 5 ir 40 nm dydžio sferos formos Au-ND, nepriklausomai nuo inkubacijos laiko, ląstelių gyvybingumą sumažino nereikšmingai. Šarminiu kometos metodu gautų duomenų analizė Wilcoxon Signed-Rank testu parodė, kad 5 nm dydžio ND indukavo statistiškai reikšmingai daugiau DNR pažeidimų nei didesnės, 40 nm dydžio ND ( $P = 0,004$  (po 3 val.) ir  $P = 0,008$  (po 24 val.)). Taip pat pastebėta statistiškai reikšminga priklausomybė tarp 5 ir 40 nm dydžio Au-ND koncentracijų ir DNR pažeidimų kiekio tiek po 3 val., tiek ir po 24 val. poveikio. Tačiau, dvifaktoriinė ANOVA analizė atskleidė, kad DNR pažeidimų kiekis reikšmingai skyrėsi ne tik tarp skirtingomis ND koncentracijomis

paveiktų mėginių, bet ir tarp skirtingų donorų ( $P < 0,05$ ) (S8 priedų lentelė).

### 3.4.3 Aliuminio oksido nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai

Aliuminio oksido nanodalelių genotoksiškumas buvo įvertintas šarminiu kometos ir sustabdytos citokinezės mikrobranduolių metodais. Šarminio kometos tyrimo metu, penkių donorų (D2, D3, D6, D7, D9 – 13 nm ir D2, D3, D5, D7, D9 – 50 nm) periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės, 1 val. ir 24 val. buvo veikiamos skirtingomis  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$  koncentracijomis (0–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Nanodalelių citotoksiškumas nustatytas panaudojus AO / EB dažų mišinį. Kaip teigiama kontrolė naudotas vandenilio peroksido tirpalas (20  $\mu\text{M}$ ), kuris neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui, tačiau reikšmingai padidino DNR pažeidimų kiekį ( $11,17 \pm 3,40$  % ( $\% \pm \text{SEM}$ )).

Nepriklausomai nuo nanodalelių dydžio, nei viena tirta  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$  koncentracija neturėjo reikšmingos įtakos ląstelių gyvybingumui (S9 priedų lentelė). Kaip pavaizduota 3.32 pav., beveik visos tirtos, 13 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$  koncentracijos sukėlė reikšmingą pirminių DNR pažeidimų kiekio padidėjimą, lyginant su neigiama kontrole tiek po trumpalaikės, tiek po ilgalaikės (išskyrus 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) inkubacijos. Tačiau, statistškai reikšminga dozinė priklausomybė nustatyta nebuvo.

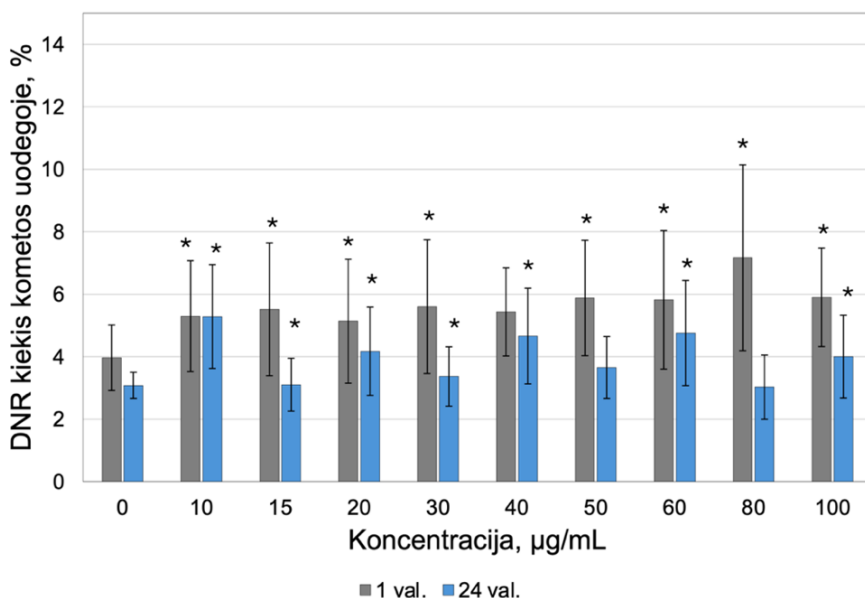


**3.32 pav.** DNR kiekis (%) kometos uodegoje periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles 1 val. ir 24 val. paveikus skirtingomis 13 nm dydžio  $Al_2O_3$ -ND koncentracijomis. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole, žymimas (\*)

**Fig. 3.32.** Percentage of DNA in a comet tail of human PBMCs after 1 and 24 h of exposure to 13 nm  $Al_2O_3$ -NPs. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ), compared to the untreated control (0 µg/mL) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=5$ ). X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – tail intensity (%)

Panaši tendencija stebėta ir tyrimuose su didesnėmis, 50 nm dydžio  $Al_2O_3$ -ND. Po trumpalaikio poveikio (1 val.), viena (40 µg/mL), o po 24 val. poveikio dvi (50 ir 80 µg/mL) ND koncentracijos nesukėlė reikšmingo DNR pažeidimų kiekio padidėjimo, lyginant su neigiama kontrole (3.33 pav.). Įdomu tai, kad po 1 val. poveikio stebėta silpna, tačiau reikšminga priklausomybė tarp ND koncentracijos ir DNR pažeidimų kiekio ( $P = 0,045$ , Jonckheere-Terpstra testas), o po 24 val. reikšminga priklausomybė stebėta nebuvo.





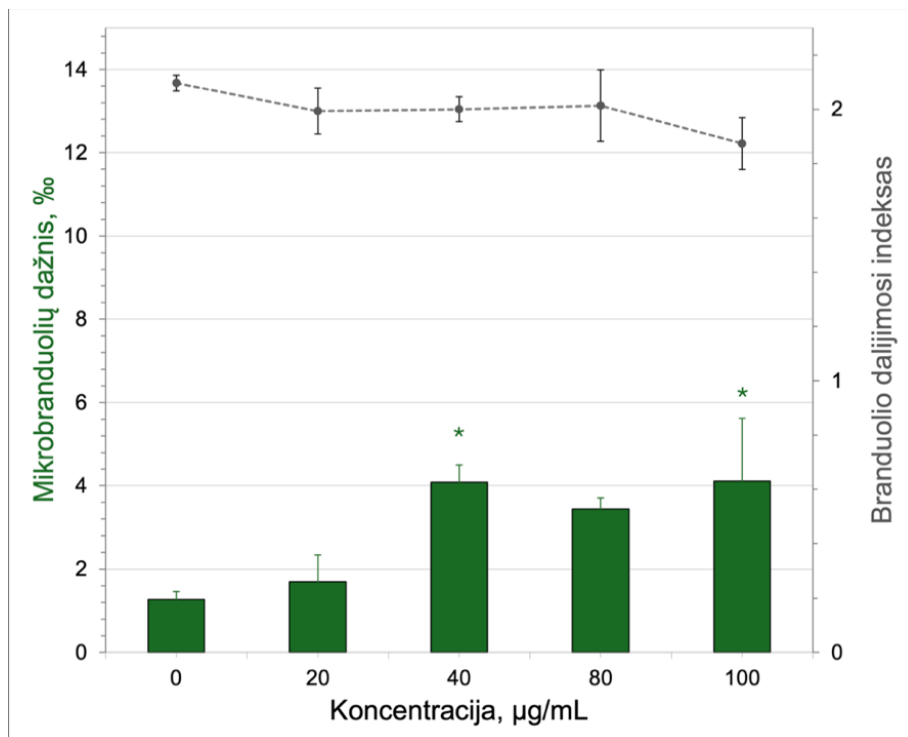
**3.33 pav.** DNR kiekis (%) kometos uodegoje periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles 1 val. ir 24 val. paveikus skirtingomis 50 nm dydžio  $Al_2O_3$ -ND koncentracijomis. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole, žymimas (\*) ( $n=5$ )

**Fig. 3.33.** Percentage of DNA in a comet tail of human PBMCs after 1 and 24 h of exposure to 50 nm  $Al_2O_3$ -NPs. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ), compared to the untreated control (0 µg/mL) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=5$ ). X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – tail intensity (%)

Atlikus duomenų analizę Wilcoxon Signed-Rank testu nustatyta, kad 13 nm dydžio ND indukavo statistiškai reikšmingai daugiau DNR pažaidų nei didesnės, 50 nm dydžio ND ( $P = 0,01$  (po 1 val.) ir  $P = 0,002$  (po 24 val.)). Įdomu tai, kad atlikus dvifaktoriinę ANOVA analizę, nepriklausomai nuo nanodalelių dydžio ar inkubacijos su ND laiko, reikšmingų skirtumų, tarp ND koncentracijų nenustatyta. Tuo tarpu, nustatyti reikšmingi skirtumai tarp donorų ( $P < 0,001$ , dvifaktoriinė ANOVA) (S10 priedų lentelė).

Sustabdytos citokinezės mikrobranduolių tyrimo metu, periferinio kraujo limfocitai iš trijų donorų (D2, D7, D9), 24 ląstelių kultūros augimo valandą buvo veikiami skirtingomis 13 nm (3.34 pav.)

ir 50 nm (3.35 pav.) dydžio  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$  koncentracijomis (0–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Kaip teigiama kontrolė naudotas dokсорubicinas (45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), kuris reikšmingai padidino ląstelių su mikrobranduoliais (MB) dažnį –  $13,6 \pm 3,4 \%$  ( $\% \pm \text{SEM}$ ).

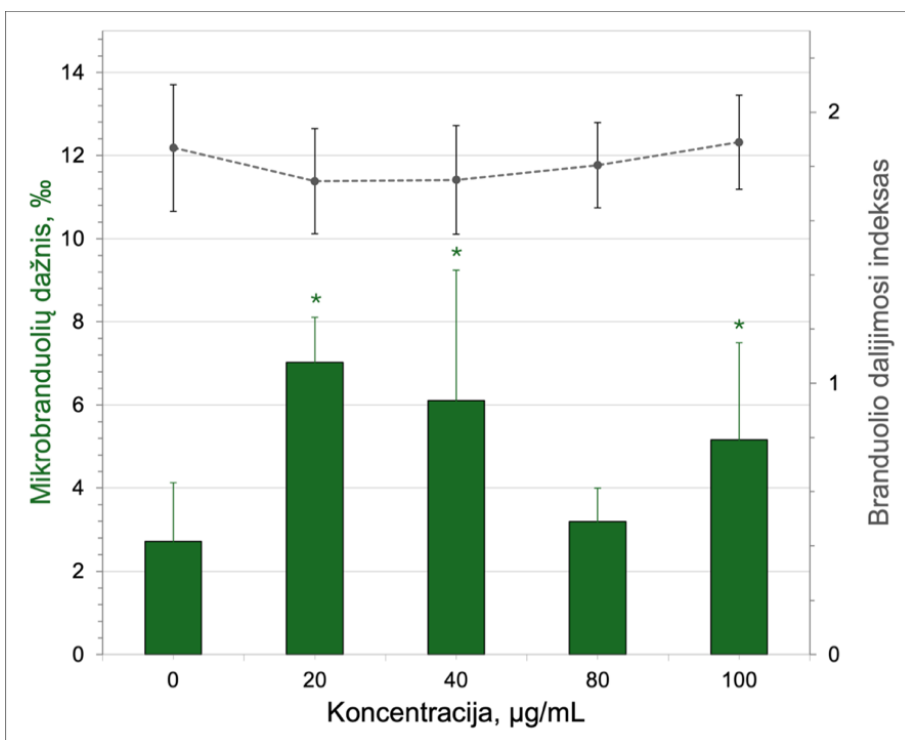


**3.34 pav.** Mikrobranduolių dažnis dvibranduolėse ląstelėse ir branduolio dalijimosi indeksas (BDI), periferinio kraujo limfocitus paveikus 13 nm dydžio  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$ . Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole, žymimas (\*) ( $n=3$ )

**Fig. 3.34.** Frequency of micronuclei in binucleated cells and nuclear division index of human lymphocytes after exposure to 13 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-NPs}$ . Error bars represent standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ) compared to the untreated control (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=3$ ). X-axis – concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), Y-axis – frequency of micronuclei (%), secondary Y-axis – NDI / CBPI

Kaip pavaizduota 3.34 pav., dvi tirtos 13 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$  koncentracijos (40 ir 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) indukavo reikšmingą mikrobranduolių dažnio padidėjimą. Lyginant su neigiama kontrole, mikrobranduolių dažnis padidėjo, atitinkamai 3,2 ir 2,7 kartus. Be to,

nustatyta statistiškai reikšminga priklausomybė tarp MB dažnio ir 13 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND koncentracijų (P = 0,006, Jonckheere-Terpstra testas). Atlikus branduolio dalijimosi indekso duomenų ir ND citotoksiškumo analizę nustatyta, kad nei viena ND koncentracija neturėjo reikšmingos įtakos BDI ir ląstelių gyvybingumui – didžiausia tirta koncentracija (100 µg/mL) ląstelių gyvybingumą sumažino iki 80 % (S11 priedų lentelė).



**3.35 pav.** Mikrobranduolių dažnis dvibranduolėse ląstelėse ir branduolio dalijimosi indeksas (BDI), periferinio kraujo limfocitus paveikus 50 nm dydžio Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas (P < 0,05), palyginti su neigiama kontrole, žymimas (\*) (n=3)

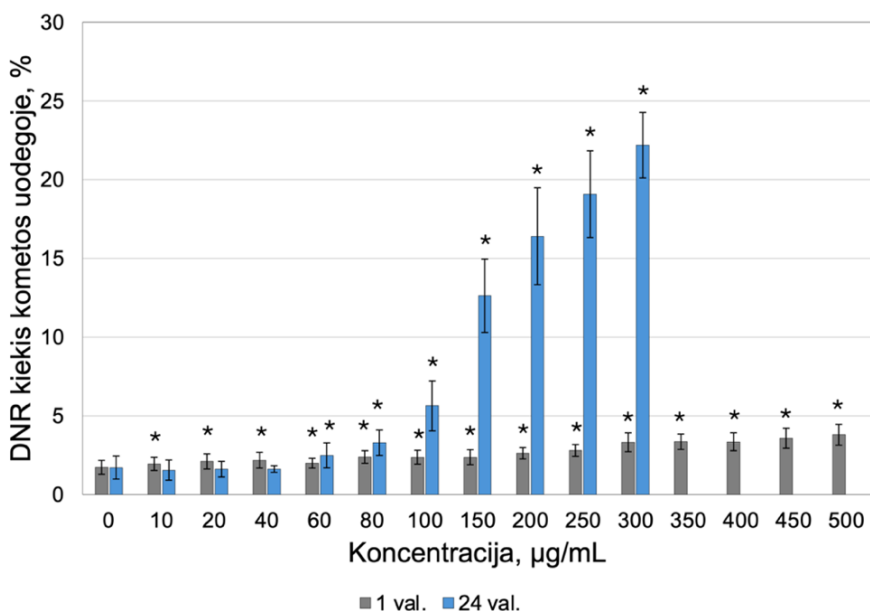
**Fig. 3.35.** Frequency of micronuclei in binucleated cells and nuclear division index of human lymphocytes after exposure to 50 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs. Error bars represent standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage (P < 0,05) compared to the untreated control (0 µg/mL) is indicated by an asterisk (\*) (n=3). X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – frequency of micronuclei (%), secondary Y-axis – NDI / CBPI

Tyrimuose su 50 nm dydžio  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-ND}$ , 20, 40 ir 100  $\mu\text{g/mL}$  koncentracijos statistiškai reikšmingai padidino mikrobranduolių dažnį žmogaus periferinio kraujo limfocituose (3.35 pav.). Lyginant su neigiama kontrole, mikrobranduolių dažnis padidėjo, atitinkamai, 2,6, 2,3 ir 1,9 kartus, tačiau dozinė priklausomybė nustatyta nebuvo ( $P = 0,42$ , Jonckheere-Terpstra testas). Be to, nei viena tirta ND koncentracija neturėjo reikšmingos įtakos BDI ir ląstelių gyvybingumui, nepriklausomai nuo ND koncentracijos, ląstelių gyvybingumas visais atvejais buvo aukštesnis nei 85 % (S11 priedų lentelė).

#### 3.4.4 Silicio dioksido nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai

5 donorų periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės (D2, D3, D6, D7, D9), 1 ir 24 val. veiktos skirtingomis  $\text{SiO}_2\text{-ND}$  koncentracijomis (0–500  $\mu\text{g/mL}$ ). Kaip teigiama kontrolė naudotas vandenilio peroksido tirpalas (20  $\mu\text{M}$ ), kuris neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui, tačiau sukėlė statistiškai reikšmingą %TDNR padidėjimą.

Nustatyta, kad po 1 val. inkubacijos, visos tirtos ND koncentracijos, didesnės nei 150  $\mu\text{g/mL}$  statistiškai reikšmingai sumažino ląstelių gyvybingumą (S12 priedų lentelė). Nepaisant to, gyvybingumas nesumažėjo daugiau nei 20 %, tad tolimesni tyrimai su šiomis ND koncentracijomis buvo tęsiami. Po ilgalaikės inkubacijos, visos tirtos  $\text{SiO}_2\text{-ND}$  koncentracijos didesnės nei 60  $\mu\text{g/mL}$ , reikšmingai sumažino ląstelių gyvybingumą, o koncentracijos didesnės nei 300  $\mu\text{g/mL}$  gyvybingumą sumažino daugiau nei 20 %, lyginant su neigiama kontrole (S12 priedų lentelė). Dėl to tolimesni DNR pažaidų tyrimai po 24 val. poveikio buvo vykdyti su 10–300  $\mu\text{g/mL}$   $\text{SiO}_2\text{-ND}$  koncentracijomis (3.36 pav.).



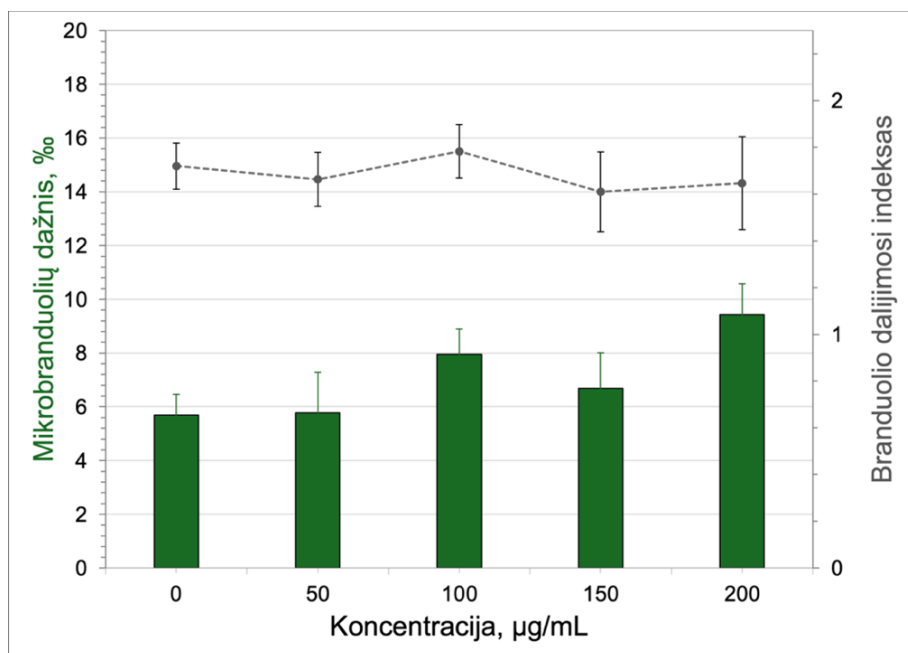
**3.36 pav.** DNR kiekis (%) kometos uodegoje periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles 1 val. ir 24 val. poveikus skirtingomis SiO<sub>2</sub>-ND koncentracijomis. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole (0 µg/mL), žymimas (\*)

**Fig. 3.36.** Percentage of DNA in a comet tail of human PBMCs after 1 and 24 h of exposure to 10–20 nm SiO<sub>2</sub>-NPs. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ), compared to the untreated control (0 µg/mL) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=5$ ). X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – tail intensity (%)

Kaip pavaizduota 3.36 pav., nepriklausomai nuo inkubacijos laiko, visos tirtos SiO<sub>2</sub>-ND koncentracijos indukavo statistiškai reikšmingą ir nuo koncentracijos priklausomą DNR pažeidimų kiekio padidėjimą ( $P < 0,001$ , Jonckheere-Terpstra testas). Po 24 val. poveikio, koncentracijos, didesnės nei 100 µg/mL sukėlė, nuo 2,4–5,9 kartų daugiau DNR pažeidimų, nei tos pačios koncentracijos po 1 val. poveikio. Be to, reikšmingi skirtumai buvo stebėti ne tik tarp tirtų ND koncentracijų, bet ir tarp donorų, po 1 val. ir 24 val. poveikio (atitinkamai,  $P = 0,02$  ir  $P = 0,0001$ , dvifaktorinė ANOVA) (S13 priedų lentelė).

SiO<sub>2</sub>-ND genotoksiškumas ir įtaka ląstelių proliferacijos greičiui papildomai įvertinta sustabdytos citokinezės mikrobranduolių metodu

(3.37 pav.). Periferinis kraujas iš 3 skirtingų donorų (D2, D6, D7) buvo veiktas skirtingomis SiO<sub>2</sub>-ND koncentracijomis (50–200 µg/mL), 24-ą kultūros augimo valandą. Kaip teigiama kontrolė naudotas doksorubicinas (45 µg/mL), kuris reikšmingai padidino ląstelių su mikrobranduoliais (MB) dažnį – 28,3±10,2 ‰ (‰±SEM).



**3.37 pav.** Mikrobranduolių dažnis dvibranduolėse ląstelėse ir branduolio dalijimosi indeksas (BDI), periferinio kraujo limfocitus paveikus SiO<sub>2</sub> ND. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM) (n=3)

**Fig. 3.37.** Frequency of micronuclei in binucleated cells and nuclear division index of human lymphocytes after exposure to 10–20 nm SiO<sub>2</sub>-NPs. Error bars represent standard error of the mean (SEM) (n=3). X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – frequency of micronuclei (‰), secondary Y-axis – NDI / CBPI

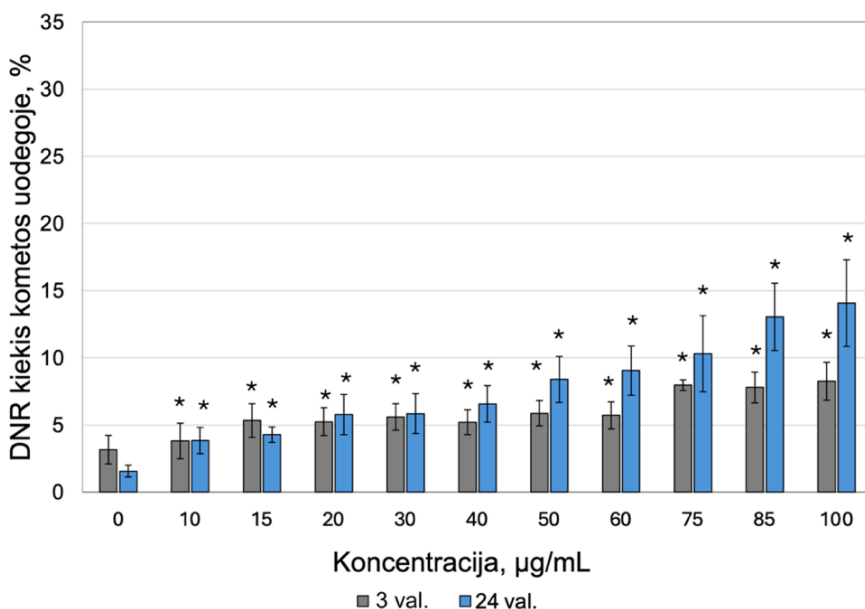
Nors buvo nustatyta statistiškai reikšminga priklausomybė tarp nanodalelių koncentracijos ir mikrobranduolių dažnio (P = 0,01, Jonckheere-Terpstra testas ), nei viena tirta SiO<sub>2</sub>-ND koncentracija reikšmingos įtakos mikrobranduolių dažniui neturėjo (3.37 pav.). Lyginant su neigiama kontrolė, mikrobranduolių dažnis ląstelėse, veiktose SiO<sub>2</sub> ND koncentracijomis (50, 100, 150 ir 200 µg/mL) padidėjo, atitinkamai tik 1, 1,4, 1,2 ir 1,7 kartus. Be to, nei viena SiO<sub>2</sub>-ND koncentracija neturėjo reikšmingos įtakos ląstelių branduolio

dalijimosi greičiui (3.37 pav.). Iš BDI duomenų apskaičiuavus tiriamųjų nanodalelių citotoksiškumą, nustatyta, kad SiO<sub>2</sub> ND nėra citotoksiškos žmogaus limfocitams. Stipriausią poveikį ląstelių gyvybingumui turėjo 150 ir 200 µg/mL ND koncentracijos, kurios ląstelių gyvybingumą sumažino nereikšmingai, iki, atitinkamai, 85 % ir 90 % (S14 priedų lentelė).

#### 3.4.5 Polistireno nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai

Polistireno nanodalelių citotoksiškumas ir įtaka pirminių DNR pažeidimų formavimuisi buvo įvertinta, atitinkamai, AO/EB testu ir šarminiu kometos metodu, 5 donorų (D2, D6, D7, D8, D9) periferinio kraujo limfocitus 3 val. ir 24 valandas veikiant skirtingomis PS-ND koncentracijomis (0–100 µg/mL). Kaip teigiama kontrolė naudotas vandenilio peroksido tirpalas (20 µM), kuris neturėjo įtakos ląstelių gyvybingumui, tačiau sukėlė statistiškai reikšmingą %TDNR padidėjimą (15,45±3,9 % (%±SEM)).

Nustatyta, kad nepriklausomai nuo inkubacijos laiko, nei viena tirta PS-ND koncentracija neturėjo reikšmingos įtakos ląstelių gyvybingumui (S15 priedų lentelė). Analizuojant šarminiu kometos metodu gautus rezultatus nustatytas nuo PS-ND koncentracijos priklausomas DNR pažeidimų kiekio didėjimas po 3 ir 24 val. poveikio ( $P < 0,001$ , Jonckheere-Terpstra testas). Visos tirtos PS-ND koncentracijos reikšmingai padidino DNR pažeidimų kiekį, palyginti su neigiama kontrole (3.38 pav.). Be to, nustatyta, kad DNR pažeidimų kiekiui reikšmingos įtakos turėjo ne tik skirtingos PS-ND koncentracijos, bet ir skirtingi donoriai ( $P < 0,001$ , dvifaktorinė ANOVA) (S16 priedų lentelė).



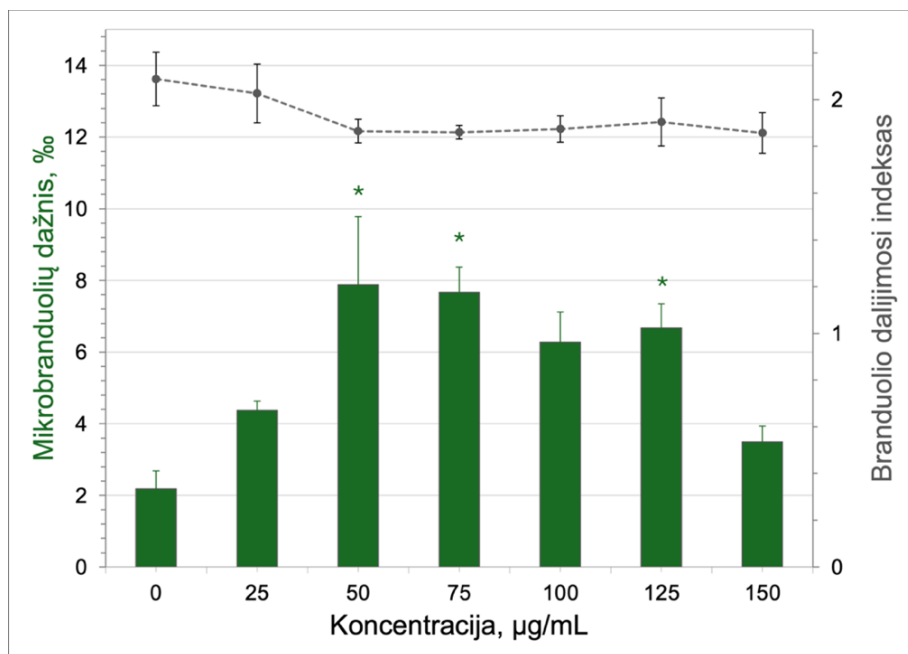
**3.38 pav.** DNR kiekis (%) kometos uodegoje periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles 3 val. ir 24 val. paveikus skirtingomis polistireno nanodalelių koncentracijomis. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole, žymimas (\*) ( $n=5$ ).

**Fig. 3.38.** Percentage of DNA in a comet tail of human PBMCs after 3 and 24 h of exposure to 80 nm PS-NPs. Error bars represent the standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ), compared to the untreated control (0 µg/mL) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=5$ ). X-axis – concentration (µg/mL), Y-axis – tail intensity (%)

Siekiant įvertinti klastogeninį ir aneugeninį polistireno nanodalelių poveikį, atlikti sustabdytos citokinezės mikrobranduolių tyrimai ir įvertintas proliferacijos indeksas ląstelėse, paveiktose polistireno nanodalelėmis. 24-ą ląstelių augimo valandą, 3 donorų (D2, D7, D9) periferinis kraujas buvo paveiktas skirtingomis PS-ND koncentracijomis (25–125 µg/mL). Kaip teigiama kontrolė naudotas doksorubicinas (45 µg/mL), kuris statistiškai reikšmingai padidino MB dažnį. Kelios polistireno nanodalelių koncentracijos (50, 75, 125 µg/mL) indukavo statistiškai reikšmingą mikrobranduolių dažnio padidėjimą – lyginant su neigiama kontrole, mikrobranduolių dažnis padidėjo, atitinkamai, 3,6, 3,5 ir 3,1 kartus (3.39 pav.). Tačiau



reikšminga priklausomybė tarp MB dažnio ir ND koncentracijų nebuvo nustatyta ( $P = 0,12$ , Jonckheere-Terpstra testas).



**3.39 pav.** Mikrobranduolių dažnis dvibranduolėse ląstelėse ir ląstelių proliferacijos indeksas, periferinio kraujo limfocitus paveikus PS-ND. Paklaidų juostos žymi standartinę paklaidą (SEM). Statistiškai reikšmingas skirtumas ( $P < 0,05$ ), palyginti su neigiama kontrole žymimas (\*) ( $n=3$ )

**Fig. 3.39.** Frequency of micronuclei in binucleated cells and nuclear division index of human lymphocytes after exposure to 80 nm PS-NPs. Error bars represent standard error of the mean (SEM). Statistically significant DNA damage ( $P < 0,05$ ) compared to the untreated control (0  $\mu\text{g/mL}$ ) is indicated by an asterisk (\*) ( $n=3$ ). X-axis – concentration ( $\mu\text{g/mL}$ ), Y-axis – frequency of micronuclei (%), secondary Y-axis – NDI / CBPI

Analizuojant PS ND įtaką ląstelių branduolio dalijimosi indeksui, nustatytas nuo ND koncentracijos priklausomas BDI sumažėjimas (3.39 pav.). Be to, panaudojant BDI duomenis buvo apskaičiuotas tirtų nanodalelių citotoksiškumas. Nustatyta, kad didžiausios tirtos PS ND koncentracijos (100, 125 ir 150  $\mu\text{g/mL}$ ) ląstelių gyvybingumą sumažino labiausiai, iki, atitinkamai, 80 %, 83 % ir 79 % (S17 priedų lentelė).

#### 4. REZULTATŲ APITARIMAS

Šiame darbe tirta 11 skirtingų nanodalelių tipų: kobalto oksido (10–30 nm ir <50 nm), sidabro (13 nm ir 35 nm), aukso (5 nm sferos, 10 nm nanovamzdeliai ir 40 nm sferos), aliuminio oksido (13 nm ir 50 nm), silicio dioksido (10–20 nm) ir polistireno (80 nm) nanodalelės. Tyrimo metu buvo įvertintas šių dalelių gebėjimas patekti į žmogaus periferinio kraujo vienbranduolės ląsteles (ŽPKVL) ir sukelti citotoksinį ir (arba) genotoksinį poveikį.

Nanodalelių sekimo analizės testu nustatyta, kad visos tirtosios nanodalelės buvo linkę aglomeruoti ląstelių mitybinėje terpėje ir dažniausiai buvo didesnės nei jų pirminis dydis. Nanodalelių aglomeracijos lygis gali turėti įtakos jų toksiškumui, tačiau vieningos nuomonės šia tema nėra. Murugadoss su kolegomis [121] tyrė  $\text{TiO}_2$  nanodalelių mažų ir didelių aglomeratų toksiškumą ir nustatė, kad dažniausiai skirtumai tarp šių aglomeratų aktyvumo buvo statistiškai nereikšmingi. Tačiau reikšmingi skirtumai buvo stebėti tyrimuose su THP-1 ląstelėmis, kur dideli  $\text{TiO}_2$  aglomeratai sukėlė daugiau pažaidų nei maži. Dėl fagocitinių ląstelių sąvybių, THP-1 ląstelės yra linkusios efektyviau įsisavinti submikroninio ir mikroninio dydžio aglomeratus, dėl to buvo stebima efektyvesnė didelių aglomeratų viduląstelinė internalizacija ir didesnis pažaidų kiekis, palyginant su poveikiu mažaisiais  $\text{TiO}_2$  aglomeratais. Mūsų atliktame tyrime buvo naudojamos periferinio kraujo vienbranduolės ląstelės, kur didžioji dalis ląstelių yra limfocitai ir nedidelė dalis monocitų [122], o tai galėtų paaiškinti šiek tiek efektyvesnę didesnių aglomeratų internalizaciją ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ir t.t.), palyginti su mažesniais (Au). Magdolenova su kolegomis [123] nustatė, kad didesni ND aglomeratai yra mažiau stabilūs, todėl pavienės nanodalelės gali nesudėtingai atsipalaiduoti nuo didžiojo aglomerato ir patekti į ląstelės vidų. Be to, dideli aglomeratai yra linkę greičiau nusėsti į mėgintuvėlio dugną, o tai gali sukelti didesnę realų poveikį ir stipresnę toksiškumą, palyginti su neaglomeravusiomis dalelėmis. Minėtas Magdolenovos ir kolegų tyrimas parodė, kad didesni aglomeratai sukėlė reikšmingai daugiau DNR pažaidų visose tirtose *in*

*vitro* sistemose, o mėginiai su mažesniais ND aglomeratais genotoksiško poveikio neturėjo [123]. Taigi, nuomonės apie tai, ar nanodalelių aglomeracija padidina ND toksiškumą, vis dar yra įvairios. Manome, kad nors aglomeracija kai kuriais atvejais gali palengvinti ND viduląstelinę internalizaciją, toksiškumui įtakos turi keletas veiksnių ir jų kombinacijos, ne tik ND aglomeracija.

Nanodalelės, patekusios į organizmą, gali sąveikauti su ląstelių membranos komponentais ir patekti į ląstelės vidų endocitozės būdu [7]. Mūsų tyrimo metu buvo nustatyta, kad kobalto oksido ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ ) nanodalelės, nepriklausomai nuo dydžio (10–30 nm ar <50 nm), po 24 val. inkubacijos, geba efektyviai patekti į ŽPKVL. Įdomu tai, kad didesnės nanodalelės, kurių pirminis dydis buvo <50 nm, į ląsteles pateko efektyviau, palyginti su mažesnėmis. Mokslinėje literatūroje teigiama, kad optimalus nanodalelių dydis turėtų būti apie 50 nm dydžio, kad šios efektyviai patektų į ląsteles [58,72,124] ir tai visiškai atitinka mūsų tyrime gautus rezultatus. Kobalto ir kobalto oksido nanodalelių viduląstelinė internalizacija buvo patvirtinta V79, ECV-304 ir HepG2 ląstelių linijose [125,126]. Tačiau rasta tik keletas tyrimų su žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėmis ląstelėmis: Chattopadhyay ir kolegų [127] darbas, kurio metu buvo patvirtintas CoO nanodalelių patekimas į žmogaus periferinio kraujo limfocitus (PKL) po 8 ir 12 valandų poveikio. Taip pat CoO nanodalelių patekimas į PKL buvo patvirtintas Colognato ir kt. [128]. Nanodalelės, patekusios į organizmą, gali tiesiogiai arba netiesiogiai pažeisti DNR. Vienas iš pagrindinių veiksnių, turinčių įtakos nanodalelių genotoksiškumui yra reaktyviųjų deguonies formų indukavimas [129]. Mūsų tyrime nustatyta, kad <50 nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND indukavo ROS formavimąsi, kai 10–30 nm dydžio nanodalelėmis paveiktose ląstelėse ROS lygis pakilo nežymiai, palyginti su neigiama kontrole. Anksčiau atliktuose tyrimuose buvo patvirtintas kobalto ir kobalto oksido nanodalelių gebėjimas indukuoti ROS formavimąsi ir pažeisti DNR [26,130–133]. Po 72 val. poveikio su  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND, žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse stebėtas išaugęs visų tirtųjų priešūždegiminių citokinų kiekis [130]. Taip pat nustatytas didesnis

ROS lygis limfocituose, po poveikio CoO ND [133]. Teigiama, kad nuo kobalto oksido nanodalelių atsipalaiduoja  $\text{Co}^{++}$  jonai, gebantys aktyvinti NADPH oksidazes ir indukuoti ROS formavimąsi [133]. Padidėjęs ROS kiekis buvo stebėtas žiurkių skilvelių monocituose po 1 val. poveikio  $\text{Co}_3\text{O}_4$  ND (5 ir 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [131] ir HepG2 ląstelėse po 48 val. poveikio (10 ir 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [132]. Taigi kobalto ir kobalto oksido nanodalelės gali sukelti oksidacinį stresą ir indukuoti ROS formavimąsi įvairiose ląstelių linijose. Analizuojant  $\text{Co}_3\text{O}_4$  ND genotoksiškumo tyrimų rezultatus nustatyta, kad nepriklausomai nuo inkubacijos laiko (1 ar 24 val.)  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND sukėlė statistiškai reikšmingą ir, dažnu atveju, nuo koncentracijos priklausomą pirminių DNR pažeidimų kiekio didėjimą. To paties gamintojo nanodalelės (<50 nm, CAS number 1308-06-1, Sigma-Aldrich, Inc.) buvo tirtos ir kitų tyrėjų. Statistiškai reikšmingas DNR pažeidimų kiekio augimas po poveikio  $\text{Co}_3\text{O}_4$  ND buvo nustatytas V79 [126], A549, BEAS-2B [134] ir ŽPKVL [12]. Mūsų tyrime buvo nustatyta, kad <50 nm dydžio nanodalelės sukėlė daugiau pirminių DNR pažeidimų, palyginti su 10–30 nm dydžio  $\text{Co}_3\text{O}_4$  ND. Tokie rezultatai gali būti paaiškinami dėl efektyvesnio <50 nm ND patekimo į ŽPKVL ir gebėjimo indukuoti aukštesnį ROS lygį. Dauguma tyrimų, vertinančių kobalto ir kobalto oksido nanodalelių genotoksinį potencialą, yra atliekami su persėjamomis ląstelių kultūromis. Dėl to mūsų gauti rezultatai su pirminėmis žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėmis ląstelėmis, negali būti tiesiogiai lyginami su kitų tyrėjų darbais. Svarbu paminėti, kad Kometos testo metu, kai ŽPKVL yra veikiamos nanodalelėmis, jos yra  $G_0$  ląstelės ciklo stadijoje, o persėjamos ląstelės yra  $G_1$ , S arba  $G_2$  stadijose. Žinoma, kad nanodalelės su ląstelės branduoliu dažniausiai gali sąveikauti mitozės metu, kai branduolio membrana išnyksta. Taigi ląstelės ciklo stadija gali turėti įtakos ND patekimui į ląstelę ir toksiškumui, kur didžiausia viduląstelinė ND internalizacija stebima  $G_2/M$  stadijų metu, o mažiausia –  $G_0/G_1$  stadijose [11,135]. Nanodalelių genotoksinis potencialas gali pasireikšti dėl nanodalelių ir ląstelinių struktūrų, pvz., mitozinės verpstės, mechaninių sąveikų [11], o tai gali turėti įtakos ląstelių replikacijos ir proliferacijos greičiui ir

padidinti aneuploidijų tikimybę [136]. Sesorinių chromatidžių mainų ir mikrobranduolių testų rezultatai patvirtino, kad beveik visos tirtosios  $\text{Co}_3\text{O}_4$  ND koncentracijos sukėlė statistiškai reikšmingą ir, dažnu atveju, nuo koncentracijos priklausomą, chromosomų pažeidimų kiekio didėjimą. Kaip ir šarminio Kometos testo metu, didesnės,  $<50$  nm dydžio nanodalelės sukėlė daugiau chromosominių pažeidimų, palyginti su  $10\text{--}30$  nm  $\text{Co}_3\text{O}_4$  ND. Statistiškai reikšmingas MB dažnio didėjimas taip pat buvo nustatytas Uboldi ir kolegų darbe [13], BEAS-2B ląsteles paveikus didesnėmis  $\text{Co}_3\text{O}_4$  ND ( $\sim 397$  nm) [13]. Priešingai, Co-ND genotoksiškumas, MB testu, nebuvo patvirtintas periferinio kraujo limfocituose [128,137], tačiau šiuose tyrimuose naudotos koncentracijos buvo mažesnės ( $0,8\text{--}6$   $\mu\text{g/mL}$ ), lyginant su mūsų tyrimu ( $20\text{--}100$   $\mu\text{g/mL}$ ).

Sėkminga viduląstelinė internalizacija buvo patvirtinta ir tyrimuose su aliuminio oksido nanodalelėmis. Kaip ir tyrimuose su  $\text{Co}_3\text{O}_4$ , didesnės,  $50$  nm dydžio, dalelės į ŽPKVL pateko efektyviau, palyginti su mažesnėmis,  $13$  nm dydžio,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ND. Nors ROS kiekis po  $24$  val. poveikio pakito nežymiai, abiejų dydžių nanodalelės indukavo statistiškai reikšmingą DNR trūkių formavimąsi. Jalili ir kolegų tyrime nustatyta efektyvi  $30$  nm dydžio  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ND viduląstelinė internalizacija Caco-2 ir HepG2 ląstelėse, tačiau reikšmingo kiekio DNR trūkių šios dalelės neindukavo [138]. Reikšmingas pažeidimų kiekis nenustatytas ir žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse jas veikiant  $39$  nm [12] ir  $16$  nm dydžio  $\text{Al}_2\text{O}_3$  [139]. Priešingai, Sliwinka su kolegomis nustatė nuo koncentracijos priklausomą viengrandinių DNR trūkių ir oksidacinių DNR pažeidimų didėjimą limfocituose po  $24$  val. poveikio  $30$  nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ND [14]. Mikrobranduolių analizės metu nustatytas nuo koncentracijos priklausomas MB dažnio didėjimas, ląsteles veikiant  $13$  nm ND, kur dvi tirtosios koncentracijos ( $40$  ir  $100$   $\mu\text{g/mL}$ ) reikšmingai padidino MB dažnį. Tyrimuose su  $50$  nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ND, trys tirtosios koncentracijos indukavo reikšmingą MB dažnio padidėjimą, tačiau dozinė priklausomybė nustatyta nebuvo. Panaši tendencija stebėta ir CHO-K1 ląstelėse, kur visos tirtosios  $\approx 28$  nm dydžio  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ND indukavo reikšmingą ir nuo koncentracijos

priklausomą MB dažnio augimą [140]. Nors kiti tyrėjai teigia, kad  $\text{Al}_2\text{O}_3$  neturėjo reikšmingos įtakos mikrobranduolių formavimuisi *in vitro* ir *in vivo* [141,142], tačiau šiuose tyrimuose nebuvo vertintas nanodalelių patekimas į ląstelės vidų arba (*in vivo* atveju) pasiskirstymas audiniuose, taigi nėra aišku, ar nanodalelės iš tikrųjų nesukėlė genotoksinio poveikio, ar tiesiog nepasiekė taikinio ląstelės.

Tyrimuose su PVP dengtomis sidabro nanodalelėmis nustatyta, kad 13 nm dydžio nanodalelės pasižymėjo citotoksinu poveikiu ŽPKVL, dėl to tolimesni tyrimai su šiomis nanodalelėmis tęsiami nebuvo. Teigiama, kad mažesnio dydžio (5–28 nm) Ag-ND gali skatinti didesnę katepsinų praradimą lizosomose, indukuoti viduląstelinio  $\text{K}^+$  praradimą, superoksido kiekio didėjimą mitochondrijų membranose ir didesnių uždegiminių procesų indukciją, o tai gali lemti aukštesnę tokių ND citotoksiškumą [143]. Po 24 val. inkubacijos su 35 nm dydžio PVP-Ag-ND, nustatyta nuo koncentracijos priklausoma viduląstelinė ND internalizacija ir reikšmingas pirminių DNR pažaidų kiekio padidėjimas, be ROS indukcijos. Kiti tyrėjai taip pat demonstravo sėkmingą PVP-dengtų sidabro nanodalelių internalizaciją žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse [144–146]. Vukovic su kolegomis nustatė ne tik nuo koncentracijos priklausomą PVP-Ag ND internalizaciją po 1 ir 3 val. poveikio, bet ir reikšmingą pirminių DNR pažaidų kiekio padidėjimą ŽPKVL veikiant 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  koncentracija [144]. Taip pat, po 1 val. poveikio, PVP-Ag indukavo ROS formavimąsi ( $\text{H}_2\text{DCFDA}$ ), tačiau po 3 val. toks poveikis stebėtas nebuvo. Manoma, kad po ilgesnės inkubacijos, pavyzdžiui, 3 val. arba 24 val. (mūsų tyrimo atveju), ROS lygio mažėjimas gali būti siejamas su efektyviu ROS neutralizavimu dėl ląstelių antioksidacinės apsaugos [147]. Įdomu tai, kad kiti ROS aptikimo metodai, t.y. DHE ir  $\text{DiOC}_6$ , parodė reikšmingą ROS kiekio didėjimą po poveikio PVP-Ag ND [144]. Tai įrodo, kad ROS aptikimo metodų jautrumas ir specifiskumas gali turėti įtakos fiksuojamiems ROS tipams ir gaunamiems rezultatams. Priešingai, Rasmus su kolegomis ROS lygio pokyčius THP-1 monocituose tyrė  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  testu po 6 ir 24 val. poveikio 69 nm dydžio PVP-Ag nanodalelėmis ir nustatė reikšmingą ROS lygio

augimą [148]. Toks neatitikimas su mūsų gautais rezultatais gali būti aiškinamas skirtingu ląstelių jautrumu. Monocitai yra produktyvūs ROS gamintojai, žinomi dėl savo vaidmens tiesiogiai kovojant su patogenais, o mūsų tyrimuose, dėl natūraliai mažesnio monocitų kiekio kraujyje, vyrauja limfocitai [149]. PVP-Ag ND gebėjimas indukuoti pirmines DNR pažeidas buvo patvirtintas žmogaus plaučių epitelio ląstelėse BEAS-2B ir A549 [150,151], o PVA-Ag ND indukavo reikšmingą DNR pažeidų kiekį HepG2 ir ŽPKV ląstelėse [152]. Priešingai, tyrimuose su žmogaus bronchų 3D modeliu, 50 nm ir 200 nm PVP-Ag ND reikšmingo poveikio DNR pažeidų kiekiui neturėjo [153]. Palyginti su 2D modeliais, ND viduląstelinė internalizacija 3D modeliuose yra natūraliai mažesnė, kas gali lemti mažesnę DNR pažeidų lygį. Nors mūsų tyrime beveik visos tirtos PVP-Ag ND koncentracijos indukavo reikšmingą pirminių DNR pažeidų kiekio augimą, nė viena tirtoji koncentracija neturėjo įtakos chromosomų pažeidų dažniui, vertintam Sustabdytos citokinezės mikrobranduolių testu. Šarminiu kometos testu nustatomos pirminės DNR pažeidos, tokios kaip viengrandiniai ir dvigrandiniai DNR trūkiai [95]. DNR trūkiai gali būti ištaisyti ląstelės reparacijos sistemos. Dėl šios priežasties, Mikrobranduolių testu dažnai stebimas mažesnis DNR pažeidų kiekis, lyginant su šarminio Kometos testo rezultatais [154]. Ruiz-Ruiz su kolegomis tyrė 35 nm ir 50 nm dydžio PVP-Ag-ND gebėjimą indukuoti mikrobranduolių formavimąsi žmogaus periferinio kraujo limfocituose ir nustatė, kad nė viena tirtoji ND koncentracija neturėjo reikšmingos įtakos mikrobranduolių dažniui [155]. Panašūs rezultatai stebėti BEAS-2B ląstelėse, veiktose 42,5 nm dydžio PVP-Ag ND – nė viena tirta ND koncentracija nesukėlė statistškai reikšmingo mikrobranduolių dažnio didėjimo, tačiau indukavo reikšmingą ir nuo koncentracijos priklausomą pirminių DNR pažeidų augimą [150]. Tyrime teigiama, kad BEAS-2B ląstelės sėkmingai reparavo indukuotus DNR trūkius, tad chromosomų pažeidos aptiktos nebuvo. Tačiau, didelis kiekis viengrandinių ir dvigrandinių DNR trūkių gali viršyti ląstelės klaidų taisymo pajėgumą arba padidinti reparacijos klaidų tikimybę ir lemti chromosominių pažeidų atsiradimą [156]. Li

su kolegomis tyrė 5 nm dydžio Ag-ND genotoksiškumą TK6 ląstelėse ir nustatė nuo koncentracijos priklausomą mikrobranduolių dažnio didėjimą, kur 25 ir 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  koncentracijos indukavo statistiškai reikšmingą skirtumą [157]. Statistiškai reikšmingas ir nuo koncentracijos priklausomas MB dažnio didėjimas buvo nustatytas ir Li su kolegomis darbe [158], L5178Y ir TK6 ląstelių linijas veikiant 5 nm Ag-ND ir 5 nm PVP-Ag-ND. Tyrime teigiama, kad tirtųjų nanodalelių apvalkalas galėjo turėti reikšmingos įtakos genotoksiškumo rezultatams.

Tyrimuose su aukso nanodalelėmis nustatyta, kad 10 nm dydžio aukso nanovamzdeliai pasižymėjo citotoksiniu poveikiu ŽPKVL, dėl to tolimesni genotoksiškumo tyrimai su šiomis nanodalelėmis nebuvo tęsiami. Tyrime su A549 ląstelių linija nustatyta, kad aukso nanovamzdelių citotoksiškumas priklauso nuo naudojamos ND koncentracijos, kur pagrindinis veiksnys, lemiantis citotoksinę efektą yra oksidacinis stresas [159]. Analizuojant ND gebėjimą patekti į ŽPKVL buvo nustatyta, kad nepriklausomai nuo tirtų nanodalelių dydžio (5 ar 40 nm) Au-ND patekimas į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles yra ribotas. Taip pat, nė viena tirtoji ND koncentracija neturėjo įtakos ROS formavimuisi. Nanodalelių internalizacija aktyvina imunines ląsteles, įskaitant makrofagus ir neutrofilus, o tai gali skatinti reaktyviųjų deguonies formų formavimąsi [160]. Taigi, ribotas Au-ND patekimas į ląsteles gali paaiškinti ROS nebuvimą. Nepaisant to, abiejų dydžių ND indukavo statistiškai reikšmingą ir nuo koncentracijos priklausomą DNR pažaidų kiekį po 3 ir 24 val. poveikio. Be to, mažesnės, 5 nm dydžio, nanodalelės indukavo didesnę DNR trūkių kiekį, palyginti su didesnėmis, 40 nm dydžio Au-ND. May su kolegomis nustatė, kad 2–4 nm dydžio Au-ND efektyviai pateko į A549 ląsteles, bet, kaip ir mūsų atliktame tyrime, neindukavo ROS formavimosi ir po 24 val. poveikio sukėlė statistiškai reikšmingą DNR pažaidų kiekį [161]. Priešingai, Paino ir kolegų tyrime 18,2 nm Au-ND indukavo reikšmingą kiekį ROS HepG2 ir ŽPKV ląstelėse, tačiau neturėjo reikšmingos įtakos DNR pažaidoms [162]. Tokie prieštaringi rezultatai tik įrodo, kad nanodalelių



genotoksiškumas ir jo mechanizmas gali priklausyti nuo daugybės veiksnių, pvz., tiriamosios ląstelių linijos, nanodalelių sudėties, dydžio ir poveikio laiko. Aukso nanodalelių genotoksiškumas ir ND dydžio įtaka genotoksiškumui buvo patvirtinta kitų tyrėjų darbuose. Lebedova su kolegomis nustatė, kad 5 nm dydžio Au-ND sukėlė daugiau DNR pažeidimų HBEC ląstelėse nei 50 nm dydžio dalelės [120]. Taip pat 5 nm dydžio Au-ND indukavo nuo koncentracijos priklausomą DNR pažeidimų kiekį HepG2 ląstelėse, kai 20 ir 50 nm dydžio dalelės šio poveikio neturėjo [163]. Tokia ND dydžio įtaka jų genotoksiškumui gali būti paaiškinama tuo, kad mažesnio dydžio nanodalelės paprastai turi didesnę paviršiaus plotą ir didesnes katalizines savybes, lemiančias didesnę jų toksiškumą [164]. Taip pat, manoma, kad mažesnės aukso nanodalelės geba išskirti toksiškus jonus, kurie slopina tioredoksino reduktazės aktyvumą, taip pažeisdamos mitochondrijas ir sukeldamos DNR pažeidimus per antrinio genotoksiškumo mechanizmus [165].

Silicio dioksido nanodalelių tyrimuose stebėtas efektyvus ND pateikimas į ŽPKVL ir reikšminga pirminių DNR pažeidimų indukcija, tačiau ROS lygis ląstelėse po 24 val. poveikio SiO<sub>2</sub>-ND reikšmingai nepakito. Taip pat, mūsų tyrime buvo stebėtas nuo koncentracijos priklausomas MB dažnio augimas, tačiau nė viena tirtoji ND koncentracija MB dažnio statistiškai reikšmingai nepadidino. Mu ir kolegų tyrime gauti panašūs rezultatai A549, HT29 ir HaCaT ląstelių linijose, kur SiO<sub>2</sub>-ND efektyviai pateko į minėtas ląsteles ir indukavo reikšmingą DNR trūkių kiekio padidėjimą net esant mažoms ND koncentracijoms (0,1-10 µg/mL) [166]. Tyrime su 70 nm dydžio SiO<sub>2</sub>-ND, buvo stebėtas nuo ND koncentracijos priklausomas viduląstelinio ROS lygio augimas HaCaT ir TLR-1 ląstelėse, tačiau reikšmingas DNR pažeidimų kiekis nustatytas tik HaCaT ląstelėse [167]. Priešingai, nors 10–20 nm SiO<sub>2</sub>-ND gebėjo efektyviai patekti į ŽPKVL ir indukuoti ROS formavimąsi, reikšmingo poveikio ląstelių gyvybingumui arba DNR pažeidimų kiekiui stebėta nebuvo [12]. Be to, atlikus Chromosomų aberacijų testą, 100 µg/mL SiO<sub>2</sub>-ND koncentracija reikšmingos įtakos chromosominių pažeidimų dažniui neturėjo [12]. Panaši tendencija buvo nustatyta ir A549 ląstelių linijoje, kur nepriklausomai nuo nanodalelių

dydžio (16 ar 60 nm) ir poveikio laiko (15 min. ar 2 val.), reikšmingo ROS lygio ir DNR trūkių kiekio didėjimo stebėta nebuvo [168]. Gonzalez ir kolegų tyrime nebuvo stebėtas ir reikšmingas mikrobranduolių dažnio didėjimas po poveikio SiO<sub>2</sub>-ND [168]. Mūsų tyrime, didžiausią pirminių DNR pažaidų kiekį indukavo didžiosios ND koncentracijos (100–300 µg/mL, po 24 val. poveikio). Tačiau, svarbu paminėti, kad analizuojant Šarminio Kometos testo rezultatus, buvo stebėta statistiškai reikšminga koreliacija tarp DNR trūkių ir nanodalelių citotoksiškumo. Manoma, kad koncentracijos, didesnės nei 100 µg/mL, gali sukelti klaidingai teigiamus rezultatus, todėl ateityje šių koncentracijų naudoti nerekomenduojama, o genotoksiškumo rezultatus geriausia vertinti mėginiuose, paveiktuose iki 100 µg/mL koncentracija [100].

Analizuojant tėkmės citometrijos tyrimų rezultatus, nustatyta, kad po 24 val. poveikio polistireno nanodalelėmis, buvo stebima efektyvi ir nuo nanodalelių koncentracijos priklausoma PS-ND viduląstelinė internalizacija ir padidėjęs ROS lygis ŽPKVL. Naudojant molekulinės simuliacijas, Rossi ir kt. [169] nustatė, kad polistireno nanodalelės geba prasiskverbti pro lipidines membranas, pakeisdamos membranos struktūrą, ją suminkštindamos ir drastiškai ribodamos molekulinį transportą. Be to, nanoplastiko ir citoplazmos baltymų sąveikos tyrimas [170] atskleidė, kad tam tikri citoplazmos baltymai pasižymi stipriu afiniškumu plastiko nanodalelėms ir aplink jas geba sukurti išorinį baltymų sluoksnį (angl. *protein corona*), dėl kurio nanodalelės gali efektyviau kirsti ląstelės membraną. Rubio ir kolegų darbe [171] po 24 ir 48 val. poveikio buvo nustatytas sėkmingas polistireno nanodalelių patekimas į tris limfoblastines ląstelių linijas (THP-1, TK6, Raji-B). Po poveikio didžiausia tirta koncentracija (50 µg/mL) polistireno nanodalelės stebėtos beveik visose ląstelėse. Be to, kaip ir mūsų tyrime, PS-ND indukavo ROS formavimąsi TK6 ir Raji-B ląstelių linijose. Statistiškai reikšmingas ROS lygio didėjimas po poveikio PS-ND taip pat buvo patvirtintas ŽPKVL, HCT116 ir Hs27 ląstelių linijose [15,172,173]. Teigiama, kad kaip ir kitos nanodalelės, mikro- ir nanoplastikai, DNR pažaidas gali sukelti indukuodami oksidacinį

stresą [174]. Mūsų tyrime, visos tirtosios PS-ND koncentracijos indukavo statistiškai reikšmingą pirminių DNR pažaidų kiekį tiek po 3, tiek po 24 val. poveikio ir reikšmingai padidino mikrobranduolių dažnį. Statistiškai reikšmingas DNR pažaidų kiekis buvo stebėtas ir Raji-B ir TK6 ląstelių linijose [171]. Be to, pastebėtas skirtingas PS-ND genotoksiškumo mechanizmas tarp ląstelių, kur TK6 ląstelėse, PS-ND daugiausiai sukėlė oksidacinius pažeidimus, o Raji-B ląstelėse – DNR trūkius. Stiprus PS-ND genotoksinis poveikis buvo nustatytas monocituose ir polimorfonuklearinėse (PMN) ląstelėse, 24 val. veiktose 100 µg/mL koncentracija, o genotoksinis poveikis limfocituose buvo nežymus [175]. Analizuojant chromosomų pažaidas, kaip ir mūsų atliktame tyrime, PS-ND indukavo statistiškai reikšmingą MB dažnio padidėjimą Hs27 ir ŽPKV ląstelėse [173,176]. Sarma ir kolegų tyrime taip pat buvo stebėtas chromosominio tipo aberacijų (chromosominiai trūkliai, chromosominiai žiedai ir dicentrinės chromosomos) didėjimas ŽPKVL [176]. Tačiau tyrime naudotos daug aukštesnės PS-ND koncentracijos (500–2000 µg/mL) nėra mūsų atliktame darbe, tad tiesiogiai lyginti rezultatų negalime. Be to, remiantis naujausiomis (2024 m.) rekomendacijomis, tiriamoji nanodalelių koncentracija neturėtų viršyti 100 µg/mL, siekiant išvengti klaidingai teigiamų rezultatų [100]. Analizuojant mūsų tyrime pateiktus šarminės kometos testo rezultatus, kai visos tirtos nanodalelių koncentracijos sukėlė statistiškai reikšmingą ir nuo koncentracijos priklausomą DNR pažaidų kiekio augimą, nustatyta, kad tokios tendencijos nebuvo stebimos analizuojant mikrobranduolių dažnį. Tai gali būti dėl metodų specifiškumo, kai kometos testas įvertina pirmines DNR pažaidas, o mikrobranduolių testu aptinkamos chromosomų pažaidos. Tačiau įdomų dalyką pastebėjo Ballesteros su kolegomis tyrimas [175], kur buvo įvertintas skirtingų baltųjų kraujo kūnelių (limfocitų, monocitų ir PMN ląstelių) jautrumas PS-ND. Tyrimo metu nustatyta, kad ne tik viduląstelinė PS-ND internalizacija limfocituose buvo ribota, bet ir tirtosios koncentracijos nesukėlė reikšmingo DNR pažaidų kiekio padidėjimo, palyginti su monocitais ir PMN ląstelėmis, bet monocitai ir PMN buvo jautrūs PS-ND genotoksiniam poveikiui.

Taigi, jeigu mūsų tyrime, Mikrobranduolių testo metu, mes paprastai analizuojame tik limfocitus (dėl FGA, esančios ląstelių kultūros auginimo terpėje), kurie yra mažiau jautrūs PS-ND genotoksiniam poveikiui, tai kometos tyrime, kur FGA nėra naudojamas, turime baltųjų kraujo kūnelių mišinį, kai ląstelės pasižymi skirtingu jautrumu PS-ND. Tačiau, šią hipotezę ateityje reikėtų patvirtinti.

Apibendrinant gautus rezultatus nustatyta, kad didžioji dauguma tirtųjų nanodalelių ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -ND,  $\text{SiO}_2$ -ND, PVP-Ag-ND, PS-ND) po 24 val. poveikio efektyviai pateko į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles. Vienintelės nanodalelės, kurių patekimo efektyvumas buvo ribotas – 5 ir 40 nm dydžio aukso nanodalelės. Visos nanodalelės indukavo reikšmingą pirminių DNR pažaidų kiekio didėjimą tiek po trumpalaikio (1 arba 3 val.), tiek po ilgalaikio (24 val.) poveikio, tačiau buvo stebėti skirtingi genotoksiškumo mechanizmai. 10–30 nm ir <50 nm dydžio kobalto oksido, 50 nm aliuminio oksido ir polistireno nanodalelės, patekusios į ląstelės vidų gebėjo indukuoti didesnę ar mažesnę ROS formavimąsi ir, greičiausiai, taip sukelti DNR trūkius. Kitos nanodalelės (PVP-Ag,  $\text{SiO}_2$ , 13 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Au), nors ir sukėlė reikšmingą pirminių DNR pažaidų kiekį, ROS lygis ląstelėse nepakito arba pakito labai nežymiai. Tai leidžia manyti, kad veikia kiti, su ROS nesusiję nanodalelių genotoksiškumo mechanizmai: tiesioginė ND sąveika su DNR ir mechaninis jos pažeidimas, arba sąveika su molekulėmis, atsakingomis už DNR replikaciją arba reparaciją. Aukso nanodalelių atveju gali būti stebimas dar vienas genotoksiškumo mechanizmas, kai nanodalelės nepateko į ląstelės vidų ir neindukavo viduląstelinės ROS gamybos, tačiau indukavo reikšmingą DNR pažaidų kiekį. Analizuojant chromosomų pažaidas nustatyta, kad abiejų dydžių kobalto oksido nanodalelės ir polistireno nanodalelės sukėlė didžiausią MB dažnio didėjimą. Palyginamajame Rajiv ir kolegų tyrime [12], kur buvo vertinamas  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -,  $\text{SiO}_2$ - ir  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -ND genotoksiškumas kometos ir mikrobranduolių testais ŽPKVL, buvo nustatyta, kad  $\text{Co}_3\text{O}_4$ - ir  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ -ND sukėlė didžiausią DNR ir chromosominių pažaidų kiekį, kuris buvo statistiškai reikšmingas.  $\text{SiO}_2$ - ir  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -ND

genotoksiniu poveikiu nepasižymėjo, o tai iš dalies atitinka mūsų tyrime gautus rezultatus. Įdomu tai, kad beveik visuose mūsų atliktuose genotoksiškumo tyrimuose buvo stebėti reikšmingi skirtumai tarp donorų rezultatų, leidžiančių manyti apie individualų donorų jautrumą skirtingoms nanodalelėms (S18 priedų lentelė). Apie individualų donorų jautrumą buvo kalbėta ir kituose tyrimuose, tiriant kobalto genotoksiškumą šarminiu kometos testu [177] arba jonizuojančios spinduliuotės poveikį mikrobranduolių testu [178]. Siekiant įvertinti nanodalelių genotoksinį potencialą ir saugumą, svarbu atkreipti dėmesį į egzistuojantį individualų donorų jautrumą. Žinoma, kad tiek DNR, tiek chromosominių pažaidų dažnis gali priklausyti nuo donoro amžiaus, gyvenimo būdo ir reparacinės sistemos efektyvumo. Jei vienu donorų ląstelės geba efektyviai ištaisyti susiformavusias DNR pažaidas ir neleidžia formuotis mutacijoms, kitų donorų atveju šis mechanizmas gali būti sutrikęs ir gali lemti mutacijų atsiradimą [179,180]. Dėl to, siekiant įvertinti nanodalelių genotoksiškumą, rekomenduojama tyrimus atlikti su kuo daugiau skirtingų donorų [177]. Taip pat kyla abejonių dėl to, ar genotoksiškumo tyrimų rezultatai, gauti persėjamosiose ląstelių kultūrose, tiesiogiai atspindi realią situaciją.

## IŠVADOS

1. Po 24 val. poveikio nustatyta efektyvi  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -,  $\text{SiO}_2$ -, PVP-Ag-, ir PS-ND viduląstelinė internalizacija į žmogaus periferinio kraujo vienbranduoles ląsteles. Priešingai, 5 nm ir 40 nm aukso nanodalelių viduląstelinė internalizacija yra ribota.
2. 13 nm PVP-Ag- ir 10 nm Au-NDs pasižymėjo citotoksinu poveikiu žmogaus periferinio kraujo vienbranduolėse ląstelėse.
3.  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND (10–30 nm and <50 nm),  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -ND (13 ir 50 nm), ir PS-ND indukavo reaktyvių deguonies formų formavimąsi, o kitos tirtosios nanodalelės (PVP-Ag-,  $\text{SiO}_2$ -, Au-ND), tokio poveikio žmogaus PKVL neturėjo.
4. Šarminiu kometos testu nustatyta, kad visos tirtos nanodalelės statistiškai reikšmingai indukavo pirminių DNR pažeidimų susidarymą, kuris buvo proporcingas inkubacijos su nanodalelėmis laikui.
5. Abiejų dydžių  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -ND ir PS-ND indukavo didžiausią kiekį chromosomų pažeidimų, palyginti su likusiomis tirtosiomis nanodalelėmis (PVP-Ag-,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -,  $\text{SiO}_2$ -ND).
6. Beveik visų tirtų rodiklių atžvilgiu buvo stebėti statistiškai reikšmingi skirtumai tarp tiriamųjų donorų.

## LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Malik, S.; Muhammad, K.; Waheed, Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules* **2023**, *28*, 661, doi:10.3390/MOLECULES28020661.
2. *Nanomaterials Market Size, Growth Rate | Report, 2023-2030. Available Online: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/nanotechnology-and-nanomaterials-market> (Accessed on 7 June 2024);*
3. European Chemical Agency *Study of the EU Market for Nanomaterials, Including Substances, Uses, Volumes and Key Operators*;
4. European Commission Joint Research Centre Institute for Health and Consumer Protection Towards a Review of the EC Recommendation for a Definition of the Term “Nanomaterial”. Part 1, Compilation of Information Concerning the Experience with the Definition. **2022**, doi:10.2788/36237.
5. Drasler, B.; Sayre, P.; Steinhäuser, K.G.; Petri-fink, A.; Rothenrutishauer, B. NanoImpact In Vitro Approaches to Assess the Hazard of Nanomaterials. *NanoImpact* **2017**, *8*, 99–116, doi:10.1016/j.impact.2017.08.002.
6. García-Rodríguez, A.; Rubio, L.; Vila, L.; Xamena, N.; Velázquez, A.; Marcos, R.; Hernández, A. The Comet Assay as a Tool to Detect the Genotoxic Potential of Nanomaterials. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1385, doi:10.3390/nano9101385.
7. Behzadi, S.; Serpooshan, V.; Tao, W.; Hamaly, M.A.; Alkawareek, M.Y.; Dreaden, E.C.; Brown, D.; Alkilany, A.M.; Farokhzad, O.C.; Mahmoudi, M. Cellular Uptake of Nanoparticles: Journey inside the Cell. *Chem. Soc. Rev.* **2017**, *46*, 4218–4244.
8. Shang, L.; Nienhaus, K.; Nienhaus, G.U. Engineered Nanoparticles Interacting with Cells: Size Matters. *J. Nanobiotechnology* **2014**, *12*, 1–11, doi:10.1186/1477-3155-12-5.
9. Magdolenova, Z.; Collins, A.; Kumar, A.; Dhawan, A.; Stone, V.; Dusinska, M. Mechanisms of Genotoxicity. A Review of in Vitro and in Vivo Studies with Engineered Nanoparticles. *Nanotoxicology* **2014**, *8*, 233–278, doi:10.3109/17435390.2013.773464.
10. Barabadi, H.; Najafi, M.; Samadian, H.; Azarnezhad, A.; Vahidi, H.; Mahjoub, M.; Koohiyan, M.; Ahmadi, A. A Systematic Review of the Genotoxicity and Antigenotoxicity of Biologically Synthesized Metallic Nanomaterials: Are Green Nanoparticles Safe Enough for Clinical Marketing? *Medicina (B. Aires)*. **2019**, *55*, 439, doi:10.3390/medicina55080439.
11. Kohl, Y.; Rundén-Pran, E.; Mariussen, E.; Hesler, M.; Yamani, N. El; Longhin, E.M.; Dusinska, M. Genotoxicity of

- Nanomaterials: Advanced in Vitro Models and High Throughput Methods for Human Hazard Assessment—a Review. *Nanomaterials* 2020, *10*, 1–25.
12. Rajiv, S.; Jerobin, J.; Saranya, V.; Nainawat, M.; Sharma, A.; Makwana, P.; Gayathri, C.; Bharath, L.; Singh, M.; Kumar, M.; et al. Comparative Cytotoxicity and Genotoxicity of Cobalt (II, III) Oxide, Iron (III) Oxide, Silicon Dioxide, and Aluminum Oxide Nanoparticles on Human Lymphocytes in Vitro. *Hum. Exp. Toxicol.* **2016**, *35*, 170–183, doi:10.1177/0960327115579208.
  13. Uboldi, C.; Orsière, T.; Darolles, C.; Aloin, V.; Tassistro, V.; George, I.; Malard, V. Poorly Soluble Cobalt Oxide Particles Trigger Genotoxicity via Multiple Pathways. *Part. Fibre Toxicol.* **2016**, *13*, doi:10.1186/s12989-016-0118-8.
  14. Sliwinska, A.; Kwiatkowski, D.; Czarny, P.; Milczarek, J.; Toma, M.; Korycinska, A.; Szemraj, J.; Sliwinski, T. Genotoxicity and Cytotoxicity of ZnO and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles. *Toxicol. Mech. Methods* **2015**, *25*, 176–183, doi:10.3109/15376516.2015.1006509.
  15. Kik, K.; Bukowska, B.; Krokosz, A.; Sicińska, P. Oxidative Properties of Polystyrene Nanoparticles with Different Diameters in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (In Vitro Study). *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22094406.
  16. Lespes, G.; Faucher, S.; Slaveykova, V.I. Natural Nanoparticles, Anthropogenic Nanoparticles, Where Is the Frontier? *Front. Environ. Sci.* **2020**, *8*, 545805, doi:10.3389/fenvs.2020.00071.
  17. Ealias, A.M.; Saravanakumar, M.P. A Review on the Classification, Characterisation, Synthesis of Nanoparticles and Their Application. In Proceedings of the IOP Conference Series: Materials Science and Engineering; Institute of Physics Publishing, December 3 2017; Vol. 263, p. 032019.
  18. Khan, I.; Saeed, K.; Khan, I. Nanoparticles: Properties, Applications and Toxicities. *Arab. J. Chem.* **2019**, *12*, 908–931, doi:10.1016/J.ARABJC.2017.05.011.
  19. Joudeh, N.; Linke, D. Nanoparticle Classification, Physicochemical Properties, Characterization, and Applications: A Comprehensive Review for Biologists. *J. Nanobiotechnology* **2022**, *201* **2022**, *20*, 1–29, doi:10.1186/S12951-022-01477-8.
  20. Najahi-Missaoui, W.; Arnold, R.D.; Cummings, B.S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–22, doi:10.3390/IJMS22010385.
  21. Siddique, S.; Chow, J.C.L. Application of Nanomaterials in Biomedical Imaging and Cancer Therapy. *Nanomaterials* 2020, *10*, 1–41.
  22. Salomoni, R.; Leo, P.; Rodrigues, M.F. de A. Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles (AgNPs) in Staphylococcus Aureus and Cytotoxicity Effect in Mammalian Cells. In *The*



- Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*; Mendez-Vilas, A., Ed.; Formatex Research Center, 2015; pp. 851–857.
23. Mallmann, E.J.J.; Cunha, F.A.; Castro, B.N.M.F.; Maciel, A.M.; Menezes, E.A.; Fecine, P.B.A. ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES OBTAINED BY GREEN SYNTHESIS. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2015**, *57*, 165–167, doi:10.1590/S0036-46652015000200011.
  24. Gaikwad, S.; Ingle, A.; Gade, A.; Rai, M.; Falanga, A.; Incoronato, N.; Russo, L.; Galdiero, S.; Galdiero, M. Antiviral Activity of Mycosynthesized Silver Nanoparticles against Herpes Simplex Virus and Human Parainfluenza Virus Type 3. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 4303–4314, doi:10.2147/IJN.S50070.
  25. Noga, M.; Milan, J.; Frydrych, A.; Jurowski, K. Toxicological Aspects, Safety Assessment, and Green Toxicology of Silver Nanoparticles (AgNPs)—Critical Review: State of the Art. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 5133.
  26. Lison, D.; van den Brule, S.; Van Maele-Fabry, G. Cobalt and Its Compounds: Update on Genotoxic and Carcinogenic Activities. *Crit. Rev. Toxicol.* **2018**, *48*, 522–539, doi:10.1080/10408444.2018.1491023.
  27. Kimura, Y.; Kurimoto, T.; Imai, Y.; Sugii, H.; Toshimitsu, A.; Matsuda, T.; Imai, H.; Yamada, H.; Kondo, T. Novel Biocompatible Cobalt Oxide Nanoparticles for Use in Dual Photoacoustic and Magnetic Resonance Imaging. *JSM Biotechnol Bioeng* **2014**, *2*, 1043.
  28. Thanh, N.T.K.; Green, L.A.W. Functionalisation of Nanoparticles for Biomedical Applications. *Nano Today* **2010**, *5*, 213–230.
  29. Huang, H.; Wang, J.; Zhang, J.; Cai, J.; Pi, J.; Xu, J. Inspirations of Cobalt Oxide Nanoparticle Based Anticancer Therapeutics. *Pharmaceutics* **2021**, *13*.
  30. Nayl, A.A.; Abd-Elhamid, A.I.; Aly, A.A.; Bräse, S. Recent Progress in the Applications of Silica-Based Nanoparticles. *RSC Adv.* **2022**, *12*, 13706–13726, doi:10.1039/D2RA01587K.
  31. Croissant, J.G.; Butler, K.S.; Zink, J.I.; Brinker, C.J. Synthetic Amorphous Silica Nanoparticles: Toxicity, Biomedical and Environmental Implications. *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5*, 886–909.
  32. Pourmadadi, M.; Farokh, A.; Rahmani, E.; Shamsabadipour, A.; Eshaghi, M.M.; Rahdar, A.; Ferreira, L.F.R. Porous Alumina as Potential Nanostructures for Drug Delivery Applications, Synthesis and Characteristics. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2022**, *77*, 103877.
  33. Alonso-De la Garza, D.A.; Guzmán, A.M.; Gómez-Rodríguez, C.; Martínez, D.I.; Elizondo, N. Influence of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and SiO<sub>2</sub> Nanoparticles Addition on the Microstructure and Mechano-Physical Properties of Ceramic Tiles. *Ceram. Int.* **2022**, *48*,

- 12712–12720, doi:10.1016/J.CERAMINT.2022.01.140.
34. Moore, J.A.; Chow, J.C.L. Recent Progress and Applications of Gold Nanotechnology in Medical Biophysics Using Artificial Intelligence and Mathematical Modeling. *Nano Express* **2021**, *2*, 022001, doi:10.1088/2632-959X/abddd3.
  35. Bouché, M.; Hsu, J.C.; Dong, Y.C.; Kim, J.; Taing, K.; Cormode, D.P. Recent Advances in Molecular Imaging with Gold Nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* **2020**, *31*, 303, doi:10.1021/ACS.BIOCONJCHEM.9B00669.
  36. Aldewachi, H.; Chalati, T.; Woodroffe, M.N.; Bricklebank, N.; Sharrack, B.; Gardiner, P. Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensors. *Nanoscale* **2017**, *10*, 18–33, doi:10.1039/C7NR06367A.
  37. Santiago, C.A.; Chow, J.C.L. Variations in Gold Nanoparticle Size on DNA Damage: A Monte Carlo Study Based on a Multiple-Particle Model Using Electron Beams. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 4916, doi:10.3390/app13084916.
  38. Nuruzatulifah, A.; Nizam, A.; Nasha Ain, N.M. Synthesis and Characterization of Polystyrene Nanoparticles with Covalently Attached Fluorescent Dye. *Mater. Today Proc.* **2016**, 112–119, doi:10.1016/j.matpr.2016.01.015.
  39. Loos, C.; Syrovets, T.; Musyanovych, A.; Mailänder, V.; Landfester, K.; Ulrich Nienhaus, G.; Simmet, T. Functionalized Polystyrene Nanoparticles as a Platform for Studying Bio–Nano Interactions. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, *5*, 2403, doi:10.3762/BJNANO.5.250.
  40. Firdessa, R.; Oelschlaeger, T.A.; Moll, H. Identification of Multiple Cellular Uptake Pathways of Polystyrene Nanoparticles and Factors Affecting the Uptake: Relevance for Drug Delivery Systems. *Eur. J. Cell Biol.* **2014**, *93*, 323–337, doi:10.1016/J.EJCB.2014.08.001.
  41. Bakand, S.; Hayes, A. Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 929.
  42. Campora, S.; Ghersi, G. Recent Developments and Applications of Smart Nanoparticles in Biomedicine. *Nanotechnol. Rev.* **2022**, *11*, 2595–2631.
  43. Patwa, A.; Shah, A. Anatomy and Physiology of Respiratory System Relevant to Anaesthesia. *Indian J. Anaesth.* **2015**, *59*, 533–541.
  44. De Matteis, V. Exposure to Inorganic Nanoparticles: Routes of Entry, Immune Response, Biodistribution and in Vitro/In Vivo Toxicity Evaluation. *Toxics* **2017**, *5*.
  45. Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113*, 823–839.
  46. Baeza-Squiban, A.; Lanone, S. Exposure, Uptake and Barriers.

- In *Nanoethics and Nanotoxicology*; Houdy, P., Lahmani, M., Marano, F., Eds.; Springer Berlin Heidelberg, 2011; pp. 37–63 ISBN 9783642201769.
47. Nafisi, S.; Maibach, H.I. Skin Penetration of Nanoparticles. In *Emerging Nanotechnologies in Immunology: The Design, Applications and Toxicology of Nanopharmaceuticals and Nanovaccines*; Elsevier, 2018; pp. 47–88 ISBN 9780323400169.
  48. Saweres-Argüelles, C.; Ramírez-Novillo, I.; Vergara-Barberán, M.; Carrasco-Correa, E.J.; Lerma-García, M.J.; Simó-Alfonso, E.F. Skin Absorption of Inorganic Nanoparticles and Their Toxicity: A Review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2023, *182*, 128–140.
  49. Larese Filon, F.; Mauro, M.; Adami, G.; Bovenzi, M.; Crosera, M. Nanoparticles Skin Absorption: New Aspects for a Safety Profile Evaluation. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2015, *72*, 310–322.
  50. Bergin, I.L.; Witzmann, F.A. Nanoparticle Toxicity by the Gastrointestinal Route: Evidence and Knowledge Gaps. *Int. J. Biomed. Nanosci. Nanotechnol.* 2013, *3*, 163, doi:10.1504/ijbnn.2013.054515.
  51. Zhou, H.; McClements, D.J. Recent Advances in the Gastrointestinal Fate of Organic and Inorganic Nanoparticles in Foods. *Nanomaterials* 2022, *12*.
  52. Mahmoudi, M.; Landry, M.P.; Moore, A.; Coreas, R. The Protein Corona from Nanomedicine to Environmental Science. *Nat. Rev. Mater.* 2023 *87* 2023, *8*, 422–438, doi:10.1038/s41578-023-00552-2.
  53. Tenzer, S.; Docter, D.; Kuharev, J.; Musyanovych, A.; Fetz, V.; Hecht, R.; Schlenk, F.; Fischer, D.; Kiouptsi, K.; Reinhardt, C.; et al. Rapid Formation of Plasma Protein Corona Critically Affects Nanoparticle Pathophysiology. *Nat. Nanotechnol.* 2013 *810* 2013, *8*, 772–781, doi:10.1038/nnano.2013.181.
  54. Kopac, T. Protein Corona, Understanding the Nanoparticle–Protein Interactions and Future Perspectives: A Critical Review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021, *169*, 290–301, doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.12.108.
  55. García-álvarez, R.; Vallet-Regí, M. Hard and Soft Protein Corona of Nanomaterials: Analysis and Relevance. *Nanomaterials* 2021, *11*, doi:10.3390/NANO11040888.
  56. Liu, N.; Tang, M.; Ding, J. The Interaction between Nanoparticles-Protein Corona Complex and Cells and Its Toxic Effect on Cells. *Chemosphere* 2020, *245*, 125624, doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.125624.
  57. Cooper, G.M. Transport of Small Molecules. 2000.
  58. Foroozandeh, P.; Aziz, A.A. Insight into Cellular Uptake and Intracellular Trafficking of Nanoparticles. *Nanoscale Res. Lett.* 2018, *13*, 1–12.
  59. Sabourian, P.; Yazdani, G.; Ashraf, S.S.; Frounchi, M.;

- Mashayekhan, S.; Kiani, S.; Kakkar, A. Effect of Physico-Chemical Properties of Nanoparticles on Their Intracellular Uptake. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, *21*, 1–20.
60. Mosquera, J.; García, I.; Liz-Marzán, L.M. Cellular Uptake of Nanoparticles versus Small Molecules: A Matter of Size. *Acc. Chem. Res.* **2018**, *51*, 2305–2313, doi:10.1021/acs.accounts.8b00292.
  61. Mayor, S.; Pagano, R.E. Pathways of Clathrin-Independent Endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, *8*, 603–612.
  62. Lim, J.P.; Gleeson, P.A. Macropinocytosis: An Endocytic Pathway for Internalising Large Gulps. *Immunol. Cell Biol.* **2011**, *89*, 836–843, doi:10.1038/icb.2011.20.
  63. Donahue, N.D.; Acar, H.; Wilhelm, S. Concepts of Nanoparticle Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Kinetics in Nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2019, *143*, 68–96.
  64. Kaksonen, M.; Roux, A. Mechanisms of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018, *19*, 313–326.
  65. Gustafson, H.H.; Holt-Casper, D.; Grainger, D.W.; Ghandehari, H. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today* **2015**, *10*, 487–510, doi:10.1016/J.NANTOD.2015.06.006.
  66. Lajoie, P.; Nabi, I.R. Regulation of Raft-Dependent Endocytosis. *J. Cell. Mol. Med.* **2007**, *11*, 644–653, doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00083.x.
  67. Zhang, S.; Gao, H.; Bao, G. Physical Principles of Nanoparticle Cellular Endocytosis. *ACS Nano* 2015, *9*, 8655–8671.
  68. Jo, D.H.; Kim, J.H.; Lee, T.G.; Kim, J.H. Size, Surface Charge, and Shape Determine Therapeutic Effects of Nanoparticles on Brain and Retinal Diseases. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2015, *11*, 1603–1611.
  69. Brandenberger, C.; Mühlfeld, C.; Ali, Z.; Lenz, A.-G.; Schmid, O.; Parak, W.J.; Gehr, P.; Rothen-Rutishauser, B. Quantitative Evaluation of Cellular Uptake and Trafficking of Plain and Polyethylene Glycol-Coated Gold Nanoparticles. *Small* **2010**, *6*, 1669–1678, doi:10.1002/smll.201000528.
  70. Gao, H.; Shi, W.; Freund, L.B. Mechanics of Receptor-Mediated Endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 9469–9474, doi:10.1073/PNAS.0503879102/ASSET/AE8CEB39-BE90-4499-8561-326793969E7B/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ0260586500005.JPG G.
  71. Chithrani, B.D.; Chan, W.C.W. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1542–1550, doi:10.1021/nl070363y.
  72. Chithrani, B.D.; Ghazani, A.A.; Chan, W.C.W. Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. *Nano Lett.* **2006**, *6*, 662–668, doi:10.1021/nl052396o.

73. Jiang, W.; Kim, B.Y.S.; Rutka, J.T.; Chan, W.C.W. Nanoparticle-Mediated Cellular Response Is Size-Dependent. *Nat. Nanotechnol.* **2008**, *3*, 145–150, doi:10.1038/nnano.2008.30.
74. Lu, F.; Wu, S.; Hung, Y.; Mou, C. Size Effect on Cell Uptake in Well-Suspended, Uniform Mesoporous Silica Nanoparticles. *Small* **2009**, *5*, 1408–1413, doi:10.1002/smll.200900005.
75. Shapero, K.; Fenaroli, F.; Lynch, I.; Cottell, D.C.; Salvati, A.; Dawson, K.A. Time and Space Resolved Uptake Study of Silica Nanoparticles by Human Cells. *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 371–378, doi:10.1039/C0MB00109K.
76. Donkor, D.A.; Tang, X.S. Tube Length and Cell Type-Dependent Cellular Responses to Ultra-Short Single-Walled Carbon Nanotube. *Biomaterials* **2014**, *35*, 3121–3131, doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.12.075.
77. Graf, C.; Nordmeyer, D.; Sengstock, C.; Ahlberg, S.; Diendorf, J.; Raabe, J.; Epple, M.; Köller, M.; Lademann, J.; Vogt, A.; et al. Shape-Dependent Dissolution and Cellular Uptake of Silver Nanoparticles. *Langmuir* **2018**, *34*, 1506–1519, doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.7B03126/SUPPL\_FILE/LA7B03126\_SI\_001.PDF.
78. Banerjee, A.; Qi, J.; Gogoi, R.; Wong, J.; Mitragotri, S. Role of Nanoparticle Size, Shape and Surface Chemistry in Oral Drug Delivery. *J. Control. Release* **2016**, *238*, 176–185, doi:10.1016/J.JCONREL.2016.07.051.
79. Augustine, R.; Hasan, A.; Primavera, R.; Wilson, R.J.; Thakor, A.S.; Kevadiya, B.D. Cellular Uptake and Retention of Nanoparticles: Insights on Particle Properties and Interaction with Cellular Components. *Mater. Today Commun.* **2020**, *25*, 101692, doi:10.1016/J.MTCOMM.2020.101692.
80. Suk, J.S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L.M. PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28–51, doi:10.1016/J.ADDR.2015.09.012.
81. Li, D.; Wang, F.; Di, H.; Liu, X.; Zhang, P.; Zhou, W.; Liu, D. Cross-Linked Poly(Ethylene Glycol) Shells for Nanoparticles: Enhanced Stealth Effect and Colloidal Stability. *Langmuir* **2019**, *35*, 8799–8805, doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.9B01325/SUPPL\_FILE/LA9B01325\_SI\_001.PDF.
82. El-Baz, N.; Nunn, B.M.; Bates, P.J.; O’Toole, M.G. The Impact of PEGylation on Cellular Uptake and In Vivo Biodistribution of Gold Nanoparticle MRI Contrast Agents. *Bioengineering* **2022**, *9*, doi:10.3390/BIOENGINEERING9120766.
83. Shi, X.; Wang, X.; Huang, R.; Tang, C.; Hu, C.; Ning, P.; Wang, F. Cytotoxicity and Genotoxicity of Polystyrene Micro- and Nanoplastics with Different Size and Surface Modification in A549 Cells. *Int. J. Nanomedicine* **2022**, *17*, 4509–4523,

- doi:10.2147/IJN.S381776.
84. Vranic, S.; Boland, S. Impact of Surface Modification on Cellular Uptake and Cytotoxicity of Silica Nanoparticles. 1–20.
  85. Ren, N.; Atyah, M.; Chen, W.Y.; Zhou, C.H. The Various Aspects of Genetic and Epigenetic Toxicology: Testing Methods and Clinical Applications. *J. Transl. Med.* **2017**, *15*, 1–13, doi:10.1186/s12967-017-1218-4.
  86. Saks, M., Upreti, S., Rajendra, S.V. y Dang, R. Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Glob. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2017**, *1*, 1–6, doi:10.19080/GJPPS.2017.02.555575.
  87. Shukla, R.K.; Badiye, A.; Vajpayee, K.; Kapoor, N. Genotoxic Potential of Nanoparticles: Structural and Functional Modifications in DNA. *Front. Genet.* 2021, *12*, 728250.
  88. Landsiedel, R.; Honarvar, N.; Seiffert, S.B.; Oesch, B.; Oesch, F. Genotoxicity Testing of Nanomaterials. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2022**, *14*, 1–35, doi:10.1002/wnan.1833.
  89. Doak, S.H.; Manshian, B.; Jenkins, G.J.S.; Singh, N. In Vitro Genotoxicity Testing Strategy for Nanomaterials and the Adaptation of Current OECD Guidelines. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2012**, *745*, 104–111, doi:10.1016/j.mrgentox.2011.09.013.
  90. Elespuru, R.; Pfuhrer, S.; Aardema, M.; Chen, T.; Doak, S.H.; Doherty, A.; Farabaugh, C.S.; Kenny, J.; Manjanatha, M.; Mahadevan, B.; et al. Genotoxicity Assessment of Nanomaterials: Recommendations on Best Practises, Assays and Methods. *Toxicol Sci* **2018**, *164*, 391–416, doi:10.1093/toxsci/kfy100/4986967.
  91. Doak, S.H.; Andreoli, C.; Burgum, M.J.; Chaudhry, Q.; Bleeker, E.A.J.; Bossa, C.; Domenech, J.; Drobne, D.; Fessard, V.; Jeliaskova, N.; et al. Current Status and Future Challenges of Genotoxicity OECD Test Guidelines for Nanomaterials: A Workshop Report. *Mutagenesis* **2023**, 1–9, doi:10.1093/mutage/gead017.
  92. OECD Guideline for Testing of Chemicals Test N° 471: Bacterial Reverse Mutation Test. *Oecd Guidel. Test. Chem.* **2020**, *24*.
  93. OECD Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials : Report of the OECD Expert Meeting. **2014**, 1–37.
  94. Azqueta, A.; Muruzabal, D.; Boutet-Robinet, E.; Milic, M.; Dusinska, M.; Brunborg, G.; Møller, P.; Collins, A.R. Technical Recommendations to Perform the Alkaline Standard and Enzyme-Modified Comet Assay in Human Biomonitoring Studies. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2019, *843*, 24–32.
  95. Collins, A.R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part B Mol. Biotechnol.* **2004**, *26*, 249–261,

- doi:10.1385/MB:26:3:249.
96. Farabaugh, C.S.; Doak, S.; Roy, S.; Elespuru, R. In Vitro Micronucleus Assay: Method for Assessment of Nanomaterials Using Cytochalasin B. *Front. Toxicol.* **2023**, *5*, 1171960, doi:10.3389/FTOX.2023.1171960/BIBTEX.
  97. OECD Test Guideline No. 487 In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. In *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*; OECD: Paris, 2023 ISBN 9789264264861.
  98. Chung, H.W.; Kang, S.J.; Kim, S.Y. A Combination of the Micronucleus Assay and a FISH Technique for Evaluation of the Genotoxicity of 1,2,4-Benzenetriol. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2002**, *516*, 49–56, doi:10.1016/S1383-5718(02)00018-9.
  99. Hovhannisyan, G.G. Fluorescence in Situ Hybridization in Combination with the Comet Assay and Micronucleus Test in Genetic Toxicology. *Mol. Cytogenet.* **2010**, *3*, 17, doi:10.1186/1755-8166-3-17.
  100. Burgum, M.J.; Ulrich, C.; Partosa, N.; Evans, S.J.; Gomes, C.; Seiffert, S.B.; Landsiedel, R.; Honarvar, N.; Doak, S.H. Adapting the in Vitro Micronucleus Assay (OECD Test Guideline No. 487) for Testing of Manufactured Nanomaterials: Recommendations for Best Practices. *Mutagenesis* **2024**, *39*, 205–217, doi:10.1093/mutage/geae010.
  101. Elespuru, R.K.; Doak, S.H.; Collins, A.R.; Dusinska, M.; Pfulher, S.; Manjanatha, M.; Cardoso, R.; Chen, C.L. Common Considerations for Genotoxicity Assessment of Nanomaterials. *Front. Toxicol.* **2022**, *4*, doi:10.3389/FTOX.2022.859122.
  102. Xu, L.; Liang, H.W.; Yang, Y.; Yu, S.H. Stability and Reactivity: Positive and Negative Aspects for Nanoparticle Processing. *Chem. Rev.* **2018**, *118*, 3209–3250, doi:10.1021/ACS.CHEMREV.7B00208/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CR-2017-00208M\_0040.GIF.
  103. Azqueta, A.; Stopper, H.; Zegura, B.; Dusinska, M.; Møller, P. Do Cytotoxicity and Cell Death Cause False Positive Results in the in Vitro Comet Assay? *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2022**, *881*, doi:10.1016/j.mrgentox.2022.503520.
  104. Dusinska, M.; Boland, S.; Saunders, M.; Juillerat-Jeanneret, L.; Tran, L.; Pojana, G.; Marcomini, A.; Volkovova, K.; Tulinska, J.; Knudsen, L.E.; et al. Towards an Alternative Testing Strategy for Nanomaterials Used in Nanomedicine: Lessons from NanoTEST. *Nanotoxicology* **2015**, *9*, 118–132, doi:10.3109/17435390.2014.991431.
  105. Fuss, I.J.; Kanof, M.E.; Smith, P.D.; Zola, H. Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood. *Curr. Protoc. Immunol.* **2009**, *85*, 7.1.1–7.1.8, doi:10.1002/0471142735.IM0701S85.
  106. Green, M.R.; Sambrook, J. Estimation of Cell Number by Hemocytometry Counting. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2019**,

- 2019, 732–734, doi:10.1101/pdb.prot097980.
107. Suzuki, H.; Toyooka, T.; Ibuki, Y. Simple and Easy Method to Evaluate Uptake Potential of Nanoparticles in Mammalian Cells Using a Flow Cytometric Light Scatter Analysis. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 3018–3024, doi:10.1021/es0625632.
  108. Bode, K.; Link, C.; Krammer, P.H.; Weyd, H. Flow-Cytometric Detection of Low-Level Reactive Oxygen Species in Cell Lines and Primary Immune Cells. *Bio-protocol* **2020**, *10*, doi:10.21769/BioProtoc.3737.
  109. Singh, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Exp. Cell Res.* **1988**, *175*, 184–191, doi:10.1016/0014-4827(88)90265-0.
  110. Liu, K.; Liu, P.C.; Liu, R.; Wu, X. Dual AO/EB Staining to Detect Apoptosis in Osteosarcoma Cells Compared with Flow Cytometry. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* **2015**, *21*, 15–20, doi:10.12659/MSMBR.893327.
  111. Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **2015**, *111*, A3.B.1-A3.B.3, doi:10.1002/0471142735.ima03bs111.
  112. McGahon, A.J.; Martin, S.J.; Bissonnette, R.P.; Mahboubi, A.; Shi, Y.; Mogil, R.J.; Nishioka, W.K.; Green, D.R. *The End of the ( Cell ) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro*. In *Methods in Cell Biology*; Schwartz, L.M., Osborne, B.A., Eds.; Academic Press: La Jolla, California, 1995; Vol. 46;.
  113. Møller, P.; Azqueta, A.; Boutet-Robinet, E.; Koppen, G.; Bonassi, S.; Milić, M.; Gajski, G.; Costa, S.; Teixeira, J.P.; Costa Pereira, C.; et al. Minimum Information for Reporting on the Comet Assay (MIRCA): Recommendations for Describing Comet Assay Procedures and Results. *Nat. Protoc.* **2020**, *15*, 3817–3826, doi:10.1038/s41596-020-0398-1.
  114. Fenech, M.; Chang, W.P.; Kirsch-Volders, M.; Holland, N.; Bonassi, S.; Zeiger, E. HUMN Project: Detailed Description of the Scoring Criteria for the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Isolated Human Lymphocyte Cultures. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **2003**, *534*, 65–75, doi:10.1016/S1383-5718(02)00249-8.
  115. Lazutka, J.R. Replication Index in Cultured Human Lymphocytes: Methods for Statistical Analysis and Possible Role in Genetic Toxicology. *Environ. Mol. Mutagen.* **1991**, *17*, 188–195, doi:10.1002/EM.2850170308.
  116. Lamberti, L.; Ponzetto, P.B.; Ardito, G. Cell Kinetics and Sister-Chromatid-Exchange Frequency in Human Lymphocytes. *Mutat. Res. Lett.* **1983**, *120*, 193–199, doi:10.1016/0165-7992(83)90163-X.
  117. Fisher, R.A. *Statistical Methods for Research Workers*; 4th ed.-.; Oliver and Boyd: Edinburgh SE - xiii pages, 1 leaf, 307, [1] pages illustrations., 1932;



118. Zaiontz Charles Real Statistics Using Excel Available online: <https://real-statistics.com/> (accessed on 18 August 2024).
119. Clogston, J.D.; Patri, A.K. Zeta Potential Measurement. *Methods Mol. Biol.* **2011**, *697*, 63–70, doi:10.1007/978-1-60327-198-1\_6.
120. Lebedová, J.; Hedberg, Y.S.; Odnevall Wallinder, I.; Karlsson, H.L. Size-Dependent Genotoxicity of Silver, Gold and Platinum Nanoparticles Studied Using the Mini-Gel Comet Assay and Micronucleus Scoring with Flow Cytometry. *Mutagenesis* **2018**, *33*, 77–85, doi:10.1093/MUTAGE/GEX027.
121. Murugadoss, S.; Brassinne, F.; Sebaihi, N.; Petry, J.; Cokic, S.M.; Van Landuyt, K.L.; Godderis, L.; Mast, J.; Lison, D.; Hoet, P.H.; et al. Agglomeration of Titanium Dioxide Nanoparticles Increases Toxicological Responses in Vitro and in Vivo. *Part. Fibre Toxicol.* **2020**, *17*, 1–14, doi:10.1186/S12989-020-00341-7/FIGURES/4.
122. Kleiveland, C.; Kleiveland, C. Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Impact Food Bioact. Heal. Vitro. Ex Vivo Model.* **2015**, 161–167, doi:10.1007/978-3-319-16104-4\_15.
123. Magdolenova, Z.; Bilaniová, D.; Pojana, G.; Fjellsbø, L.M.; Hudecova, A.; Hasplova, K.; Marcomini, A.; Dusinska, M. Impact of Agglomeration and Different Dispersions of Titanium Dioxide Nanoparticles on the Human Related in Vitro Cytotoxicity and Genotoxicity. *J. Environ. Monit.* **2012**, *14*, 455–464, doi:10.1039/C2EM10746E.
124. Hoshyar, N.; Gray, S.; Han, H.; Bao, G. The Effect of Nanoparticle Size on in Vivo Pharmacokinetics and Cellular Interaction. *Nanomedicine* 2016, *11*, 673–692.
125. Papis, E.; Rossi, F.; Raspanti, M.; Dalle-Donne, I.; Colombo, G.; Milzani, A.; Bernardini, G.; Gornati, R. Engineered Cobalt Oxide Nanoparticles Readily Enter Cells. *Toxicol. Lett.* **2009**, *189*, 253–259, doi:10.1016/j.toxlet.2009.06.851.
126. Lugun, O.; Singh, J.; Thakur, R.S.; Pandey, A.K. Cobalt Oxide (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) Nanoparticles Induced Genotoxicity in Chinese Hamster Lung Fibroblast (V79) Cells through Modulation of Reactive Oxygen Species. *Mutagenesis* **2022**, *37*, 44–59, doi:10.1093/mutage/geac005.
127. Chattopadhyay, S.; Dash, S.K.; Tripathy, S.; Das, B.; Mandal, D.; Pramanik, P.; Roy, S. Toxicity of Cobalt Oxide Nanoparticles to Normal Cells; An in Vitro and in Vivo Study. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *226*, 58–71, doi:10.1016/j.cbi.2014.11.016.
128. Colognato, R.; Bonelli, A.; Ponti, J.; Farina, M.; Bergamaschi, E.; Sabbioni, E.; Migliore, L. Comparative Genotoxicity of Cobalt Nanoparticles and Ions on Human Peripheral Leukocytes in Vitro. *Mutagenesis* **2008**, *23*, 377–382, doi:10.1093/mutage/gen024.
129. Manke, A.; Wang, L.; Rojanasakul, Y. Mechanisms of

- Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Biomed Res. Int.* **2013**, *2013*, doi:10.1155/2013/942916.
130. Assenhøj, M.; Eriksson, P.; Dönnés, P.; Ljunggren, S.A.; Marcusson-Ståhl, M.; Du Rietz, A.; Uvdal, K.; Karlsson, H.; Cederbrant, K. Protein Interaction, Monocyte Toxicity and Immunogenic Properties of Cerium Oxide Crystals with 5% or 14% Gadolinium, Cobalt Oxide and Iron Oxide Nanoparticles— an Interdisciplinary Approach. *Nanotoxicology* **2021**, *15*, 1035–1058, doi:10.1080/17435390.2021.1966115/SUPPL\_FILE/INAN\_A\_1966115\_SM8757.DOCX.
  131. Savi, M.; Bocchi, L.; Cacciani, F.; Vilella, R.; Buschini, A.; Perotti, A.; Galati, S.; Montalbano, S.; Pinelli, S.; Frati, C.; et al. Cobalt Oxide Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Alter Electromechanical Function in Rat Ventricular Myocytes. *Part. Fibre Toxicol.* **2021**, *18*, doi:10.1186/S12989-020-00396-6.
  132. Alarifi, S.; Ali, D.; Suliman, A.O.; Ahamed, M.; Siddiqui, M.A.; Al-Khedhair, A.A. Oxidative Stress Contributes to Cobalt Oxide Nanoparticles-Induced Cytotoxicity and DNA Damage in Human Hepatocarcinoma Cells. *Int. J. Nanomedicine* **2013**, *8*, 189–199, doi:10.2147/IJN.S37924.
  133. Chattopadhyay, S.; Dash, S.K.; Tripathy, S.; Das, B.; Mandal, D.; Pramanik, P.; Roy, S. Toxicity of Cobalt Oxide Nanoparticles to Normal Cells; An in Vitro and in Vivo Study. *Chem. Biol. Interact.* **2015**, *226*, 58–71, doi:10.1016/j.cbi.2014.11.016.
  134. Cavallo, D.; Ciervo, A.; Fresegna, A.M.; Maiello, R.; Tassone, P.; Buresti, G.; Casciardi, S.; Iavicoli, S.; Ursini, C.L. Investigation on Cobalt-Oxide Nanoparticles Cyto-Genotoxicity and Inflammatory Response in Two Types of Respiratory Cells. *J. Appl. Toxicol.* **2015**, *35*, 1102–1113, doi:10.1002/jat.3133.
  135. Kim, J.A.; Aberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K.A. Role of Cell Cycle on the Cellular Uptake and Dilution of Nanoparticles in a Cell Population. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 62–68, doi:10.1038/nnano.2011.191.
  136. Gonzalez, L.; Corradi, S.; Kirsch-Volders, M. Current In Vitro Models for Nanomaterial Testing Genotoxicity Issues. In *Nanotoxicology: Progress toward Nanomedicine*; Monteiro-Riviere, N.A., Tran, L.C., Eds.; CRC Press, 2014; pp. 379–380 ISBN 9781138033993.
  137. Oostingh, G.J.; Casals, E.; Italiani, P.; Colognato, R.; Stritzinger, R.; Ponti, J.; Pfaller, T.; Kohl, Y.; Ooms, D.; Favilli, F.; et al. Problems and Challenges in the Development and Validation of Human Cell-Based Assays to Determine Nanoparticle-Induced Immunomodulatory Effects. *Part. Fibre Toxicol.* **2011**, *8*, 8, doi:10.1186/1743-8977-8-8.
  138. Jalili, P.; Huet, S.; Burel, A.; Krause, B.C.; Fontana, C.; Chevance, S.; Gauffre, F.; Guichard, Y.; Lampen, A.; Laux, P.;

- et al. Genotoxic Impact of Aluminum-Containing Nanomaterials in Human Intestinal and Hepatic Cells. *Toxicol. Vitro.* **2022**, *78*, 105257, doi:10.1016/J.TIV.2021.105257.
139. Demir, E.; Burgucu, D.; Turna, F.; Aksakal, S.; Kaya, B. Determination of TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles on Genotoxic Responses in Human Peripheral Blood Lymphocytes and Cultured Embryonic Kidney Cells. *J. Toxicol. Environ. Health. A* **2013**, *76*, 990–1002, doi:10.1080/15287394.2013.830584.
  140. Di Virgilio, A.L.; Reigosa, M.; Arnal, P.M.; Fernández Lorenzo de Mele, M. Comparative Study of the Cytotoxic and Genotoxic Effects of Titanium Oxide and Aluminium Oxide Nanoparticles in Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) Cells. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *177*, 711–718, doi:10.1016/j.jhazmat.2009.12.089.
  141. Akbaba, G.B.; Türkez, H. Investigation of the Genotoxicity of Aluminum Oxide,  $\beta$ -Tricalcium Phosphate, and Zinc Oxide Nanoparticles In Vitro. *Int. J. Toxicol.* **2018**, *37*, 216–222, doi:10.1177/1091581818775709.
  142. Sadiq, R.; Khan, Q.M.; Mobeen, A.; Shah, A. Genotoxicity of Aluminium Oxide, Iron Oxide, and Copper Nanoparticles in Mouse Bone Marrow Cells. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* **2021**, *72*, 315, doi:10.2478/AIHT-2021-72-3578.
  143. Yang, E.J.; Kim, S.; Kim, J.S.; Choi, I.H. Inflammasome Formation and IL-1 $\beta$  Release by Human Blood Monocytes in Response to Silver Nanoparticles. *Biomaterials* **2012**, *33*, 6858–6867, doi:10.1016/J.BIOMATERIALS.2012.06.016.
  144. Vukovic, B.; Milic, M.; Dobrošević, B.; Milic, M.; Ilic, K.; Pavičić, I.; Šeric, V.; Vrček, I.V. Surface Stabilization Affects Toxicity of Silver Nanoparticles in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Nanomaterials* **2020**, *10*, doi:10.3390/nano10071390.
  145. Pourhoseini, S.; Enos, R.T.; Murphy, A.E.; Cai, B.; Lead, J.R. Characterization, Bio-Uptake and Toxicity of Polymer-Coated Silver Nanoparticles and Their Interaction with Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Beilstein J. Nanotechnol* **2021**, *12*, 282–294, doi:10.3762/bjnano.12.23.
  146. Greulich, C.; Diendorf, J.; Geßmann, J.; Simon, T.; Habijan, T.; Eggeler, G.; Schildhauer, T.A.; Epple, M.; Köller, M. Cell Type-Specific Responses of Peripheral Blood Mononuclear Cells to Silver Nanoparticles. *Acta Biomater.* **2011**, *7*, 3505–3514, doi:10.1016/J.ACTBIO.2011.05.030.
  147. Sharifi-Rad, M.; Anil Kumar, N. V.; Zucca, P.; Varoni, E.M.; Dini, L.; Panzarini, E.; Rajkovic, J.; Tsouh Fokou, P.V.; Azzini, E.; Peluso, I.; et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front. Physiol.* **2020**, *11*, 552535, doi:10.3389/FPHYS.2020.00694/BIBTEX.
  148. Rasmus, F.; Ping, O.; Mads, H.; Duy Anh, D.; Hans Jürgen, H.;

- Herman, A. PVP-Coated Silver Nanoparticles and Silver Ions Induce Reactive Oxygen Species, Apoptosis and Necrosis in THP-1 Monocytes. *Toxicol. Lett.* **2009**, *109*, 156–162.
149. Degasperi, G.R.; Denis, R.G.P.; Morari, J.; Solon, C.; Geloneze, B.; Stabe, C.; Pareja, J.C.; Vercesi, A.E.; Velloso, L.A. Reactive Oxygen Species Production Is Increased in the Peripheral Blood Monocytes of Obese Patients. *Metabolism.* **2009**, *58*, 1087–1095, doi:10.1016/j.metabol.2009.04.002.
150. Nymark, P.; Catalán, J.; Suhonen, S.; Järventaus, H.; Birkedal, R.; Clausen, P.A.; Jensen, K.A.; Vippola, M.; Savolainen, K.; Norppa, H. Genotoxicity of Polyvinylpyrrolidone-Coated Silver Nanoparticles in BEAS 2B Cells. *Toxicology* **2013**, *313*, 38–48, doi:10.1016/J.TOX.2012.09.014.
151. García-Rodríguez, A.; Rubio, L.; Vila, L.; Xamena, N.; Velázquez, A.; Marcos, R.; Hernández, A. The Comet Assay as a Tool to Detect the Genotoxic Potential of Nanomaterials., doi:10.3390/nano9101385.
152. Paino, I.M.M.; Zucolotto, V. Poly(Vinyl Alcohol)-Coated Silver Nanoparticles: Activation of Neutrophils and Nanotoxicology Effects in Human Hepatocarcinoma and Mononuclear Cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *39*, 614–621, doi:10.1016/j.etap.2014.12.012.
153. Haase, A.; Dommershausen, N.; Schulz, M.; Landsiedel, R.; Reichardt, P.; Krause, B.C.; Tentschert, J.; Luch, A. Genotoxicity Testing of Different Surface-Functionalized SiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub> and Silver Nanomaterials in 3D Human Bronchial Models. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 3991–4007, doi:10.1007/s00204-017-2015-9.
154. ROCHA, C.; CAVALCANTI, B.; PESSOA, C.Ó.; CUNHA, L.; PINHEIRO, R.H.; BAHIA, M.; RIBEIRO, H.; CESTARI, M.; BURBANO, R. Comet Assay and Micronucleus Test in Circulating Erythrocytes of Aequidens Tetramerus Exposed to Methylmercury. *In Vivo (Brooklyn)*. **2011**, *25*.
155. Ruiz-Ruiz, B.; Arellano-García, M.E.; Radilla-Chávez, P.; Salas-Vargas, D.S.; Toledano-Magaña, Y.; Casillas-Figueroa, F.; Luna Vazquez-Gomez, R.; Pestryakov, A.; García-Ramos, J.C.; Bogdanchikova, N. Cytokinesis-Block Micronucleus Assay Using Human Lymphocytes as a Sensitive Tool for Cytotoxicity/Genotoxicity Evaluation of AgNPs. *ACS Omega* **2020**, *5*, 12005–12015, doi:10.1021/ACSOMEGA.0C00149/ASSET/IMAGES/MEDIUM/AO0C00149\_M005.GIF.
156. Mladenov, E.; Iliakis, G. Induction and Repair of DNA Double Strand Breaks: The Increasing Spectrum of Non-Homologous End Joining Pathways. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2011**, *711*, 61–72, doi:10.1016/J.MRFMMM.2011.02.005.
157. Li, Y.; Chen, D.H.; Yan, J.; Chen, Y.; Mittelstaedt, R.A.; Zhang, Y.; Biris, A.S.; Heflich, R.H.; Chen, T. Genotoxicity of Silver

- Nanoparticles Evaluated Using the Ames Test and in Vitro Micronucleus Assay. *Mutat. Res.* **2012**, *745*, 4–10, doi:10.1016/J.MRGENTOX.2011.11.010.
158. Li, Y.; Doak, S.H.; Yan, J.; Chen, D.H.; Zhou, M.; Mittelstaedt, R.A.; Chen, Y.; Li, C.; Chen, T. Factors Affecting the in Vitro Micronucleus Assay for Evaluation of Nanomaterials. *Mutagenesis* **2017**, *32*, 151–159, doi:10.1093/MUTAGE/GEW040.
159. Tang, Y.; Shen, Y.; Huang, L.; Lv, G.; Lei, C.; Fan, X.; Lin, F.; Zhang, Y.; Wu, L.; Yang, Y. In Vitro Cytotoxicity of Gold Nanorods in A549 Cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2015**, *39*, 871–878, doi:10.1016/J.ETAP.2015.02.003.
160. Risom, L.; Møller, P.; Loft, S. Oxidative Stress-Induced DNA Damage by Particulate Air Pollution. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **2005**, *592*, 119–137, doi:10.1016/J.MRFMMM.2005.06.012.
161. May, S.; Hirsch, C.; Rippl, A.; Bohmer, N.; Kaiser, J.P.; Diener, L.; Wichser, A.; Bürkle, A.; Wick, P. Transient DNA Damage Following Exposure to Gold Nanoparticles. *Nanoscale* **2018**, *10*, 15723–15735, doi:10.1039/C8NR03612H.
162. Paino, I.M.M.; Marangoni, V.S.; de Oliveira, R. de C.S.; Antunes, L.M.G.; Zucolotto, V. Cyto and Genotoxicity of Gold Nanoparticles in Human Hepatocellular Carcinoma and Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Toxicol. Lett.* **2012**, *215*, 119–125, doi:10.1016/J.TOXLET.2012.09.025.
163. Xia, Q.; Li, H.; Liu, Y.; Zhang, S.; Feng, Q.; Xiao, K. The Effect of Particle Size on the Genotoxicity of Gold Nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2017**, *105*, 710–719, doi:10.1002/JBM.A.35944.
164. Nel, A.; Xia, T.; Mädler, L.; Li, N. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science (80-. )*. **2006**, *311*, 622–627, doi:10.1126/SCIENCE.1114397/ASSET/944CFEA6-4820-40BB-8CF4-207416D14257/ASSETS/GRAPHIC/311\_622\_F3.JPEG.
165. Barnard, P.J.; Berners-Price, S.J. Targeting the Mitochondrial Cell Death Pathway with Gold Compounds. *Coord. Chem. Rev.* **2007**, *251*, 1889–1902, doi:10.1016/J.CCR.2007.04.006.
166. Mu, Q.; Hondow, N.S.; Krzemiński, Ł.; Brown, A.P.; Jeuken, L.J.; Routledge, M.N. Mechanism of Cellular Uptake of Genotoxic Silica Nanoparticles. **2012**, doi:10.1186/1743-8977-9-29.
167. Yoshida, T.; Yoshioka, Y.; Matsuyama, K.; Nakazato, Y.; Tochigi, S.; Hirai, T.; Kondoh, S.; Nagano, K.; Abe, Y.; Kamada, H.; et al. Surface Modification of Amorphous Nanosilica Particles Suppresses Nanosilica-Induced Cytotoxicity, ROS Generation, and DNA Damage in Various Mammalian Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *427*, 748–752, doi:10.1016/J.BBRC.2012.09.132.

168. Gonzalez, L.; Thomassen, L.C.J.; Plas, G.; Rabolli, V.; Napierska, D.; Decordier, I.; Roelants, M.; Hoet, P.H.; Kirschhock, C.E.A.; Martens, J.A.; et al. Exploring the Aneugenic and Clastogenic Potential in the Nanosize Range: A549 Human Lung Carcinoma Cells and Amorphous Monodisperse Silica Nanoparticles as Models. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 382–395, doi:10.3109/17435390.2010.501913.
169. Rossi, G.; Barnoud, J.; Monticelli, L. Polystyrene Nanoparticles Perturb Lipid Membranes. *J. Phys. Chem. Lett.* **2014**, *5*, 241–246, doi:10.1021/jz402234c.
170. Gopinath, P.M.; Saranya, V.; Vijayakumar, S.; Mythili Meera, M.; Ruprekha, S.; Kunal, R.; Pranay, A.; Thomas, J.; Mukherjee, A.; Chandrasekaran, N. Assessment on Interactive Prospectives of Nanoplastics with Plasma Proteins and the Toxicological Impacts of Virgin, Coronated and Environmentally Released-Nanoplastics. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–15, doi:10.1038/s41598-019-45139-6.
171. Rubio, L.; Barguilla, I.; Domenech, J.; Marcos, R.; Hernández, A. Biological Effects, Including Oxidative Stress and Genotoxic Damage, of Polystyrene Nanoparticles in Different Human Hematopoietic Cell Lines. *J. Hazard. Mater.* **2020**, *398*, 122900, doi:10.1016/j.jhazmat.2020.122900.
172. Vecchiotti, G.; Colafarina, S.; Aloisi, M.; Zarivi, O.; Di Carlo, P.; Poma, A. Genotoxicity and Oxidative Stress Induction by Polystyrene Nanoparticles in the Colorectal Cancer Cell Line HCT116. *PLoS One* **2021**, *16*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0255120.
173. Poma, A.; Vecchiotti, G.; Colafarina, S.; Zarivi, O.; Aloisi, M.; Arrizza, L.; Chichiricc, G.; Di Carlo, P. In Vitro Genotoxicity of Polystyrene Nanoparticles on the Human Fibroblast Hs27 Cell Line. *Nanomaterials* **2019**, *9*, 1299, doi:doi:10.3390/nano9091299.
174. Wright, S.L.; Kelly, F.J. Plastic and Human Health: A Micro Issue? *Environ. Sci. Technol.* **2017**, *51*, 6634–6647, doi:10.1021/ACS.EST.7B00423/SUPPL\_FILE/ES7B00423\_SI\_001.PDF.
175. Ballesteros, S.; Domenech, J.; Barguilla, I.; Cortés, C.; Marcos, R.; Hernández, A. Genotoxic and Immunomodulatory Effects in Human White Blood Cells after Ex Vivo Exposure to Polystyrene Nanoplastics. *Environ. Sci. Nano* **2020**, *7*, 3431–3446, doi:10.1039/d0en00748j.
176. Sarma, D.K.; Dubey, R.; Samarth, R.M.; Shubham, S.; Chowdhury, P.; Kumawat, M.; Verma, V.; Tiwari, R.R.; Kumar, M. The Biological Effects of Polystyrene Nanoplastics on Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Nanomaterials* **2022**, *12*, 1632, doi:10.3390/nano12101632.
177. De Boeck, M.; Lison, D.; Kirsch-Volders, M. Evaluation of the in Vitro Direct and Indirect Genotoxic Effects of Cobalt

- Compounds Using the Alkaline Comet Assay. Influence of Interdonor and Interexperimental Variability. *Carcinogenesis* **1998**, *19*, 2021–2029.
178. Pajic, J.; Rakic, B.; Rovcanin, B.; Jovicic, D.; Novakovic, I.; Milovanovic, A.; Pajic, V. Inter-Individual Variability in the Response of Human Peripheral Blood Lymphocytes to Ionizing Radiation: Comparison of the Dicentric and Micronucleus Assays. *Radiat. Environ. Biophys.* **2015**, *54*, 317–325, doi:10.1007/S00411-015-0596-3/METRICS.
  179. Cheong, A.; Nagel, Z.D. Human Variation in DNA Repair, Immune Function, and Cancer Risk. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 1–25, doi:10.3389/fimmu.2022.899574.
  180. Stead, E.R.; Bjedov, I. Balancing DNA Repair to Prevent Ageing and Cancer. *Exp. Cell Res.* **2021**, *405*, doi:10.1016/J.YEXCR.2021.112679.
  181. Gonzalez, L.; Cundari, E.; Leyns, L.; Kirsch-Volders, M. Towards a New Paradigm in Nano-Genotoxicology: Facing Complexity of Nanomaterials' Cellular Interactions and Effects. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2017**, *121*, 23–29, doi:10.1111/bcpt.12698.
  182. Singh, N.; Manshian, B.; Jenkins, G.J.S.; Griffiths, S.M.; Williams, P.M.; Maffei, T.G.G.; Wright, C.J.; Doak, S.H. NanoGenotoxicology: The DNA Damaging Potential of Engineered Nanomaterials. *Biomaterials* **2009**, *30*, 3891–3914.

## SUMMARY OF DOCTORAL DISSERTATION

### List of Abbreviations Used in Summary

%TDNA - %DNA in comet tail  
AO – Acridine Orange  
BrdU – 5-bromo-2'-deoxyuridine  
CAGR – Compound Annual Growth Rate  
CBMN – Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay  
CBPI – Cytokinesis-Blocked Proliferation Index  
DCF – 2'7'-dichlorofluorescein  
DLS – Dynamic Light Scattering  
EB – Ethidium Bromide  
ECHA - The European Chemical Agency  
FSC – Forward Scatter  
H<sub>2</sub>DCFDA – 2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate  
MMS – Methyl Methanesulfonate  
MN – Micronucleus  
NDI – Nuclear Division Index  
NM – Nanomaterials  
NP – Nanoparticles  
NTA – Nanoparticle Tracking Analysis  
PBMC – Peripheral Blood Mononuclear Cell  
PHA – Phytohaemagglutinin  
PVP – Polyvinylpyrrolidone  
RI – Replication Index  
ROS – Reactive Oxygen Species  
SCE – Sister Chromatid Exchange assay  
SSC – Side Scatter  
TEM – Transmission Electron Microscopy



## INTRODUCTION

Nanotechnology is rapidly becoming one of the fastest-growing markets globally, significantly revolutionizing various industries [1]. In 2022, the global market for nanomaterials (NMs) was valued at USD 10.88 billion and is expected to grow at a compound annual growth rate (CAGR) of 14.8 % from 2023 to 2030 [2]. The European Chemical Agency (ECHA) anticipates that the EU's NMs market will expand at a CAGR of 13.9% in volume and 18,4% in value over the next 5 years, creating a positive economic impact [3]. According to European Commission Recommendation 2022/C 229/01, nanomaterials are described as materials with one or more external dimensions in size range of 1 nm–100 nm [4]. Due to their small size, composition, shape, and surface functionalities nanoparticles (NPs) possess unique physicochemical properties [5]. As a result, the number of anthropogenic NPs being synthesized and applied in various fields, such as medicine, food science, cosmetics, pharmaceuticals, and electronics, continues to rise. This exponential growth raises concerns about the potential negative effects of NPs on living organisms [6].

NPs can enter the human body through inhalation, ingestion, skin or direct injection, when used in biomedical applications [7]. Once inside the body, they inevitably interact with a wide variety of biomolecules and can eventually penetrate cells [8]. Nanoparticles can induce DNA damage directly by binding to DNA or indirectly by interfering with nuclear proteins or generating oxidative stress [88]. Reactive oxygen species (ROS) can cause the oxidation of purines or pyrimidine, leading to DNA strand breaks. If the cell's repair system is intact, these damages may be repaired. However, if not repaired, this can result in gene mutations or chromosomal abnormalities [9]. Numerous studies have demonstrated the ability of NPs to accumulate in cells and organs, leading to the generation of reactive oxygen species (ROS) and genotoxic, DNA-damaging effects [12–15]. Therefore, over the past decade, there has been a significant focus on analyzing the genotoxic potential of NPs and developing strategies for such

assessments [104,181,182]. Since NPs can damage DNA through various mechanisms, new methods are being developed, and well-established tests are being refined to more accurately assess the genotoxic potential of NPs [6,93,100,101].

This thesis aims to explore the genotoxicity of 11 different types of nanoparticles, with a particular focus on their size, concentration, and ability to induce ROS formation. Using human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and established genotoxicity assays, the study contributes to a better understanding of the DNA damage that is induced by various NPs, as well as to inform future strategies for assessing nanoparticle safety. The rapid expansion of nanotechnology makes it critical to identify the risks associated with nanoparticle exposure and this study provide insights, contributing to the growing knowledge in the field.

**The aim of this study** – To investigate the ability of nanoparticles of different compositions, sizes, and shapes to penetrate human peripheral blood mononuclear cells and induce cytotoxic and/or genotoxic effects.

**The main tasks:**

1. Analyze the hydrodynamic size of nanoparticles and its changes in the cell culture medium.
2. Determine the efficiency of nanoparticle uptake by human peripheral blood mononuclear cells.
3. Assess the ability of nanoparticles to induce the formation of reactive oxygen species *in vitro*.
4. Evaluate the cytotoxic effects of nanoparticles on human PBMCs *in vitro*.
5. Assess the genotoxic potential of nanoparticles on human PBMCs *in vitro*.

## SCIENTIFIC NOVELTY

In this study we investigated the cytotoxic and genotoxic potential of various types of nanoparticles (NPs) in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) *in vitro*, using both the alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay. Based on the results, we identified three distinct mechanisms of nanoparticle-induced genotoxicity. Nanoparticles that were efficiently internalized and induced ROS formation—such as  $\text{Co}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , and polystyrene (PS)—caused not only primary DNA damage but also significant chromosomal aberrations. In contrast, nanoparticles that did not induce ROS (e.g., PVP-Ag,  $\text{SiO}_2$ ) resulted solely in primary DNA strand breaks. The study also showed that nanoparticle uptake and ROS generation might be limited, as observed with gold NPs (Au-NPs); however, they still caused a statistically significant increase in primary DNA damage.

Additionally, this study revealed significant variability in genotoxicity results, not only across different NP concentrations but also among different donors, suggesting that individual donor sensitivity may significantly impact genotoxicity outcomes. This finding raises questions about the conventional approach of reporting genotoxicity results from blood-based studies as mean values and highlights the importance of considering individual donor sensitivity to more accurately assess genotoxic potential.

The results of this study provide theoretical insights into nanoparticle-induced genotoxic mechanisms and underscore the importance of comprehensive testing in the field of nanogenotoxicology. They may also contribute to developing new recommendations for nanoparticle research and safety assessment.

## STATEMENTS TO BE DEFENDED

1. Internalization of nanoparticles by PBMCs varies significantly across NP types and sizes.
2. All tested nanoparticles induce a significant amount of primary DNA damage.
3. Nanoparticles inducing ROS were associated with chromosomal damage, while those not inducing ROS showed no such effect.
4. Extended NP exposure notably induces primary DNA damage, supporting a time-dependent relationship in genotoxicity for human PBMCs.
5. Donor-specific factors may significantly impact the outcomes of genotoxicity testing.

## MATERIALS AND METHODS

### *Preparation of Nanoparticle Suspension and Particle Characterization*

This study evaluated the cytotoxic and genotoxic potential of 11 different nanoparticles (Table 2.2). Cobalt oxide nanoparticles ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs) were purchased from US Research Nanomaterials, Inc. (USA) (CAS No. 1308-06-1, Stock No. US3056) and Sigma Aldrich Inc. (USA) (CAS No. 1308-06-1, Cat. No.637025). According to the manufacturer, the primary particle sizes were 10–30 nm, purity – 99% trace metal basis, and specific surface area (SSA) of particles – 50–150  $\text{m}^2/\text{g}$ , and <50 nm size, purity – 99,5% trace metals basis, and specific surface area of the particles as determined by Brunauer, Emmett, Teller analysis (BET) – 40–70  $\text{m}^2/\text{g}$ , respectively.

Gold nanoparticles (Au-NPs) were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), with primary particle sizes of 5 nm (Cat. No. 741949), 40 nm spheres (Cat. No. 741981), and 10 nm gold nanorods (Cat. No. 716820), stabilized in citrate buffer. Cytotoxicity analysis revealed that the 10 nm gold nanorods were cytotoxic to human PBMCs. All tested concentrations of NP (0.25 – 7.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reduced cell viability to 0 %, regardless of the exposure time (3 or 24 hours). Consequently, no further experiments with 10 nm gold nanorods were performed.

Polyvinylpyrrolidone (PVP)-coated silver nanoparticles (PVP-Ag-NPs) were kindly provided by UAB Rho Nano (Vilnius, Lithuania) and were reported to have particle sizes of 13 nm and 35 nm. Interestingly, 13 nm size PVP-Ag-NPs showed a cytotoxic effect on human PBMCs, with most tested concentrations (5–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reducing cell viability by more than 30% after 1-hour exposure, and completely inhibiting viability after 24-hour exposure (Supplementary materials, Table S4). Therefore, further experiments with 13 nm PVP-Ag-NPs were not conducted.

Silica nanoparticles ( $\text{SiO}_2$ -NPs) were purchased from Sigma Aldrich, Inc. (USA) (CAS No. 7631-86-9, Cat. No. 637238). According

to the manufacturer, the primary particle size was 10–20 nm, purity – 99.5% trace metals basis.

Aluminum oxide nanoparticles ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs) were also purchased from Sigma Aldrich Inc. (USA), with a size of 13 nm (CAS No. 1344-28-1, Cat. No. 718475) and purity of 99.8% trace metals basis, and size of 50 nm (CAS No. 1344-28-1, Cat. No. 544833). Additionally, polystyrene nanoparticles (PS-NPs) with sizes ranging from 0,05 to 0.1  $\mu\text{m}$  (PP-008-10) were purchased from Spherotech (Chicago, IL, USA).

All nanoparticles were stored according to the manufacturers' recommendations after purchase. Nanoparticle suspensions were prepared depending on the specific assay. For NP uptake, ROS induction analysis, cytotoxicity assessment, and primary DNA damage analysis via alkaline comet assay, suspensions were prepared at a concentration of 0.1% (1 mg/mL). For the sister chromatid exchange assay, micronucleus assay, and chromosome aberration assay, suspensions were prepared at a concentration of 0.5% (5 mg/mL). PVP-Ag-NPs suspensions were prepared in 0.2% PVP solution,  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs in 0.9% NaCl solution and Au-NPs were supplied as a colloidal stabilized stock suspension in citrate buffer.  $\text{SiO}_2$ -,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -, and PS-NP solutions were prepared in RPMI 1640 cell culture medium. All nanoparticle solutions were sonicated at 35 kHz for 30 min in a Bandelin Sonorex Super sonication bath (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Germany) and immediately used.

Hydrodynamic particle size was evaluated via Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) (Nanosight LM10, Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) immediately (0 h), 1 or 3, and 24 h after sonication. The samples were injected into the chamber with a sterile syringe until the liquid reached the tip of the nozzle. Each measurement was performed at 22 °C, with a camera level of 10. The Nanosight NTA 3.1 analytical software was employed. The highest peak size (size distribution peak with most particles) and mean particle size distribution were determined by tracking analysis of the particles' Brownian motion in solution. Additionally, the size and shape of certain nanoparticles were

evaluated by transmission electron microscopy (TEM) (Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs) and dynamic light scattering (DLS) (PVP-Ag-NPs and Au-NPs).

### ***Biological Material***

Experiments were conducted using human peripheral blood obtained from healthy 22–36-year-old volunteers (non-smoking, with no known illness) (Table 2.3). Peripheral blood was collected by venipuncture in heparinized vacutainer tubes (Becton- Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Informed consent was obtained from all subjects involved in the study. The study was conducted in compliance with research ethics requirements adopted by Vilnius University and approved by the Doctoral Committee of Vilnius University (Authorization No. 93 (21 November 2019)).

Approximately 6–7 mL of blood was collected into heparinized vacutainer tubes (Becton-Dickinson, USA). The whole blood from donors was used for the micronucleus (MN) and sister chromatid exchange (SCE) assays, whereas isolated PBMCs were used for the NP uptake and ROS generation analysis, cell viability, and alkaline comet assay.

PBMCs were isolated by Lymphoprep™ density gradient centrifugation according to the manufacturer's instructions (Axis-Shield, Norway). Briefly, equal parts of the blood and RPMI 1640 medium was added to the centrifuge tube and an equal part of Lymphoprep™ was carefully stratified. The resulting solution was centrifuged at room temperature at 800× g for 20 minutes. The cells were then aspirated and washed with RPMI 1640 medium, by centrifugation at 800× g for 10 minutes (Figure 2.1).

### ***Cellular Uptake Analysis using Flow Cytometry***

To determine the potential uptake of NPs in human PBMCs, flow cytometry light scatter analysis was conducted according to Suzuki et al., [107]. Following PBMC isolation, cells were resuspended in RPMI 1640 medium at a concentration of 4×10<sup>5</sup>. The cells were then transferred into sterile 15 mL tubes and exposed to various

concentrations of different NPs for 24 h (Table 2.4). After exposure to NPs, the cells were centrifuged at  $800\times g$  for 10 min, the supernatant was removed, and the cells were resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). The levels of particles taken up by cells were evaluated using the flow cytometer FACSCalibur (BD Biosciences) using 488 nm laser beam (Figure 2.2). A total of ten thousand cells were analyzed for each sample. Data processing was carried out through Floreada.io software. The intensities of forward-scatter(ed) (FSC) light, which represent the size of cells, and side-scatter(ed) (SSC) light, which is proportional to the intracellular density and granularity, which reflects the NPs uptake, were measured [107].

### ***Intracellular ROS Evaluation***

Reactive oxygen species (ROS) production in human PBMCs was evaluated using the cell-permeant 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA) fluorescent probe (Abcam, Cambridge, UK). Intracellular ROS induced the conversion of H<sub>2</sub>DCF-DA into a cell-impermeable green, fluorescent product that can be quantified by flow cytometry within the FITC channel (excitation: 488 nm/emission: 519 nm) [108].

For this analysis, PBMCs were prepared exactly as for the cellular uptake analysis, but after centrifugation, the cells were stained in cell culture media with 20  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>DCFDA. Samples were incubated for 30 min at 37 °C and immediately analyzed on a flow cytometer. Ten thousand cells were analyzed for each sample, and data processing was performed using Floreada.io software.

### ***Cell Viability and DNA Damage Analysis***

Once the uptake of NPs and ROS generation were evaluated, the cytotoxicity and DNA damage-inducing potential of tested NPs were assessed. Following PBMC isolation, cells were resuspended in RPMI 1640 medium at  $1\text{--}2\times 10^5$  cells/mL in sterile 15 mL centrifuge tubes and treated with different concentrations of NPs for 1 or 3 and 24 h at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> environment (Table 2.5). As a positive control,



20  $\mu$ M hydrogen peroxide was used, 1 h before the end of incubation time. A negative/untreated (0  $\mu$ g/mL) control was also included. After the exposure, samples were centrifuged at 800 $\times$  g for 10 min. The supernatant was removed and the cells were resuspended in RPMI 1640 medium.

Cytotoxicity was determined by calculating the number of viable cells using a dual acridine orange and ethidium bromide (AO/EB) staining technique, according to Liu et al. [110] with minor modifications or trypan blue exclusion test (Figure 2.3). Briefly, the staining solution was prepared by combining 1  $\mu$ L of AO (5 mg/mL) and 1  $\mu$ L of EB (3 mg/mL) with 1 mL PBS. Finally, 20  $\mu$ L of cell suspension and 2  $\mu$ L of prepared AO/EB stain were placed on a clean microscope slide, covered with a cover slip, and analyzed under a fluorescent microscope Nikon Eclipse 80i (Fujisawa, Japan) (Figure 2.5). For the trypan blue exclusion test, equal parts of 0.4% trypan blue stain solution and cell suspension were added on a clean microscope slide, covered with a cover slip, and analyzed under a light microscope Nikon ECLIPSE Ti-S (Figure 2.4). At least 100 cells from each sample were scored to determine the percentage of viable cells. According to Azqueta et al. [103], high levels of cytotoxicity can influence DNA migration in the comet assay. To minimize the risk of false positive results, it is recommended that cell viability be maintained above 70–75%.

Levels of primary DNA damage were determined using an alkaline comet assay according to Singh et al. [109]. Briefly, 40  $\mu$ L of cell suspension was mixed with 40  $\mu$ L of fresh 1% low melting point agarose (LMP) in PBS at 37  $^{\circ}$ C (final LMP concentration – 0.5%). A mixture of cells and agarose (80  $\mu$ L) was pipetted onto glass microscope slides precoated with 1% normal melting point (NMP) agarose and covered with a 24 mm  $\times$  24 mm coverslip and allowed to solidify for 10 min at 4  $^{\circ}$ C. Two gels were prepared per sample. After the gels solidified, the coverslips were gently removed and the slides were placed in a cold freshly prepared lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, with 1% Triton X-100 and 10% DMSO

added just before use, pH 10) and kept in the dark for 90 min at 4 °C. After lysis, slides were placed in a horizontal gel electrophoresis tank COMET-20 SYSTEM (Scie-Plas, Cambridge, UK) filled with cold (4 °C), fresh electrophoresis buffer (1 mM Na<sub>2</sub>EDTA and 300 mM NaOH, pH 13) and left in the solution for 20 min to facilitate DNA unwinding. Then, electrophoresis was carried out at 19 V and 300 mA (1 V/cm) for 30 min. To maintain the buffer temperature during electrophoresis, the platform was cooled using a refrigeration unit (FL300, Julabo, Seelbach, Germany), and the circulation of the buffer was additionally maintained by a pump (Watson-Marlow sci Q400, Marlow, UK). After electrophoresis, the slides were neutralized with Tris HCl buffer (0.4 M Tris HCl, pH 7.5) and each gel was stained with 80 µL of 20 µg/mL ethidium bromide. All the above steps were conducted under dim light to prevent additional DNA damage (Figure 2.6).

The slides were examined under 400× magnification using a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i, Japan) by a single scorer. Image capture and analysis were performed using LUCIA Comet Assay™ software version 7.60 (Laboratory Imaging, s.r.o., Praha, Czech Republic). For each sample, two gels were prepared and 50 nucleoids (“comets”) per gel were randomly selected and scored, resulting in a total of 100 comets per sample. The comet’s head contains intact DNA, while fragmented (damaged) DNA is located in its tail. Thus, the percentage of DNA in the comet tail (% TDNA) was used as an indicator of DNA damage.

Five independent cytotoxicity and comet assay experiments using blood samples from different donors were carried out. Results are presented as mean±SEM.

### ***Micronucleus Assay***

Heparinized whole blood was diluted in the ratio of 1:15 with HEPES-buffered RPMI 1640 medium supplemented with 12% heat-inactivated newborn calf serum, 7.8 µg/mL phytohemagglutinin P, and 50 µg/mL gentamycin. Cell cultures were incubated in the glass vials at 37 °C for a total period of 72 h (Figure 2.7). Nanoparticle solutions

were prepared as described above and added to the lymphocyte cultures 24 hours after initiation of culture (Table 2.6). Two parallel cultures were used for each concentration. Two cultures were left untreated and served as untreated control (0 µg/mL), while two cultures were treated with 45 µg/mL of doxorubicin (final concentration 0.02 µg/mL) and were used as a positive control. Cytochalasin B was added forty-four hours after initiation of culture at 6 µg/mL to block cytokinesis and to obtain binucleated cells. After a total period of 72 hours, cells were harvested by centrifugation for 8 min at 400× g. Before fixation, cells were subjected to cold hypotonic treatment (0.075 M KCl), then centrifuged immediately and fixed three times with cold fixative (methanol: acetic acid, 5:1; the first portion of fixative was diluted with an equal volume of 0.9% NaCl). The fixed cells were dropped onto slides and air-dried. Conventional staining with May-Grünwald/Giemsa stains was used. Slides were analyzed with a Nikon Eclipse E200 microscope. No less than a thousand cytochalasin B-blocked binucleated cells were analyzed per culture and concentration. Binucleated cells containing MN were documented using LUCIA Cytogenetics™ Database software (Laboratory Imaging, s.r.o., Czech Republic). To compare the proliferation status of the culture CBMN assay for lymphocyte samples treated with different nanoparticle concentrations, the Cytokinesis-Block Proliferation Index (CBPI) was calculated. The proportion of mononuclear (MONO), binucleated (BN), tri-, and tetranucleated (MULTIN) cells per 500 cells scored were calculated for each sample according to the equation [97]:

$$CBPI = \frac{(\text{No. MONO cells}) + (2 \times \text{No. BN cells}) + (3 \times \text{No. MULTIN cells})}{(\text{total number of cells})},$$

The percentage of cytostasis was calculated as described by OECD (TG487) [97]:

$$\% \text{ cytostasis} = 100 - 100 \times \left( \frac{CBPI_T - 1}{CBPI_C - 1} \right),$$

where T – cell cultures treated with nanoparticles and C – negative/untreated control cultures.

### *Sister Chromatid Exchange (SCE) Assay*

Whole blood cultures were set up as described in the MN section, except with 5-bromo-2'-deoxyuridine (10 µg/mL). Cell cultures were incubated in glass vials at 37 °C for a total period of 72 h (Figure 2.8). Different NP concentrations were added 48 hours after the culture initiation (Table 2.7). Two parallel cultures were used for each concentration. Two cultures were left untreated and served as untreated control (0 µg/mL), while two cultures were treated with methyl methane sulfonate (MMS, final concentration 25 µg/mL) which was used as a positive control. The cultures were exposed to colchicine at a final concentration of 0.6 µg/mL for the last 3 h of incubation. The cells were harvested at 72 hours of growth, hypotonically swollen in warm 0.075 M KCl, and fixed in cold methanol: acetic acid (3:1). Air-dried slides were differentially stained by fluorescence plus the Giemsa technique as has been described previously [115]. Briefly, the slides were stained for 10 min. with 10 µg/ml of Hoechst 33258 dye (dissolved in 0.07 M Sorensen's buffer, pH 6.8). Then the slides were rinsed, mounted with citrate buffer (pH 8.5), covered with coverslips, and exposed to UV light (400 W mercury lamp at a distance of 15 cm) for 6–7 min. Slides were then rinsed and stained for 3–4 minutes with 5% Giemsa.

Fifty 2<sup>nd</sup> division metaphases per concentration were analyzed for sister chromatid exchanges (Figure 2.9). Additionally, the average number of replications completed by metaphase cells was evaluated by calculating the replication index (RI) for each sample, following equation [115,116]:

$$RI = \frac{(1 \times M1) + (2 \times M2) + (3 \times M3)}{n},$$

where M1, M2, and M3 are the number of metaphase cells in the first, second, or third/fourth cell cycle, respectively and n marks the total number of cells (in our case a total of 200).

## ***Statistical Analysis***

Statistical methods were used according to the nature of the data and the type of analysis needed. A t-test was used to analyze the trypan blue exclusion test results. In separate experiments conducted with cells from different donors, tests for p-values were assessed based on the data: Mann-Whitney U test was used for the comet assay results, an unequal variances t-test (Welch's) was used for SCE data analysis, and a z-test for proportions for MN analysis (<https://www.statskingdom.com/>, accessed on 24 of July, 2024). Since all genotoxicity tests were repeated several times using peripheral blood mononuclear cells from different donors, it was impossible to pool a raw data from these experiments, and calculating significance of differences of in mean values would result in a loss of statistical power. Therefore, p-values from each separate experiment were pooled and evaluated using Fisher's combined probability test. First, Fisher's statistics were calculated using the formula  $Fp = -2 \sum_{i=1}^n \ln(P_i)$ , where  $n$  is number of experiments, and  $P_i$  is p-value calculated for the  $i^{\text{th}}$  experiment. This test statistics has  $\chi^2$ - distribution with  $df = 2n$ . The combined p-value was calculated as the right-tail probability  $P_{\chi^2(2n)}(F_p > f_p)$ , where  $f_p$  is the observed  $F_p$  value. To decrease the probability of Type I error, the combined p-value was adjusted using the Bonferroni correction – each calculated p-value was multiplied by  $n$ .

In addition, the Jonckheere-Terpstra trend test was used to evaluate a dose-dependency in the case of all three genotoxicity endpoints using Real Statistics Resource Pack software [118].

## RESULTS

### *Characterization of Nanoparticles*

The hydrodynamic diameter of nanoparticles in cell culture medium (RPMI 1640) was evaluated using NTA immediately (0 h), 1 or 3 h (depending on NPs tested), and 24 h after sonication. The NTA analysis showed that all tested nanoparticles agglomerated in cell culture medium in time, as mean size distributions of up to 320 nm were observed (Table 3.1).

Nanoparticles with a primary size of less than 20 nm, such as SiO<sub>2</sub>- (10–20 nm), Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- (13 nm), Au- (5 nm), and Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs (10–30 nm) exhibited significant agglomeration in cell culture media, with mean particle sizes increasing up to 20–30 times their primary times. It is important to note that it may be difficult to detect primary nanoparticles that are approximately 10 nm in size, as they can be overshadowed by the larger agglomerates [120]. In comparison, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- (50 nm), Au- (40 nm), and 50 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs retained some fraction of their primary size (73–82 nm), with the mean particle sizes being 3–4 times larger than their primary sizes.

### *Nanoparticle Uptake Analysis*

The capacity of tested NPs to be internalized by human PBMCs, following 24 h of exposure, was evaluated by measuring changes in side-scattering light intensities using a flow cytometer. The percentage of relative uptake (fold-increase) was determined by measuring the increase in the side-scattering light intensities compared to the untreated control.

It was observed that Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs with the primary size of 10–30 and <50 nm were efficiently internalized by human PBMCs (Figure 3.10). Compared to the untreated control (0 µg/mL), a nearly 1.4-fold, 1.9-fold, and 2-fold increase in SSC intensities were observed when cells were exposed to 40, 80, and 160 µg/mL of 10–30 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs, respectively. When exposed to the same concentrations of <50 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs, the SSC intensities, compared to the untreated control increased by 1.7-fold, 2-fold, and 3.3-fold, respectively. Interestingly,

the uptake levels of particles with a primary size of <50 nm were higher than those of particles with a primary size of 10–30 nm (Figure 3.10).

PVP-coated Ag nanoparticles were efficiently taken up by human PBMCs. Compared to the untreated control, nearly 1.2-fold, 1.6-fold, and 2.8-fold increases in SSC intensities were observed when cells were exposed to 10, 20, and 50  $\mu\text{g/mL}$  of AgNPs, respectively (Figure 3.11).

In contrast, following 24 h exposure of human PBMCs to different concentrations (2–4.5  $\mu\text{g/mL}$ ) of 5 and 40 nm gold nanoparticles, no changes in SSC intensities were observed, indicating limited internalization (Figure 3.12).

High SSC intensities (histogram shifts to the right) were observed following a 24 h treatment of human PBMCs to 13 nm and 50 nm size  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs (40–160  $\mu\text{g/mL}$ ) (Figure 3.13). Compared to the untreated control, 1.9-fold, 2.8-fold, 2.5-fold, and 3-fold increases were detected at 40, 80, 100, and 160  $\mu\text{g/mL}$  concentrations of 13 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs (Figure 3.13 b), while 3-fold, 2.8-fold, 3.5-fold, and 3.6-fold increases in SSC intensities were observed in PBMCs exposed to 50 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs, respectively, (Figure 3.13 c). Although the uptake of larger  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nanoparticles was more efficient, the uptake of smaller nanoparticles was concentration-dependent ( $R^2 = 0.85$ ,  $P = 0.026$ ).

A 2.2–2.4-fold increase in SSC intensities over the background was detected following human PBMC exposure to different concentrations of  $\text{SiO}_2$ -NPs (40–100  $\mu\text{g/mL}$ ), indicating the notable uptake of these nanoparticles (Figure 3.14). Although uptake decreased at 160  $\mu\text{g/mL}$ , likely due to the formation of larger agglomerates, SSC intensities remained 1.6-fold higher than in the untreated control.

Finally, during the analysis of intracellular internalization of polystyrene nanoparticles, a statistically significant correlation was found between PS-NP concentration and SSC intensity ( $R^2 = 0.97$ ,  $P = 0.002$ ). Compared to the negative control, after 24 hours of exposure to different concentrations of PS-NPs (10, 50, 100, 500  $\mu\text{g/mL}$ ), SSC intensity in human PBMCs increased by approximately 1.13, 2.2, 2.13, and 5.4 times, respectively (Figure 3.15).

## ***Analysis of Nanoparticle Induced ROS***

One of the pathways through which nanoparticles induce DNA damage is via ROS generation [129]. Therefore, the nanoparticles' abilities to induce reactive oxygen species (ROS) generation in human PBMCs after a 24 h exposure was evaluated using H<sub>2</sub>DCFDA fluorescent dye and a flow cytometer.

Most of the particles tested did not induce ROS generation. No significant induction of ROS in human PBMCs, following 24 h exposure to PVP-Ag-NPs (10–50 µg/mL) was observed compared to the untreated control (0 µg/mL) (Figure 3.17). Similarly, ROS generation was not induced by SiO<sub>2</sub>-NPs and Au-NPs, regardless of their size (5 or 40 nm) (Figure 3.20 and Figure 3.18, respectively).

Interestingly, aluminum oxide nanoparticles induced slight ROS generation in human PBMCs compared to the background levels (7.1%). The highest levels of ROS were generated in cells exposed to 160 µg/mL of 13 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs and to 100 µg/mL of 50 nm Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs (8.2% and 10.0%, Figure 3.19). Compared to the untreated control, these ROS changes were not considered biologically relevant; however, they should be taken into consideration.

Exposure to smaller Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs (primary size: 10–30 nm) resulted in a slight increase in fluorescence intensity of DCF, measuring at 8 %, 10.88 %, 9.9 %, respectively, compared to the untreated control (8.06 %). Conversely, exposure to nanoparticles with a primary size of <50 nm elicited higher ROS formation, with percentages reaching 11.51%, 13.84%, and 23.36%, respectively (Figure 3.16).

A similar tendency was observed when human PBMCs were exposed to polystyrene nanoparticles (10, 50, 100 µg/mL). DCF fluorescence intensities were increased up to 28.5%, 30.97%, and 24.65%, respectively, while in negative control it was 23.08% (Figure 3.21).



## ***Cytotoxicity and Induction of DNA damage***

Human PBMCs were treated with different concentrations of nanoparticles (Table 2.5) for 1 or 3 and 24 h to determine their cytotoxic potentials using a dual ethidium bromide and acridine orange staining technique or trypan blue exclusion test and DNA-damaging properties via alkaline comet assay. The aneugenic and clastogenic effects of nanoparticles were assessed using a cytokinesis-block micronucleus assay. Peripheral blood from 3 donors was exposed to different nanoparticle concentrations at the 24th hour of cell growth (Table 2.6). As part of the methods, the cytokinesis-blocked proliferation index (CBPI) or nuclear division index (NDI) was calculated. Additionally, the genotoxicity of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs was evaluated using a sister chromatid exchange (SCE) test *in vitro* (Table 2.7).

### *Cobalt Oxide Nanoparticles*

The cells of five healthy donors were exposed to 10–30 nm and <50 nm primary size Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs (concentrations 20–80 µg/mL) for 1 and 24 hours. As a positive control, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 µM) was used, which did not have an impact on cell viability, although induced a significant increase in %TDNA – 40.09±9.8 % (%±SEM). None of the tested Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs concentrations exert any relevant cytotoxicity on human PBMCs after short- and long-term exposure (Supplementary materials, Table S1). Therefore 20–80 µg/mL NP concentrations were used in DNA damage analysis with an alkaline comet assay. As demonstrated, a statistically significant increase in %TDNA was observed in PBMCs following 1 and 24 hours of exposure to all 10–30 nm and <50 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs concentrations (Figure 3.22 and Figure 3.23, respectively). Dose-dependent increase in %TDNA was evident for all treatment regiments ( $P < 0.05$ , Jonckheere-Terpstra test), however, in the case of 10–30 nm nanoparticles and 24 hours exposure dose-effect relationship was clearly non-linear. Overall, exposure to Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs was generally associated with a concentration-dependent increase in DNA lesions. As expected, longer exposure times (24 hours) induced significantly more DNA damage compared to 1-hour treatments. Additionally, data

analysis using the Wilcoxon Signed-Rank test indicated that larger NPs caused substantially higher amounts of DNA damage compared to smaller NPs ( $P = 0.0012$  for 1-hour exposure and  $P = 0.012$  for 24-hour exposure). Interestingly, interindividual differences were observed. A two-way ANOVA analysis revealed statistically significant differences not only between doses of nanoparticles but also between all donors after both 1-hour and 24-hour incubation (Supplementary materials, Table S2). It was non-significant correlation between cytotoxicity and %TDNA in cultures treated for 1 hour with  $<50$  nm nanoparticles ( $r_s = -0.24$ ,  $P = 0.12$ , Spearman's rank correlation) and weak significant correlation for cultures treated with nanoparticles for 24 hours ( $r_s = -0.33$ ,  $P = 0.03$ ). Significant correlation was not observed with 10–30 nm  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs.

Additionally, primary DNA damage and cytotoxic effects of differently sized  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs were evaluated using a sister chromatid exchange (SCE) assay and measurements of the cell replication index (RI). Whole blood from three donors was exposed to  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs with a primary size of 10–30 nm (Figure 3.24) and  $<50$  nm (Figure 3.25) in a dose range of 20–60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As a positive control, methyl methane sulfonate (MMS) was used, resulting in an approximately five-fold increase in the frequency of SCE per cell, compared to the untreated control (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). A statistically significant increase in sister chromatid exchanges was observed at concentrations of 30–60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 10–30 nm  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs and 20–60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for  $<50$  nm  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs (respectively, Figure 3.24 and Figure 3.25). Based on averaged mean values from three donors, the frequency of SCE was concentration-related ( $P < 0.05$ , Jonckheere-Terpstra test). Two-way ANOVA showed that both doses and inter-donor variability were significant for cultures treated with 10–30 nm nanoparticles, however, both factors were insignificant for cultures treated with  $<50$  nm nanoparticles (Supplementary materials, Table S2). These results could be explained by the fact, that in the case of  $<50$  nm nanoparticles all results were quite consistent among all three donors – most of the concentrations tested significantly increased number of SCEs compared to control but

not to each other. For RI, two-way ANOVA showed statistically significant effect of inter-donor variability for cultures treated with 10–30 nm nanoparticles (Supplementary materials, Table S2). Additionally, a statistically significant negative correlation between SCE/cell and RI values were found for 10–30 nm NPs ( $r_s = -0.55$ ,  $P = 0.02$ ), and for <50 nm nanoparticles such correlation was not quite significant ( $r_s = -0.41$ ,  $P = 0.09$ ).

For the analysis of micronuclei induction and the effect of NPs on cell proliferation, whole blood from three donors was exposed to 10–30 nm and <50 nm  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs (20–60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) at 24 hours of cell culture growth (Figure 3.26 and Figure 3.27). As a positive control, doxorubicin (45  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used, substantially increasing the frequency of micronuclei in binucleated cells of all three donors, resulting in an overall mean value of nearly a 6.1-fold increase compared to the untreated control (0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs with a primary size of 10–30 nm significantly induced micronuclei, showed a 2.4-fold, 2.8-fold, 2.9-fold, and 2.3-fold increase over background levels at doses of 20, 30, 40, and 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively (Figure 3.26). Meanwhile,  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs with a primary size of <50 nm showed even higher increases of 2.1-fold, 3.3-fold, 3.8-fold, 3.6-fold, and 3.5-fold compared to negative control (Figure 3.27). However, at some doses this increase was not statistically significant due to a relatively high inter-donor variability. Two-way ANOVA showed that both treatment and donors were significant factors influencing the MN frequency in cultures treated with nanoparticles of both diameters (Supplementary materials, Table S2). The trend for dose response was insignificant for 10–30 nm nanoparticles ( $P = 0.12$ , Jonckheere-Terpstra test) but significant for <50 nm nanoparticles ( $P = 0.008$ ). As for MN frequency, inter-donor variability was also significant for CBPI ( $P < 0.05$ , two-way ANOVA; Supplementary materials, Table S2). A statistically significant negative correlation between MN frequency and CBPI values were found for both 10–30 nm and <50 nm nanoparticles ( $r_s = -0.56$ ,  $P = 0.01$  and  $r_s = -0.72$ ,  $P = 0.001$ , respectively). Additionally, the cytostatic effects of  $\text{Co}_3\text{O}_4$  nanoparticles were evaluated by calculating

%cytostasis from the CBPI. Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs with a primary size of <50 nm had a higher impact on cell viability, compared to the smaller NPs, resulting in nearly 52% of cytostasis at 60 µg/mL, suggesting that higher concentrations of <50 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs may impair cell proliferation and affect their viability (Supplementary materials, Table S3).

### *Silver Nanoparticles*

Peripheral blood mononuclear cells from five healthy donors were exposed to 35 nm PVP-Ag-NPs for 1 and 24 hours. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at a concentration of 20 µM was used as a positive control, which significantly increased the %TDNA to 15.45±3.9% (%±SEM) without affecting cell viability. A 0.2 % PVP solution was used as a solvent control. PBMCs exposed to PVP-coated Ag nanoparticles at a concentration ranging from 5 to 100 µg/mL showed no relevant cytotoxic responses following 1 hour exposure. However, after 24 hours, concentrations exceeding 30 µg/mL reduced cell viability by more than 40% and were therefore considered cytotoxic and not tested further (Supplementary materials, Table S4). DNA damage was significantly increased at all tested Ag-NPs concentrations compared to the solvent control, regardless of the exposure time. After 24 h of exposure, higher DNA damage was observed, with a more than 2-fold increase at 10–20 µg/mL and a 3.9-fold at 30 µg/mL compared the solvent control (0.2% PVP in water) (Figure 3.28). A dose-dependent increase in %TDNA was observed after 24-hour exposure, ( $P < 0.001$ , Jonckheere-Terpstra test), and statistically significant differences between donors were observed, regardless of the exposure time (1- or 24-hour exposure) ( $P < 0.001$  and  $P=0.005$ , respectively, two-way ANOVA) (Supplementary materials, Table S4).

Chromosomal damage and CBPI were evaluated by CBMN assay. Blood samples from three healthy donors were exposed to a different concentration of PVP-Ag-NPs (5 – 30 µg/mL). As a positive control, doxorubicin (45 µg/mL) was used, which significantly increased the frequency of micronuclei (7.73±0.78‰ (%±SEM)).

None of the tested NP concentrations induced a statistically significant increase in micronucleus frequency or changes in CBPI, with nanoparticle-induced cytotoxicity remaining below 4% (Figure 3.29, Supplementary materials Table S6). Additionally, no significant correlation between nanoparticle concentration and micronucleus frequency was found ( $P = 0.55$ , Jonckheere-Terpstra test). However, two-way ANOVA analysis revealed a statistically significant influence of donor variability on both micronucleus formation frequency and nuclear division index (NDI or CBPI) ( $P = 0.02$ ) (Supplementary materials, Table S5).

### *Gold Nanoparticles*

The PBMCs of five healthy donors were exposed to 5 nm and 40 nm primary size Au-NPs for 3 and 24 hours. Cytotoxicity and DNA damage was assessed using an alkaline comet assay. As a positive control,  $H_2O_2$  (20  $\mu M$ ) was used. No reduction in cell viability was observed when human PBMCs were exposed to 5 nm AuNPs of up to 7.5  $\mu g/mL$ , and 40 nm NPs of up to 4.5  $\mu g/mL$  (the highest test concentrations possible from the supplied stock sample), regardless of the exposure time (3 or 24 h) (Supplementary materials, Table S7). Using the alkaline comet assay, it was determined that after 3 and 24 hours of exposure, all tested concentrations of 5 nm NPs caused a statistically significant increase in DNA damage compared to the solvent control (Figure 3.30). Additionally, regardless of the exposure time, a statistically significant correlation between 5 nm Au-NP concentration and DNA damage was found ( $P < 0.0001$ , Jonckheere-Terpstra test). As shown in figure 3.31, all tested concentrations of 40 nm Au-NPs also induced a significant increase in DNA damage. A dose-dependent relationship was observed after both 3 hours ( $P = 0.0002$ , Jonckheere-Terpstra test) and 24 hours of exposure ( $P = 0.008$ ).

In summary, 5 and 40 nm Au-NPs, did not exert cytotoxic effects on human PBMCs. The analysis of data obtained using alkaline comet assay with the Wilcoxon Signed-Rank test showed that 5 nm NPs induced significantly more DNA damage than the larger 40 nm Au-NPs

( $P = 0.004$  after 3 hours;  $P = 0.008$  after 24 hours). Additionally, a statistically significant correlation between the concentrations of 5 and 40 nm Au-NPs and the amount of DNA damage was observed. However, two-way ANOVA revealed that the amount of DNA damage significantly differed not only between samples, but also between different donors ( $P < 0.05$ ) (Supplementary materials, Table S8).

### *Aluminum Oxide Nanoparticles*

The genotoxicity of aluminum oxide nanoparticles was assessed using the alkaline comet and cytokinesis-block micronucleus assay. In the alkaline comet assay, PBMCs from five healthy donors were exposed to different concentrations of  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs (0–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 and 24 hours. The cytotoxicity of the NPs was determined using an AO/EB dye mixture. Hydrogen peroxide solution (20  $\mu\text{M}$ ) was used as a positive control, which did not affect cell viability but significantly increased DNA damage ( $11.7 \pm 3.4\%$  ( $\% \pm \text{SEM}$ )). Regardless of NPs size, none of the tested  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NP concentrations had a significant effect on cell viability (Supplementary material, Table S9). As shown in Figure 3.32, almost all tested concentrations of 13 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs caused a significant increase in primary DNA damage compared to negative control after both short- and long-term incubation (except for 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). However, no statistically significant dose-dependent relationship was observed. A similar trend was observed in studies with 50 nm size  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs. After short-term exposure, one concentration (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and after 24-hour of exposure, two concentrations (50 and 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) did not cause a significant increase in DNA damage compared to a negative control (Figure 3.33). Interestingly, after 1-hour of exposure, a weak but significant correlation between nanoparticle concentration and DNA damage was observed ( $P = 0.045$ , Jonckheere-Terpstra test), while no significant correlation was found after 24 hours. Data analysis using Wilcoxon Signed-Rank test revealed that 13 nm NPs induced significantly more DNA damage than 50 nm NPs ( $P = 0.01$  after 1 hour and  $P = 0.002$  after 24 hours). Interestingly, two-way ANOVA showed that, regardless of NP size or exposure time, no

significant differences were observed NP concentrations. However, significant differences were observed between donors ( $P < 0.001$ , two-way ANOVA) (Supplementary materials, Table S10).

In the cytokinesis-block micronucleus assay, whole blood from three donors was exposed to 13 nm (Figure 3.34) and 50 nm (Figure 3.35)  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs. Doxorubicin was used as a positive control, which significantly increased the frequency of micronucleated cells –  $13.6 \pm 3.35\%$  ( $\% \pm \text{SEM}$ ). As shown in Figure 3.34, exposure to 13 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs at concentrations of 40 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  resulted in a significant increase in the frequency of micronuclei, with a 3.2-fold and 2.7-fold increase, respectively, compared to a negative control. Furthermore, a statistically significant correlation was found between the concentration of 13 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NP and micronucleus frequency ( $P = 0.0006$ , Jonckheere-Terpstra test). Analysis of the nuclear division index (NDI) data and nanoparticle cytotoxicity showed that none of the NP concentrations had a significant effect on the NDI or cell viability. At the highest concentration tested (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cell viability was reduced to 80% (Supplementary material, Table S11). In studies with 50 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs, concentrations of 20, 40, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  significantly increased micronucleus frequency in human PBMCs (Figure 3.35). Compared to negative control, the micronucleus frequency increased by 2.6-fold, 2.3-fold, and 1.9-fold, respectively. However, no dose-dependent relationship was found ( $P = 0.42$ , Jonckheere-Terpstra test). Additionally, none of the tested concentrations had a significant effect on the nuclear division index or cell viability, with cell viability remaining above 85% in all cases (Supplementary materials, Table S11).

### *Silica Nanoparticles*

The cytotoxicity and genotoxicity of silica nanoparticles were evaluated in PBMCs from 5 healthy donors following 1- and 24-hour exposures to  $\text{SiO}_2$ -NPs (0–500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) using alkaline comet assay. After 1 hour of exposure, all NP concentrations above 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  significantly reduced cell viability. However, viability did not decrease

by more than 20%, allowing further experiments with these concentrations. In contrast, after 24-hour exposure, SiO<sub>2</sub>-NP concentrations above 300 µg/mL resulted in more than a 20% decrease in cell viability (Supplementary materials, Table S12). Therefore, DNA damage studies following the 24-hour exposure were performed using concentrations ranging from 10 to 300 µg/mL. As shown in Figure 3.36, all tested concentrations of SiO<sub>2</sub>-NPs induced a statistically significant, concentration-dependent increase in DNA damage, regardless of incubation time ( $P < 0.001$ , Jonckheere-Terpstra test). After 24 hours of exposure, concentrations above 100 µg/mL caused 2.4- to 5.9-fold more DNA damage compared to the same concentrations after 1 hour of exposure. Additionally, significant differences were observed not only between tested concentrations but also between donors after both 1 hour and 24 hours of exposure ( $P = 0.02$  and  $P = 0.0001$ , respectively, two-way ANOVA) (Supplementary materials, Table S13).

The genotoxicity of SiO<sub>2</sub>-NPs and their effect on cell proliferation rates were further assessed using a cytokinesis-block micronucleus assay in the peripheral blood of three healthy donors (Figure 3.37). Doxorubicin was used as a positive control and significantly increased the frequency of micronucleated cells to  $28.3 \pm 10.16\%$  ( $\% \pm \text{SEM}$ ). Although a statistically significant correlation between NP concentration and micronucleus frequency was found ( $P = 0.01$ , Jonckheere-Terpstra test), none of the tested SiO<sub>2</sub>-NPs concentrations had a significant effect on micronucleus frequency (Figure 3.37). Compared to the negative control, only, a 1-fold, 1.4-fold, 1.2-fold, and 1.7-fold increase in micronucleus frequency was found in cells after exposure to 50, 100, 150, 200 µg/mL SiO<sub>2</sub>-NPs concentrations, respectively. Additionally, none of the SiO<sub>2</sub>-NPs concentrations significantly affected the nuclear division rate. Based on the NDI data used to assess the cytotoxicity, it was determined that SiO<sub>2</sub>-NPs are not cytotoxic to human PBMCs (Supplementary materials, Table S14).



## *Polystyrene Nanoparticles*

The PBMCs from five healthy donors were exposed to polystyrene nanoparticles for 3 and 24 hours. Cytotoxicity and DNA damage were assessed using an alkaline comet assay. As a positive control, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 μM) was used, which did not affect cell viability but significantly increased %TDNA (15.45±3.9% (%±SEM)). Regardless of the exposure time, none of the tested PS-NP concentrations had a significant effect on cell viability (Supplementary materials, Table S15). Analysis of the alkaline comet assay results revealed a concentration-dependent increase in DNA damage after 3 and 24 hours of exposure to PS-NPs ( $P < 0.001$ , Jonckheere-Terpstra test). All tested PS-NP concentrations caused a statistically significant increase in DNA damage compared to the negative control (Figure 3.38). Additionally, significant interindividual differences were observed in the extent of DNA damage ( $P < 0.001$ , two-way ANOVA) (Supplementary materials, Table S16).

To evaluate the clastogenic and aneugenic effects of PS-NPs, the cytokinesis-block micronucleus assay was performed, and CBPI or NDI was assessed in the whole blood of three healthy donors. Several concentrations of PS-NPs (50, 75, and 125 μg/mL) induced a statistically significant increase in micronucleus frequency compared to the negative control, with fold increases of 3.6, 3.5, and 3.1, respectively (Figure 3.39). However, no significant dose-response relationship between MN frequency and NP concentration was observed ( $P = 0.12$ , Jonckheere-Terpstra test). Analysis of the impact of PS-NPs on the NDI revealed a concentration-dependent decrease in NDI (Figure 3.39). Additionally, cytotoxicity was calculated based on NDI data, showing that the highest concentrations of PS-NPs (100, 125, and 150 μg/mL) reduced cell viability to 80, 83, and 79%, respectively (Supplementary materials, Table S17).

## DISCUSSION

This study evaluated the cytotoxicity and DNA damaging properties of 11 different types of nanoparticles, including  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs (10–30 nm and <50 nm), PVP-Ag-NPs (13 nm and 35 nm), Au-NPs (5 nm, 40 nm, and 10 nm),  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs (13 nm and 50 nm),  $\text{SiO}_2$ -NPs (10–20 nm), and PS-NPs (70 nm). The nanoparticles' ability to penetrate human peripheral blood mononuclear cells, generate reactive oxygen species and induce cytotoxic and/or genotoxic effects was assessed.

Nanoparticle tracking analysis (NTA) revealed that all tested nanoparticles agglomerated in cell culture media, in most cases resulting in sizes larger than their primary sizes. Regarding the impact of nanoparticle agglomeration on their toxicity, there was no consensus. Murugadoss et al. [121] investigated the toxicity of small agglomerates (SAs) and large agglomerates (LAs) of  $\text{TiO}_2$  nanoparticles. The study revealed that in most *in vitro* analyses, there were no significant differences between SA and LA samples, leading to the conclusion that LAs are not less active than SAs. Interestingly, notable differences were observed in THP-1 cells, where LAs induced more damage than SAs. THP-1 cells, being phagocytic, may be more suitable for the uptake of submicron and micron-sized agglomerates, resulting in higher LA uptake and increased cellular damage compared to SAs. In our study, the peripheral blood mononuclear cell layer mainly contains lymphocytes, with a small number of monocytes [122], which could explain the slightly higher uptake levels of larger agglomerates ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs,  $\text{Co}_3\text{O}_4$ , etc.) compared to smaller ones (Au-NPs). However, it is important to note that the DNA-damaging potential is influenced not only by the agglomeration or uptake of NPs but also by the composition of particles and selected cell lines. Magdolenova et al. [123] proposed that larger agglomerates might be less stable, allowing individual NPs to be released from the agglomerate and subsequently taken up by the cells. They also suggested that larger agglomerates precipitate quickly, potentially leading to higher real exposure to NPs compared to particles dispersed in the cell culture media, thus making

them more toxic. Their study showed that large agglomerates induced more DNA damage in all tested cell cultures in vitro, whereas NP suspensions with agglomerates smaller than 200 nm had no genotoxic effects [123]. Overall, there are mixed opinions on whether agglomeration increases the toxicity of nanoparticles. We believe that while agglomeration can facilitate the uptake of NPs in some cases, toxicity is influenced by multiple factors beyond agglomeration alone.

Following exposure, some NPs can interact with plasma membrane components and enter the cell, mainly by endocytosis [7]. According to our findings, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs are efficiently taken up by human PBMCs in a concentration-dependent manner after 24-hour exposure. Before us, just a few studies explored the uptake of cobalt and cobalt-based NPs by human PBMCs. One of them is the study of Chattopadhyay et al. [127] where the uptake of 62 nm size CoO-NPs by normal cells, including human lymphocytes, was reported after 8 and 12 hours of exposure. Uptake of CoO by PBLs was also confirmed by Colognato et al. [128]. However, most studies with cobalt-based NPs are conducted in different cell types. Uptake of  $\approx 50$  nm size Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs was successfully confirmed in Chinese hamster lung fibroblast (V79), ECV-304, and HepG2 cells [125,126]. In our study, NPs with a primary size of <50 nm exhibited higher uptake levels, compared to smaller 10–30 nm size NPs. Several studies suggest that the optimal size for NPs to effectively enter cells via the membrane-wrapping process without a receptor shortage affecting endocytosis should be between 30 and 60 nm [58,72,73,124], which completely agrees with our findings. The uptake of cobalt and cobalt oxide nanoparticles has been previously confirmed in V79, ECV-304, and HepG2 cell lines [125,126]. However, there are limited studies investigating cobalt and cobalt oxide NP uptake in human lymphocytes. Chattopadhyay et al., [127] demonstrated efficient uptake of CoO-NPs by human peripheral blood lymphocytes (PBLs) after 8 and 12-hour exposure, while Colognato et al. [128] similarly confirmed CoO-NPs uptake in PBLs. Once internalized, NPs can damage DNA through both direct and indirect mechanisms, with one of the main pathways being

the induction of reactive oxygen species [129]. In our study, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles (NPs) with a size of <50 nm induced significant ROS formation, while cells exposed to 10–30 nm NPs showed only a slight increase in ROS levels compared to the negative control. Previous studies have confirmed the ability of cobalt and cobalt oxide nanoparticles to induce ROS production and cause DNA damage [26,130–133]. After 72 hours of exposure to Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs, an elevated level of all tested pro-inflammatory cytokines was observed in human peripheral blood mononuclear cells [130]. Additionally, higher ROS levels were detected in lymphocytes following exposure to CoO NPs. It has been suggested that CoO NPs release Co<sup>2+</sup> ions, which can activate NADPH oxidases and induce ROS generation [133]. Increased ROS levels were also observed in rat ventricular monocytes after 1 hour of exposure to Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs (5 and 50 µg/mL) [131] and in HepG2 cells after 48 hours of exposure (10 and 15 µg/mL) [132]. Thus, cobalt and cobalt oxide nanoparticles can induce oxidative stress and promote ROS formation in various cell lines.

Analysis of the genotoxicity of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles (NPs) revealed that, regardless of incubation time (1 or 24 hours), Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs induced a statistically significant, and often concentration-dependent, increase in primary DNA damage. Nanoparticles from the same manufacturer (<50 nm, CAS number 1308-06-1, Sigma-Aldrich, Inc.) have been tested in other studies, where a significant increase in DNA damage was observed in V79 [126], A549, BEAS-2B [134], and PBMCs [12] after exposure to Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs. In our study, <50 nm NPs induced more primary DNA damage compared to 10–30 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs, which may be explained by the more efficient cellular uptake of <50 nm NPs and their ability to induce higher ROS levels. The results from the sister chromatid exchange and Micronucleus assays confirmed that nearly all tested concentrations of Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs induced a statistically significant, and often concentration-dependent, increase in chromosomal damage. As observed in the alkaline Comet assay, larger <50 nm NPs also caused more chromosomal damage compared to 10–30 nm Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs. A statistically significant increase in micronucleus

frequency was also reported by Uboldi et al. [13], who exposed BEAS-2B cells to larger  $\text{Co}_3\text{O}_4$  NPs ( $\approx 397$  nm). In contrast, Co-NP genotoxicity was not confirmed in peripheral blood lymphocytes using the micronucleus test [128,137]; however, these studies used lower concentrations (0.8–6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) compared to our study (20–100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Successful intracellular internalization was also confirmed in studies with aluminum oxide nanoparticles ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs). Similar to the findings with  $\text{Co}_3\text{O}_4$ , larger 50 nm particles were internalized more efficiently into PBMCs compared to smaller 13 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs. Although the ROS levels showed minimal changes after 24 hours of exposure, both particle sizes induced statistically significant DNA strand breaks. In the study by Jalili et al., efficient intracellular internalization of 30 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs was observed in Caco-2 and HepG2 cells, but these particles did not induce significant DNA strand breaks [138]. Similarly, no significant DNA damage was observed in PBMCs after exposure to 39 nm [12] and 16 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs [139]. In contrast, Sliwinska et al. reported a concentration-dependent increase in single-strand DNA breaks and oxidative DNA damage in lymphocytes after 24 hours of exposure to 30 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs [14]. Micronucleus analysis revealed a concentration-dependent increase in micronucleus frequency after exposure to 13 nm NPs, with two concentrations (40 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) significantly increasing the frequency. In studies with 50 nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs, all three tested concentrations induced a significant increase in micronucleus frequency, although no dose-dependency was observed. A similar trend was noted in CHO-K1 cells, where all tested concentrations of  $\approx 28$  nm  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs induced a significant and concentration-dependent increase in micronucleus frequency [140]. While other researchers have reported that  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs had no significant effect on micronucleus formation *in vitro* or *in vivo* [141,142], these studies did not evaluate the nanoparticles' internalization into cells or tissue distribution *in vivo*, raising the question of whether the particles failed to induce genotoxic effects or simply did not reach their target cells.

In studies involving PVP-coated silver nanoparticles (PVP-Ag-NPs), it was found that 13 nm particles exhibited cytotoxic effects on PBMCs, leading to the discontinuation of further studies with these nanoparticles. Smaller Ag-NPs (5–28 nm) have been reported to promote greater cathepsin loss in lysosomes, induce intracellular K<sup>+</sup> loss, increase superoxide levels in mitochondrial membranes, and trigger more pronounced inflammatory processes, which may result in higher cytotoxicity of these NPs [143]. After 24 hours of incubation with 35 nm PVP-coated silver nanoparticles, a concentration-dependent intracellular internalization and a significant increase in primary DNA damage were observed, without ROS induction. Other researchers have also demonstrated the successful internalization of PVP-coated silver nanoparticles in PBMCs [144–146]. Vukovic et al. found not only concentration-dependent internalization of PVP-Ag NPs after 1 and 3 hours of exposure but also a significant increase in primary DNA damage in PBMCs at a concentration of 1 µg/mL [144]. Additionally, after 1 hour of exposure, PVP-Ag-NPs induced ROS formation (H<sub>2</sub>DCFDA), although this effect was not observed after 3-hour exposure. It is suggested that after prolonged incubation (e.g., 3 or 24 hours, as in our study), the decrease in ROS levels may be associated with efficient ROS neutralization by the cell's antioxidant defenses [147]. Interestingly, other ROS detection methods, such as DHE and DiOC<sub>6</sub>, showed a significant increase in ROS levels after exposure to PVP-Ag-NPs [144], highlighting that the sensitivity and specificity of ROS detection methods may influence the types of ROS detected and the results obtained. In contrast, Rasmus et al. detected significant ROS level increases in THP-1 monocytes using the H<sub>2</sub>DCFDA assay after 6 and 24 hours of exposure to 69 nm PVP-Ag nanoparticles [148]. This discrepancy with our results may be explained by the varying sensitivity of cell types. Monocytes are known for their role in directly combating pathogens and are proficient ROS producers. However, lymphocytes predominate in our studies due to the naturally lower monocyte levels in the blood [149]. The ability of PVP-Ag-NPs to induce primary DNA damage has been confirmed in human lung

epithelial cells BEAS-2B and A549 [150,151], while PVA-Ag-NPs induced significant DNA damage in HepG2 and PBMCs [162]. In contrast, in studies using a human bronchial 3D model, 50 nm and 200 nm PVP-Ag NPs had no significant effect on DNA damage levels [154]. Compared to 2D models, NP internalization is naturally lower in 3D models, which may result in reduced DNA damage levels. Although almost all tested concentrations of PVP-Ag NPs in our study induced significant increases in primary DNA damage, none of the concentrations affected chromosome damage, as assessed by the cytokinesis-block micronucleus assay. The alkaline comet assay detects primary DNA damage such as single- and double-strand breaks [95]. These breaks can be repaired by the cell's repair systems, which may explain why the micronucleus assay often shows lower levels of DNA damage compared to the alkaline comet assay [154]. Ruiz-Ruiz et al. investigated the ability of 35 nm and 50 nm PVP-Ag-NPs to induce micronuclei formation in PBMCs and found that none of the tested NP concentrations significantly affected micronucleus frequency [155]. Similar results were observed in BEAS-2B cells exposed to 42.5 nm PVP-Ag-NPs, where none of the tested NP concentrations caused a statistically significant increase in micronucleus frequency, although they did induce a significant and concentration-dependent increase in primary DNA damage [150]. It is suggested that BEAS-2B cells successfully repaired induced DNA breaks, hence no chromosome damage was detected. However, a high number of single- and double-strand DNA breaks could overwhelm the cell's repair capacity or increase the likelihood of repair errors, potentially leading to chromosome damage [156]. Li et al. studied the genotoxicity of 5 nm Ag-NPs in TK6 cells and found a concentration-dependent increase in micronucleus frequency, where concentrations of 25 and 30  $\mu\text{g/mL}$  induced statistically significant differences [157]. A statistically significant and concentration-dependent increase in micronucleus frequency was also observed by Li et al. [158] when 5 nm Ag-NPs and 5 nm PVP-Ag-NPs were tested on L5178Y and TK6 cell lines. It is

suggested that the coating of the tested nanoparticles may have significantly influenced the genotoxicity results.

In studies with gold nanoparticles (Au-NPs), it was found that 10 nm gold nanotubes exhibited cytotoxic effects on PBMCs, and thus, further genotoxicity studies with these nanoparticles were not continued. A study on the A549 cell line revealed that the cytotoxicity of gold nanotubes was concentration-dependent, with oxidative stress identified as the primary factor driving the cytotoxic effect [159]. When evaluating the ability of Au-NPs to enter PBMCs, it was found that, regardless of nanoparticle size (5 or 40 nm), the internalization of Au-NPs into PBMCs was limited, and none of the tested NP concentrations had an impact on ROS formation. Nanoparticle internalization can activate immune cells, such as macrophages and neutrophils, which may promote ROS formation [160]. Therefore, the limited entry of Au-NPs into cells could explain the absence of ROS. Despite this, both sizes of NPs induced a statistically significant, concentration-dependent increase in DNA damage after 3 and 24 hours of exposure. Furthermore, smaller 5 nm NPs caused more DNA strand breaks compared to larger 40 nm Au-NPs. May and colleagues found that 2–4 nm Au NPs efficiently entered A549 cells, but, similar to our study, did not induce ROS formation, but caused a statistically significant increase in DNA damage after 24 hours of exposure [161]. In contrast, Paino et al. reported that 18.2 nm Au-NPs induced significant ROS production in HepG2 and PBMCs, but had no significant impact on DNA damage [162]. Such contradictory findings highlight that the genotoxicity of nanoparticles and its mechanisms may depend on various factors, including the cell line studied, nanoparticle composition, size, and duration of exposure. The genotoxicity of gold nanoparticles and the influence of NP size on genotoxicity have been confirmed in other studies. Lebedova and colleagues found that 5 nm Au-NPs caused more DNA damage in HBEC cells than 50 nm particles [120]. Similarly, 5 nm Au-NPs induced a concentration-dependent increase in DNA damage in HepG2 cells, whereas 20 and 50 nm particles did not have this effect [163]. The impact of NP size on their genotoxicity can be



explained by the fact that smaller nanoparticles generally have a larger surface area and greater catalytic properties, which lead to increased toxicity [164]. Additionally, it is suggested that smaller gold nanoparticles may release toxic ions that inhibit thioredoxin reductase activity, thereby damaging mitochondria and causing DNA damage through secondary genotoxic mechanisms [165].

In studies with silicon dioxide nanoparticles ( $\text{SiO}_2$ -NPs), efficient NP internalization into PBMCs was observed, along with a significant induction of primary DNA damage. However, ROS levels in the cells did not significantly change after 24 hours of exposure to  $\text{SiO}_2$ -NPs. Additionally, a concentration-dependent increase in micronucleus (MN) frequency was observed, although none of the tested NP concentrations significantly increased MN frequency. Mu and colleagues reported similar results in A549, HT29, and HaCaT cell lines, where  $\text{SiO}_2$ -NPs effectively entered these cells and induced a significant increase in DNA strand breaks, even at low NP concentrations (0.1-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) [166]. In a study with 70 nm  $\text{SiO}_2$ -NPs, a concentration-dependent increase in intracellular ROS levels was observed in HaCaT and TLR-1 cells, but significant DNA damage was only detected in HaCaT cells [167]. Conversely, although 10–20 nm  $\text{SiO}_2$ -NPs effectively entered PBMCs and induced ROS formation, no significant effects on cell viability or DNA damage were observed [12]. Furthermore, in the Chromosome Aberration Test, a  $\text{SiO}_2$ -NP concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  did not significantly affect the frequency of chromosomal damage [12]. A similar trend was noted in the A549 cell line, where no significant increase in ROS levels or DNA strand breaks was observed, regardless of nanoparticle size (16 or 60 nm) or exposure time (15 min or 2 hours) [168]. Gonzalez and colleagues also reported no significant increase in micronucleus frequency following  $\text{SiO}_2$ -NP exposure [168]. In our study, the highest levels of primary DNA damage were induced by higher NP concentrations (100–300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , after 24 hours of exposure). However, it is important to note that a statistically significant correlation between DNA strand breaks and nanoparticle cytotoxicity was observed when analyzing the

Alkaline Comet Assay results. It is believed that concentrations above 100  $\mu\text{g/mL}$  may lead to false-positive results; therefore, future studies should avoid using such concentrations, and genotoxicity outcomes are best evaluated at concentrations up to 100  $\mu\text{g/mL}$  [100].

Analysis of flow cytometry results revealed that after 24 hours of exposure to polystyrene nanoparticles (PS-NPs), there was effective and concentration-dependent internalization of PS-NPs into PBMCs, accompanied by increased ROS levels. Molecular simulations by Rossi et al. [169] demonstrated that polystyrene nanoparticles can penetrate lipid membranes, alter membrane structure, and disrupt molecular transport. Additionally, interactions between nanoplastics and cytoplasmic proteins [170] showed that certain cytoplasmic proteins strongly bind to plastic nanoparticles, forming a protein corona that enhances nanoparticle cellular uptake. Rubio and colleagues [171] observed successful internalization of polystyrene nanoparticles in three lymphoblastoid cell lines (THP-1, TK6, Raji-B) after 24 and 48 hours of exposure, with the highest tested concentration (50  $\mu\text{g/mL}$ ) found in nearly all cells. In line with our study, PS-NPs induced ROS formation in TK6 and Raji-B cell lines. Statistically significant increases in ROS levels after PS-NP exposure were also confirmed in PBMCs, HCT116, and Hs27 cell lines [15,172,173]. It is suggested that, like other nanoparticles, micro- and nanoplastics can induce DNA damage through oxidative stress [176]. In our study, all tested PS-NP concentrations induced statistically significant increases in primary DNA damage both after 3 and 24 hours, and significantly increased micronucleus (MN) frequency. Significant DNA damage was also observed in Raji-B and TK6 cell lines [171]. A differential genotoxic mechanism of PS-NPs was noted between cell lines: in TK6 cells, PS-NPs primarily caused oxidative damage, whereas in Raji-B cells, they caused DNA strand breaks. Strong genotoxic effects of PS-NPs were found in monocytes and polymorphonuclear (PMN) cells at 100  $\mu\text{g/mL}$ , with minimal effects in lymphocytes [175]. Regarding chromosomal damage, as in our study, PS-NPs induced statistically significant increases in MN frequency in Hs27 and PBMCs [173,176].

Sarma and colleagues also observed an increase in chromosomal aberrations (chromosomal breaks, rings, and dicentric chromosomes) in PBMCs [176]. However, their study used much higher PS-NP concentrations (500–2000  $\mu\text{g/mL}$ ), making direct comparison difficult. Recent recommendations suggest that nanoparticle concentrations should not exceed 100  $\mu\text{g/mL}$  to avoid false-positive results [100]. In our study, all tested PS-NP concentrations caused a statistically significant and concentration-dependent increase in DNA damage as measured by the Alkaline Comet Assay. However, such trends were not observed for micronucleus frequency. As mentioned before, this discrepancy may be due to methodological differences, with the Comet Assay detecting primary DNA damage and the Micronucleus Assay detecting chromosomal damage. However, Ballesteros and colleagues [175] noted that lymphocytes, monocytes, and PMNs had different sensitivities to PS-NPs. Their study found limited internalization and DNA damage in lymphocytes compared to monocytes and PMNs, which were more sensitive to PS-NP genotoxicity. This suggests that Micronucleus Assay, which primarily analyzed lymphocytes due to the FHA in the cell culture medium, might show less sensitivity compared to the Comet Assay, which included a mixed population of white blood cells. However, this hypothesis should be further investigated.

In summary, the majority of nanoparticles tested ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ -,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -,  $\text{SiO}_2$ -, PVP-Ag-, and PS-NPs) efficiently entered human peripheral blood mononuclear cells after 24 hours of exposure. The only nanoparticles with limited uptake efficiency were the 5 nm and 40 nm gold nanoparticles. All tested nanoparticles induced a significant increase in primary DNA damage after both short-term (1 or 3 hours) and long-term (24 hours) exposure. However, different genotoxicity mechanisms were observed. Cobalt oxide nanoparticles (10–30 nm and <50 nm), aluminum oxide (13 nm and 50 nm), and polystyrene nanoparticles, once internalized, induced varying degrees of ROS formation, likely contributing to DNA strand breaks. Other nanoparticles (PVP-Ag-,  $\text{SiO}_2$ -, Au-), while still inducing significant levels of primary DNA damage, did not significantly alter ROS levels

or showed only minimal changes. This suggests that alternative, ROS-independent genotoxic mechanisms may be involved, such as direct interaction of the nanoparticles with DNA, mechanical disruption, or interference with molecules involved in DNA replication or repair. In the case of gold nanoparticles, another genotoxicity mechanism may be at play, where the nanoparticles did not enter the cells or induce intracellular ROS production but still caused significant DNA damage. Most studies assessing the genotoxic potential of nanoparticles have been conducted in immortalized cell lines. Therefore, our results with primary human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) cannot be directly compared to those of other researchers. It is important to note that during the Comet assay, PBMCs are in the G0 phase of the cell cycle, while immortalized cells are in the G1, S, or G2 phases. Nanoparticles typically interact with the nucleus during mitosis when the nuclear membrane disintegrates. Thus, the stage of the cell cycle can influence nanoparticle uptake and toxicity, with the highest levels of intracellular NP internalization observed during the G2/M phases and the lowest during the G0/G1 phases [11,135]. The genotoxic potential of nanoparticles may arise from mechanical interactions between nanoparticles and cellular structures, such as the mitotic spindle [11], which can affect the rate of cell replication and proliferation, increasing the likelihood of aneuploidy [136]. Chromosome damage analysis revealed that cobalt oxide nanoparticles of both sizes and polystyrene nanoparticles caused the greatest increase in micronucleus (MN) frequency. In a comparative study by Rajiv et al. [12], which assessed the genotoxicity of  $\text{Co}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ , and  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nanoparticles using the Comet and Micronucleus assays in PBMCs,  $\text{Co}_3\text{O}_4$  and  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  nanoparticles induced the highest levels of DNA and chromosomal damage, which were statistically significant.  $\text{SiO}_2$  and  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nanoparticles showed no genotoxic effects, which partially aligns with our findings.

Interestingly, almost all genotoxicity studies conducted by our group revealed significant inter-donor variability, suggesting individual sensitivity to different nanoparticles (Supplementary materials, Table

S18). Only a few studies have also reported individual donor sensitivity when assessing cobalt genotoxicity using the alkaline Comet assay [177] or ionizing radiation effects with the Micronucleus assay [178]. To evaluate the genotoxic potential and safety of nanoparticles, it is crucial to consider individual donor sensitivity. It is well-known that the frequency of both DNA and chromosomal damage can depend on the donor's age, lifestyle, and the efficiency of their DNA repair systems. While some donors' cells can effectively repair DNA damage and prevent mutation formation, others may have impaired mechanisms, leading to increased mutation rates [179,180]. Therefore, it is recommended to conduct genotoxicity studies with a larger number of donors [177]. Additionally, concerns arise regarding whether the results obtained from genotoxicity studies in cultured cells accurately reflect real-life conditions.

## CONCLUSIONS

1.  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -,  $\text{SiO}_2$ -, PVP-Ag-, and PS-NPs are efficiently internalized by human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) after 24-hour exposure, while 5 nm and 40 nm gold NPs cellular internalization is limited.
2. 13 nm PVP-Ag- and 10 nm Au-NPs exert cytotoxic effects on human PBMCs
3.  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs (10–30 nm and <50 nm),  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -NPs (13 nm and 50 nm), and PS-NPs induced ROS formation. Other nanoparticles (PVP-Ag-,  $\text{SiO}_2$ -, Au-NPs), did not alter ROS levels or showed only minimal changes.
4. All tested nanoparticles induced a significant amount of primary DNA damage, evaluated by an alkaline comet assay, with long-term (24 hours) exposure inducing more damage than short-term (1 or 3 hours) exposure.
5. Chromosome damage analysis revealed that  $\text{Co}_3\text{O}_4$ -NPs of both sizes and polystyrene nanoparticles caused the greatest increase in micronucleus (MN) frequency, compared to remaining NPs ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ -,  $\text{SiO}_2$ -, PVP-Ag-NPs).
6. Statistically significant differences between donors were observed with most nanoparticles nearly in all assays.

## PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS / LIST OF PUBLICATIONS

### **Remiantis disertacijos rezultatais paskelbtos publikacijos:**

1. Babonaitė M., Čepulis M., Kazlauskaitė J., Lazutka JR. Evaluation Of *In Vitro* Genotoxicity Of Polystyrene Nanoparticles In Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Toxics*, **2023**, 11, 627. <https://doi.org/10.3390/toxics11070627>
2. Babonaitė M., Striogaitė E., Grigorianaitė G., Lazutka JR. *In Vitro* Evaluation of DNA damage Induction by Silver (Ag), Gold (Au), Silica (SiO<sub>2</sub>) and Aluminum Oxide Nanoparticles in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2024**, 46, 6986-7000. <https://doi.org/10.3390/cimb46070417>
3. Babonaitė M., Dedonytė V., Striogaitė E., Lazutka JR. Cellular Uptake, Induction of Reactive Oxygen Species, and Genotoxicity of Differently Sized Cobalt Oxide Nanoparticles in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells In Vitro – *submitted to Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*

## Pranešimų disertacijos tema sąrašas:

1. Striogaitė E., **Babonaitė M.** Analysis of In Vitro Genotoxicity of Silica Nanoparticles in Human Lymphocytes. Tarptautinėje konferencijoje „The COINS“, 2022, Vilnius, Lietuva. Stendinis pranešimas.
2. **Babonaitė M.**, Dedonytė V., Lazutka JR. Analysis of In Vitro Genotoxicity of Differently Sized Cobalt Oxide Nanoparticles in Human Lymphocytes. 65-a tarptautinė konferencija „Open Readings“, 2022, Vilnius, Lietuva. Stendinis pranešimas
3. **Babonaitė M.**, Lazutka JR. Analysis of In Vitro Genotoxicity of Different Nanoparticles in Human Blood Lymphocytes by Comet Assay. 50-ame European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EEMGS) susitikime, 2022, Maastrichtas, Nyderlandų Karalystė. Stendinis ir trumpasis žodinis (angl. *pitch presentation*) pranešimai
4. **Babonaitė M.**, Kazlauskaitė J., Lazutka JR. Analysis of In Vitro Genotoxicity of Polystyrene Nanoparticles. 13<sup>th</sup> International Conference on Environmental Mutagens, 2022, Otava, Kanada. Stendinis pranešimas.
5. **Babonaitė M.**, Striogaitė E., Čepulis M., Kazlauskaitė J., Dedonytė V., Lazutka JR. Evaluation of Nanoparticle Genotoxicity and Cytotoxicity in Human Peripheral Blood Lymphocytes In Vitro. 8-asis Baltijos šalių genetikos kongresas, 2022, Kaunas, Lietuva. Žodinis pranešimas.
6. Grigorianaitė G., **Babonaitė M.** Evaluation of On Vitro Genotoxicity of Differently Sized Noble Metal Nanoparticles by Comet Assay. Tarptautinė konferencija „The COINS“, 2023, Vilnius, Lietuva. Stendinis pranešimas.
7. **Babonaitė M.**, Čepulis M., Kazlauskaitė J., Lazutka JR. Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of Nano-sized Plastic Particles. 51-asis EEMGS susitikimas, 2023, Malaga, Ispanija. Stendinis ir trumpasis žodinis pranešimai.
8. **Babonaitė M.**, Striogaitė E., Dedonytė V., Lazutka JR. Evaluation of In Vitro Genotoxicity of Differently Sized Cobalt Oxide Nanoparticles. 52-asis EEMGS susitikimas, 2024, Rovinj, Kroatija. Stendinis pranešimas.



## TRUMPOS ŽINIOS APIE DISERTANTĘ

Milda Babonaitė,

Tel. +37062012413

E-mail: [milda.babonaite@gmc.vu.lt](mailto:milda.babonaite@gmc.vu.lt)

### IŠSILAVINIMAS

2019 – 2023 **Doktorantūros studijos.** Gamtos mokslai, biologija, Vilniaus Universitetas, Gyvybės mokslų centras, Botanikos ir genetikos katedra.

2017 – 2019 **Magistro studijos.** Nanobiotechnologijos, Vilniaus Gedimino Technikos Universitetas, Fundamentaliųjų mokslų fakultetas.

2013 – 2017 **Bakalauro studijos.** Genetika, Vilniaus Universitetas, Gyvybės mokslų centras, Botanikos ir genetikos katedra.

### PROFESINĖ PATIRTIS

2020 – dabar Jaunesnioji asistentė. Gyvybės mokslų centras, Vilniaus Universitetas

2017 – 2019 Biologas. Genetikos laboratorija, Gamtos tyrimų centras

### GRANTAI IR APDOVANOJIMAI

2022 Gautas European Environmental Mutagenesis and Genomic Society (EEMGS) grantas kelionei į EMGS konferenciją, vykusią Otavoje, Kanadoje

2022 Žodinis pranešimas, pavadinimu „Evaluation of Nanoparticle Genotoxicity and Cytotoxicity in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells“, 8-ame Baltijos šalių genetikos kongrese, Kaune, buvo įvertintas, kaip geriausias žodinis pranešimas

2023 Trumpasis pranešimas (angl. *Pitch presentation*), pavadinimu „Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of Nano-sized Plastic Particles“, 51-ame EEMGS susitikime, Malagoje, buvo įvertintas kaip geriausias trumpasis pranešimas

## CURRICULUM VITAE

Milda Babonaitė,

Phone No. +37062012413

E-mail: [milda.babonaite@gmc.vu.lt](mailto:milda.babonaite@gmc.vu.lt)

### EDUCATION

2019 – 2023 **Doctoral degree.** Natural Sciences, Biology, Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biosciences.

2017 – 2019 **Master's degree.** Nanobiotechnology, Vilnius Gediminas Technical University, Faculty of Fundamental Sciences.

2013 – 2017 **Bachelor's degree.** Genetics, Vilnius University, Life Sciences Center, Institute of Biosciences.

### PROFESSIONAL EXPERIENCE

2020 – now Junior Assistant. Life Sciences Center, Vilnius University

2017 – 2019 Biologist. Laboratory of Genetics, Nature Research Center

### GRANTS AND AWARDS

2022 Travel Grant Awarded by the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society (EEMGS) to attend the ICEM conference in Ottawa, Canada

2022 Oral presentation „Evaluation of Nanoparticle Genotoxicity and Cytotoxicity in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells“ awarded as the best oral presentation in 8<sup>th</sup> Baltic genetics congress, Kaunas, Lithuania

2023 Pitch presentation „Evaluation of Cytotoxicity and Genotoxicity of Nano-sized Plastic Particles“ awarded as the best pitch presentation in 51<sup>st</sup> EEMGS meeting, Malaga, Spain

## PADĖKA

Norėčiau išreikšti didžiausią padėką savo vadovui prof. habil. dr. Juozui Rimantui Lazutkai už nuolatinę paramą ir pagalbą šios mokslinės kelionės metu. Esu labai dėkinga už tai, kad manimi pasitikėjote ir sutikote būti mano mokslinio darbo vadovu. Jūsų patirtis, kantrybė ir įžvalgos buvo neįkainojamos.

Taip pat esu labai dėkinga citogenetikos ir augalų genetikos laboratorijų kolektyvams: doc. dr. Veronikai Dedonytei, dr. Jūratei Kazlauskaitei, dr. Vaidotui Morkūnui, Astai Stapulionytei, Liucijai Šimanskienei, Emilijai Striogaitei, Aistei Sipavičiūtei, prof. dr. Donatui Žvingilai, doc. dr. Raimondui Šiukštai, doc. dr. Tatjanai Čėsnienei, dr. Violetai Kleizaitėi ir dokt. Vėjūnei Pukenytei. Dėkoju už nuolatinį rūpestį ir pagalbą, draugiškumą, gerą nuotaiką ir bendradarbiavimo dvasią. Jūsų visų dėka GMC jaučiausi kaip namuose. Ypatingai dėkoju doc. dr. Veronikai Dedonytei, doc. dr. Raimondui Šiukštai ir dr. Violetai Kleizaitėi už disertacijos peržiūrą ir svarbias įžvalgas.

Labai dėkoju recenzentams doc. dr. Raimondui Šiukštai ir dr. Mildai Stankevičiūtei, visų pirma už tai, kad sutiko būti mano darbo recenzentais ir už naudingas pastabas ir komentarus, kurie leido tobulinti disertaciją.

Didžiausios padėkos dr. Violetai Jonušienei už pagalbą naudojantis tėkmės citometru, Andriui Burduliui ir dr. Mildai Norkienei už pagalbą naudojantis NTA analizatoriumi ir dr. Justui Lazutkai už atliktus TEM matavimus. Taip pat nuoširdžiai dėkoju visiems tyrimuose dalyvavusiems donorams – be jūsų šis tyrimas nebūtų įmanomas.

Dėkoju VU GMC doktorantūros mokyklai už geranorišką bendravimą ir pagalbą visais, su doktorantūra susijusiais, klausimais. Atskirai norėčiau padėkoti ir Lindai Raulynaitienei, Linai Švambarienei ir Laimutei Čekutienei už skirtą laiką ir nuoširdžią pagalbą rasti atsakymus painiame viešųjų pirkimų procese.

Galiausiai, dėkoju šeimai ir draugams. Jūsų palaikymas, šiluma ir rūpestis mane lydėjo visus studijų metus. Ačiū, kad visada esate šalia!

# PRIEDAI

## SUPPLEMENTARY MATERIALS

**S1 lentelė.** Ląstelių gyvybingumas, po 1 ir 24 val. poveikio 10–30 nm ir <50 nm dydžio Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanodalelėmis. Tyrimai atlikti su 5 skirtingų donorų (D1, D2, D3, D4, D5) periferinio kraujo vienbranduolėmis ląstelėmis. Statistiškai reikšmingi pokyčiai, lyginant su neigiama kontrole (0 µg/mL), pažymėti \* (z-testas)

**Table S1.** Percentage of viable cells following 1- and 24-hour exposure to 10-30 nm and < 50 nm size Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. The study was conducted on PBMCs from 5 donors (D1, D2, D3, D4, D5). Statistically significant changes, compared to untreated control (0 µg/mL) are indicated by an asterisk (\*) (z-test)

Poveikio laikas (val.)	Pirminis ND dydis (nm)	Koncentracija µg/mL	%Gyvybingumas ± SEM / %Viability					Vidurkis / Mean Value
			D1	D2	D3	D4	D5	
1	10-30	0	94 ± 0,2	98 ± 0,1	92 ± 0,3	97 ± 0,2	95 ± 0,2	95,2 ± 1,1
		20	97 ± 0,2	99 ± 0,1	95 ± 0,2	97 ± 0,2	86 ± 0,4*	94,8 ± 2,2
		40	96 ± 0,2	97 ± 0,2	92 ± 0,3	96 ± 0,2	90 ± 0,3	94,2 ± 1,4
		60	91 ± 0,3	88 ± 0,3*	94 ± 0,2	95 ± 0,2	98 ± 0,1	93,2 ± 1,7
		80	95 ± 0,2	94 ± 0,2	88 ± 0,3	96 ± 0,2	93 ± 0,3	93,2 ± 1,4
	<50	0	94 ± 0,2	98 ± 0,1	92 ± 0,3	97 ± 0,2	95 ± 0,2	95,2 ± 1,1
		20	96 ± 0,2	98 ± 0,1	97 ± 0,2	93 ± 0,3	97 ± 0,2	96,2 ± 0,9
		40	95 ± 0,2	92 ± 0,3	96 ± 0,2	94 ± 0,2	94 ± 0,2	94,2 ± 0,7
		60	93 ± 0,3	92 ± 0,3	96 ± 0,2	94 ± 0,2	98 ± 0,1	94,6 ± 1,1
		80	93 ± 0,3	94 ± 0,2	95 ± 0,2	94 ± 0,2	98 ± 0,1	94,8 ± 0,9
24	10-30	0	88 ± 0,3	92 ± 0,3	87 ± 0,3	95 ± 0,2	88 ± 0,3	90,0 ± 1,5
		20	92 ± 0,3	87 ± 0,3	97 ± 0,2*	93 ± 0,3	93 ± 0,3	92,4 ± 1,6
		40	91 ± 0,3	93 ± 0,3	88 ± 0,3	93 ± 0,3	92 ± 0,3	91,4 ± 0,9
		60	92 ± 0,3	88 ± 0,3	93 ± 0,3	97 ± 0,2	95 ± 0,2	93,0 ± 1,5
		80	89 ± 0,3	91 ± 0,3	93 ± 0,3	93 ± 0,3	92 ± 0,3	91,6 ± 0,8
	<50	0	88 ± 0,3	92 ± 0,3	87 ± 0,3	95 ± 0,2	88 ± 0,3	90,0 ± 1,5
		20	92 ± 0,3	93 ± 0,3	95 ± 0,2*	84 ± 0,4*	93 ± 0,3	91,4 ± 1,9
		40	95 ± 0,2	91 ± 0,3	86 ± 0,4	88 ± 0,3	86 ± 0,4	89,2 ± 1,7
		60	93 ± 0,3	93 ± 0,3	89 ± 0,3	90 ± 0,3	93 ± 0,3	91,6 ± 0,9
		80	94 ± 0,2	85 ± 0,4	88 ± 0,3	78 ± 0,4*	89 ± 0,3	86,8 ± 2,6

**S2. lentelė.** Dvifaktorinės ANOVA analizės duomenys, vertinant donorų ir poveikio įtaką Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-ND genotoksiškumui

**Table S2.** Two-way ANOVA analysis of donor variability and treatment effects on Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs genotoxicity

Testas <sup>1</sup>	Poveikis <sup>2</sup>	Vertinamas rodiklis <sup>3</sup>	Kintamieji <sup>4</sup>	Laisvės laipsnis <sup>5</sup>	Kvadratų suma <sup>6</sup>	Kvadratų vidurkis <sup>7</sup>	F statistika (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> ) <sup>8</sup>	P-reiškėmė <sup>9</sup>
Šarminis kometos testas / Alkaline Comet Assay	10-30 nm, 1 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai <sup>10</sup>	4	51,34	12,84	12,60	<b>0,0001</b>
			Poveikis <sup>11</sup>	4	23,36	5,84	5,73	
			Klaida <sup>12</sup>	16	16,29	1,02		
			Viso <sup>13</sup>	24	90,99	3,79		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	61,84	15,46	1,24	0,34
			Poveikis	4	16,64	4,16	0,33	0,85
			Klaida	16	200,16	12,51		
			Viso	24	278,64	11,61		
	<50 nm, 1 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	4	47,43	11,86	10,76	<b>0,0002</b>
			Poveikis	4	38,58	9,65	8,76	
			Klaida	16	17,63	1,10		
			Viso	24	103,64	4,32		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	15,20	3,80	0,88	0,50
			Poveikis	4	11,60	2,90	0,67	0,62
			Klaida	16	69,20	4,33		
			Viso	24	96	4		
	10-30 nm, 24 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	4	330,99	82,75	11,50	<b>0,0001</b>
			Poveikis	4	154,25	38,56	5,36	
			Klaida	16	115,11	7,19		
			Viso	24	600,35	25,01		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	51,44	12,86	1,71	0,20
			Poveikis	4	25,84	6,46	0,86	0,51
			Klaida	16	120,16	7,51		
			Viso	24	197,44	8,23		
<50 nm, 24 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	4	125,55	31,39	2,76	0,06	
		Poveikis	4	585,58	146,40	12,86	<b>0,0001</b>	
		Klaida	16	182,12	11,38			
		Viso	24	893,25	37,22			
	Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	81,20	20,30	1,30	0,31	
		Poveikis	4	76	19	1,21	0,34	
		Klaida	16	250,80	15,68			
		Viso	24	408,00	17			

<sup>1</sup>Assay, <sup>2</sup>Treatment, <sup>3</sup>Biological Endpoint, <sup>4</sup>Source of Variation, <sup>5</sup>DF, <sup>6</sup>Sum of square (SS), <sup>7</sup>Mean square, <sup>8</sup>F statistics (df<sub>1</sub>, df<sub>2</sub>), <sup>9</sup>P-value, <sup>10</sup>Donors, <sup>11</sup>Exposure, <sup>12</sup>Error, <sup>13</sup>Total

**S2 lentelė. Tęstinys**

**Table S2. Continued**

SCM testas / SCE assay	10-30 nm	SCM/ląst. / SCE/cell	Donorai	2	16,89	8,4434	8,67	<b>0,01</b>
			Poveikis	5	18,00	3,60	3,70	<b>0,04</b>
			Klaida	10	9,74	0,97		
			Viso	17	44,63	2,63		
		RI	Donorai	2	0,94	0,47	6,19	<b>0,02</b>
			Poveikis	5	0,18	0,04	0,46	0,80
			Klaida	10	0,76	0,08		
			Viso	17	1,87	0,11		
	<50 nm	SCM/ląst. SCE/cell	Donorai	2	10,02	5,01	2,61	0,12
			Poveikis	5	14,24	2,85	1,48	0,28
			Klaida	10	19,20	1,92		
			Viso	17	43,46	2,56		
		RI	Donorai	2	0,12	0,06	3,34	0,08
			Poveikis	5	0,18	0,04	1,92	0,18
			Klaida	10	0,18	0,02		
			Viso	17	0,48	0,03		
MB testas / MN assay	10-30 nm	MB% / MN %	Donorai	2	40,20	20,10	8,82	<b>0,01</b>
			Poveikis	5	76,29	15,26	6,70	<b>0,01</b>
			Klaida	10	22,80	2,28		
			Viso	17	139,28	8,19		
		BDI / CBPI	Donorai	2	0,33	0,164	7,73	<b>0,01</b>
			Poveikis	5	0,16	0,033	1,542	0,30
			Klaida	10	0,21	0,021		
			Viso	17	0,70	0,041		
	<50 nm	MB% / MN %	Donorai	2	137,60	68,80	10,89	<b>0,003</b>
			Poveikis	5	185,48	37,10	5,87	<b>0,01</b>
			Klaida	10	63,19	6,31		
			Viso	17	386,28	22,72		
		BDI / CBPI	Donorai	2	0,50	0,25	40,98	<b>0,00001</b>
			Poveikis	5	0,30	0,06	9,94	<b>0,001</b>
			Klaida	10	0,06	0,006		
			Viso	17	0,87	0,05		

**S3 lentelė.** Ląstelių branduolio dalijimosi indeksas po poveikio 10-30 nm ir < 50 nm dydžio Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanodalelėmis ir apskaičiuotas ND citotoksiškumas. Tyrimai atlikti su 3 skirtingų donorų (D1, D2, D3) periferiniu krauju. Statistiškai reikšmingi pokyčiai, lyginant su neigiama kontrole (0 µg/mL), pažymėti \* (z-testas) arba \* (Studento t-testas)

**Table S3.** Nuclear division index of PBMCs exposed to 10-30 nm and < 50 nm size Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NPs and their cytotoxicity. The study was conducted on PBMCs from 3 donors (D1, D2, D3). Statistically significant changes, compared to untreated control (0 µg/mL) are indicated by an asterisk (\*) (z-test) or (\*) (Student t-test)

Pirminis ND dydis (nm)	Koncentracija µg/mL	Branduolio Dalijimosi Indeksas (BDI) ± SEM / Nuclear division index (NDI)				Ciotoksiškumas (%) / Cytotoxicity
		D1	D2	D3	Vidurkis / Mean value	
10-30	0	1,81 ± 0,04	1,88 ± 0,03	1,62 ± 0,04	1,66 ± 0,06	0
	20	1,50 ± 0,03*	1,67 ± 0,03*	1,92 ± 0,03*	1,63 ± 0,13	8,85
	30	1,53 ± 0,03*	1,73 ± 0,03*	1,82 ± 0,04*	1,58 ± 0,12	10,30
	40	1,32 ± 0,03*	1,77 ± 0,03	1,60 ± 0,04	1,46 ± 0,04	27,26
	50	1,28 ± 0,02*	1,74 ± 0,03*	1,50 ± 0,04*	1,39 ± 0,03*	34,66
	60	1,23 ± 0,02*	1,77 ± 0,03	1,68 ± 0,03	1,46 ± 0,08	27,28
< 50	0	1,81 ± 0,04	1,88 ± 0,03	1,62 ± 0,04	1,66 ± 0,06	0
	20	1,77 ± 0,04	1,63 ± 0,02*	1,21 ± 0,04*	1,49 ± 0,10	30,48
	30	1,67 ± 0,04*	1,56 ± 0,02*	1,20 ± 0,02*	1,44 ± 0,10*	38,27
	40	1,51 ± 0,03*	1,59 ± 0,02*	1,21 ± 0,02*	1,37 ± 0,05*	43,28
	50	1,46 ± 0,03*	1,61 ± 0,02*	1,19 ± 0,02*	1,39 ± 0,10*	45,49
	60	1,44 ± 0,03*	1,52 ± 0,02*	1,17 ± 0,02*	1,3 ± 0,04*	51,42

**S4 lentelė.** Ląstelių gyvybingumas, po 1 ir 24 val. poveikio 13 nm ir 35 nm dydžio PVP-Ag nanodalelėmis. Tyrimai atlikti su skirtingų donorų (D2, D3, D5, D6, D7, D9) periferinio kraujo vienbranduolėmis ląstelėmis. Statistiškai reikšmingi pokyčiai, lyginant su neigiama kontrole (0 µg/mL), pažymėti \* (z-testas) ir \* (Studento t-testas)

**Table S4.** Percentage of viable cells following 1- and 24-hour exposure to 13 nm and 35 nm size PVP-Ag-NPs. The study was conducted on PBMCs from 5 donors (D2, D3, D5, D6, D7, D9). Statistically significant changes, compared to solvent control (PVP) are indicated by an asterisk (\*) (z-test) or (\*) (Student t-test)

Poveikis	Koncentracija µg/mL	%Gyvybingumas ± SEM / %Viability						
		D2	D3	D5	D6	D7	D9	Vidurkis / Mean value
13 nm, 1 val.	0	93 ± 0,3		89 ± 0,3				91,0 ± 2,0
	PVP	89 ± 0,3		94 ± 0,2				91,5 ± 2,5
	5	83 ± 0,4		83 ± 0,4				83,0 ± 0,0
	10	87 ± 0,3		26 ± 0,4				56,5 ± 30,5
	15	81 ± 0,4		16 ± 0,4				48,5 ± 32,5
	20	61 ± 0,5		0				30,5 ± 30,5
	30	18 ± 0,4		0				9,0 ± 9,0
	40	0		0				0
	50	0		0				0
	60	0		0				0
	80	0		0				0
	100	0		0				0
35 nm, 1 val.	0	91 ± 0,3	85 ± 0,4		88 ± 0,3	92 ± 0,3	90 ± 0,3	89,2 ± 1,2
	PVP	88 ± 0,3	94 ± 0,2		93 ± 0,3	95 ± 0,2	86 ± 0,4	91,2 ± 1,8
	5	75 ± 0,4*	88 ± 0,3		87 ± 0,3	80 ± 0,4*	91 ± 0,3	84,2 ± 2,9
	10	88 ± 0,3	91 ± 0,3		91 ± 0,3	87 ± 0,3*	87 ± 0,3	88,8 ± 0,9
	15	77 ± 0,4*	92 ± 0,3		88 ± 0,3	90 ± 0,3	93 ± 0,3	88,0 ± 2,9
	20	81 ± 0,4	84 ± 0,4*		89 ± 0,3	87 ± 0,3*	87 ± 0,3	85,6 ± 1,4*
	30	86 ± 0,4	80 ± 0,4*		84 ± 0,4*	91 ± 0,3	89 ± 0,3	86,0 ± 1,9
	40	92 ± 0,3	89 ± 0,3		92 ± 0,4	85 ± 0,4*	91 ± 0,3	89,8 ± 1,3
	50	88 ± 0,3	88 ± 0,3		85 ± 0,4	89 ± 0,3	92 ± 0,3	88,4 ± 1,1
	60	89 ± 0,3	91 ± 0,3		92 ± 0,3	91 ± 0,3	89 ± 0,3	90,4 ± 0,6
	80	86 ± 0,4	86 ± 0,4		88 ± 0,3	86 ± 0,4*	86 ± 0,4	86,4 ± 0,4*
	100	80 ± 0,4	84 ± 0,4*		82 ± 0,4*	89 ± 0,3	78 ± 0,4	82,6 ± 1,9*



**S4 lentelė. Tęsinys**

**Table S4. Continued**

1,3 mm, 24 val.	0	88 ± 0,3		89 ± 0,3				88,5 ± 0,5
	PVP	93 ± 0,3		91 ± 0,3				92,0 ± 1,0
	5	84 ± 0,4		79 ± 0,4				81,5 ± 2,5
	10	29 ± 0,5		84 ± 0,4				56,5 ± 27,5
	15	11 ± 0,3		58 ± 0,5				34,5 ± 23,5
	20	0		18 ± 0,4				9,0 ± 9,0
	30	18 ± 0,4		0				9,0 ± 9,0
3,5 mm, 24 val.	0	92 ± 0,3	96 ± 0,2		98 ± 0,1	99 ± 0,1	97 ± 0,2	96,4 ± 1,2
	PVP	74 ± 0,4	98 ± 0,2		99 ± 0,1	98 ± 0,1	94 ± 0,2	92,6 ± 4,7
	5	93 ± 0,3	91 ± 0,2		95 ± 0,3	92 ± 0,2	95 ± 0,2	93,2 ± 2,2
	10	91 ± 0,3	75 ± 0,2*		94 ± 0,3	89 ± 0,2*	96 ± 0,2	89,0 ± 0,8
	15	82 ± 0,4	78 ± 0,3*		95 ± 0,3	89 ± 0,2*	92 ± 0,3	87,2 ± 3,7
	20	86 ± 0,4	66 ± 0,3*		88 ± 0,3*	87 ± 0,3*	91 ± 0,3	83,6 ± 3,2
	30	45 ± 0,5*	55 ± 0,3*		86 ± 0,3*	88 ± 0,4*	91 ± 0,3	73,0 ± 9,6

**S5 lentelė.** Dvifaktorišės ANOVA analizės duomenys, vertinant donorių ir poveikio įtaką 35 nm PVP-Ag-ND genotoksiškumui

**Table S5.** Two-way ANOVA analysis of donor variability and treatment effects on PVP-Ag-NPs genotoxicity

Testas <sup>1</sup>	Poveikis <sup>2</sup>	Vertinamas rodiklis <sup>3</sup>	Kintamieji <sup>4</sup>	Laisvės laipsnis <sup>5</sup>	Kvadratų suma <sup>6</sup>	Kvadratų vidurkis <sup>7</sup>	F statistika (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> ) <sup>8</sup>	P-reiškė <sup>9</sup>
Šarminis kometos testas / Alkaline Comet Assay	35 nm, 1 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai <sup>10</sup>	4	1167,15	291,79	100,99	<b>&lt;0,0001</b>
			Poveikis <sup>11</sup>	11	61,79	5,62	1,94	
			Klaida <sup>12</sup>	44	127,12	2,89		
			Viso <sup>13</sup>	59	1356,06	22,98		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	91,48	22,87	1,23	0,31
			Poveikis	12	388,99	32,42	1,75	0,09
			Klaida	48	889,32	18,53		
			Viso	64	1369,79	21,40		
	35 nm, 24 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	4	522,65	130,66	4,91	<b>0,005</b>
			Poveikis	6	1808,73	301,46	11,33	<b>&lt;0,0001</b>
			Klaida	24	638,55	26,61		
			Viso	34	2969,92	87,35		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	1458,65	364,66	5,61	<b>0,002</b>
			Poveikis	7	2010,38	287,19	4,41	<b>0,002</b>
			Klaida	28	1821,75	65,06		
			Viso	39	5290,78	135,66		
MB testas / MN Assay	35 nm	MB % / MN %	Donorai	2	7,91	3,95	5,93	<b>0,02</b>
			Poveikis	5	3,45	0,69	1,03	0,45
			Klaida	10	6,67	0,67		
			Viso	17	18,03	1,06		
		BDI / CBPI	Donorai	2	0,12	0,06	16,86	<b>0,001</b>
			Poveikis	4	0,01	0,003	0,86	0,53
			Klaida	8	0,03	0,004		
			Viso	14	0,16	0,01		

<sup>1</sup>Assay, <sup>2</sup>Treatment, <sup>3</sup>Biological Endpoint, <sup>4</sup>Source of Variation, <sup>5</sup>DF, <sup>6</sup>Sum of square (SS), <sup>7</sup>Mean square, <sup>8</sup>F statistics (df<sub>1</sub>, df<sub>2</sub>), <sup>9</sup>P-value, <sup>10</sup>Donors, <sup>11</sup>Exposure, <sup>12</sup>Error, <sup>13</sup>Total

**S6 lentelė.** Ląstelių branduolio dalijimosi indeksas po poveikio 35 nm dydžio PVP-Ag-ND ir apskaičiuotas ND citotoksiškumas. Tyrimai atlikti su 3 skirtingų donorų (D2, D6, D9) periferiniu krauju. Statistiškai reikšmingi pokyčiai, lyginant su neigiamą kontrole (0 µg/mL), pažymėti \* (z-testas)

**Table S6.** Nuclear division index of PBMCs exposed to PVP-Ag-NPs and their cytotoxicity. The study was conducted on PBMCs from 3 donors (D2, D6, D9). Statistically significant changes, compared to solvent control (PVP) are indicated by an asterisk (\*) (z-test)

Pirminis ND dydis (nm)	Koncentracija µg/mL	Branduolio Dalijimosi Indeksas (BDI) ± SEM / Nuclear division index (NDI)				Citotoksiškumas (%) / Cytotoxicity
		D2	D6	D9	Vidurkis / Mean value	
35	0	1,94 ± 0,03	1,82 ± 0,03	2,15 ± 0,03	1,97 ± 0,10	
	PVP	2,00 ± 0,04	1,90 ± 0,03	2,11 ± 0,04	2,00 ± 0,06	
	5	2,03 ± 0,03	1,91 ± 0,03	1,95 ± 0,04*	1,96 ± 0,04	4,09
	15	2,13 ± 0,03*	1,89 ± 0,03	2,09 ± 0,03	2,03 ± 0,08	-3,12
	20	2,15 ± 0,03*	1,83 ± 0,03*	2,11 ± 0,04	2,03 ± 0,10	-2,80
	30	2,07 ± 0,03*	1,86 ± 0,03	2,01 ± 0,03*	1,98 ± 0,06	2,36

**S7 lentelė.** Ląstelių gyvybingumas, po 3 ir 24 val. poveikio 5 nm ir 40 nm dydžio Au-ND. Tyrimai atlikti su skirtingų donorų (D2, D6, D7, D8, D9) periferinio kraujo vienbranduolėmis ląstelėmis. Statistiškai reikšmingi pokyčiai, lyginant su neigiama kontrole (0 µg/mL), pažymėti \* (z-testas). CB – citratinis buferis

**Table S7.** Percentage of viable cells following 3- and 24-hour exposure to 5 nm and 40 nm size Au-NPs. The study was conducted on PBMCs from 5 donors (D2, D6, D7, D8, D9). Statistically significant changes, compared to untreated control (0 µg/mL) are indicated by an asterisk (\*) (z-test). CB – citric buffer

Poveikis	Koncentracija µg/mL	%Gyvybingumas ± SEM / %Viability					Vidurkis / Mean value
		D2	D6	D7	D8	D9	
5 nm, 3 val.	0	88 ± 0,3	97 ± 0,2	97 ± 0,2	89 ± 0,3	99 ± 0,1	94,0 ± 2,3
	CB	90 ± 0,3	96 ± 0,2	98 ± 0,1	97 ± 0,2	97 ± 0,2	95,6 ± 1,4
	0,25	92 ± 0,3	98 ± 0,1	96 ± 0,2	92 ± 0,3	96 ± 0,2	94,8 ± 1,2
	0,5	86 ± 0,4	98 ± 0,1	99 ± 0,1	94 ± 0,2	99 ± 0,1	95,2 ± 2,5
	1	86 ± 0,4	96 ± 0,2	96 ± 0,2	90 ± 0,3*	98 ± 0,1	93,2 ± 2,3
	1,5	86 ± 0,4	97 ± 0,2	99 ± 0,1	91 ± 0,3	95 ± 0,2	93,6 ± 2,3
	2	85 ± 0,4	94 ± 0,2	95 ± 0,2	92 ± 0,3	95 ± 0,2	92,2 ± 1,9
	2,5	76 ± 0,4*	92 ± 0,3	98 ± 0,1	81 ± 0,4*	97 ± 0,2	88,8 ± 4,4
	4,5	74 ± 0,4*	96 ± 0,2	97 ± 0,2	65 ± 0,5*	95 ± 0,2	85,4 ± 6,7
	7,5	74 ± 0,4*	95 ± 0,2	96 ± 0,2	77 ± 0,4*	96 ± 0,2	87,6 ± 5,0
40 nm, 3 val.	0	88 ± 0,3	99 ± 0,1	97 ± 0,2	96 ± 0,2	96 ± 1,0	95,2 ± 1,9
	CB	90 ± 0,3	96 ± 0,2	98 ± 0,1	97 ± 0,2	97 ± 0,2	95,6 ± 1,4
	0,25	85 ± 0,4	96 ± 0,2	97 ± 0,2	96 ± 0,2	93 ± 0,3	93,4 ± 2,2
	0,5	88 ± 0,3	97 ± 0,2	98 ± 0,1	95 ± 0,2	96 ± 0,2	94,8 ± 1,8
	1	90 ± 0,3	98 ± 0,1	99 ± 0,1	96 ± 0,2	97 ± 0,2	96,0 ± 1,6
	1,5	94 ± 0,2	95 ± 0,2	98 ± 0,1	91 ± 0,3	94 ± 0,2	94,4 ± 1,1
	2	87 ± 0,3	94 ± 0,2	98 ± 0,1	88 ± 0,3	92 ± 0,3	91,8 ± 2
	2,5	90 ± 0,3	98 ± 0,1	97 ± 0,2	95 ± 0,2	98 ± 0,1	95,6 ± 1,5
	4,5	77 ± 0,4*	95 ± 0,2	97 ± 0,2	92 ± 0,3	91 ± 0,3	90,4 ± 3,5

**S7 lentelė. Tęsinys**

**Table S7. Continued**

5 nm, 24 val.	0	96 ± 0,2	91 ± 0,3	99 ± 0,1	90 ± 0,3	97 ± 0,2	94,6 ± 1,8
	CB	90 ± 0,3	91 ± 0,3	98 ± 0,1	93 ± 0,3	99 ± 0,1	92,0 ± 1,8
	0,25	93 ± 0,3	94 ± 0,2	97 ± 0,2	98 ± 0,1	97 ± 0,2	94,2 ± 1,0
	0,5	92 ± 0,3	92 ± 0,3	98 ± 0,1	96 ± 0,2	98 ± 0,1	95,2 ± 1,4
	1	94 ± 0,2	91 ± 0,3	96 ± 0,2	95 ± 0,2	99 ± 0,1	95,0 ± 1,3
	1,5	94 ± 0,2	93 ± 0,3	96 ± 0,2	93 ± 0,3	95 ± 0,2	94,2 ± 0,6
	2	98 ± 0,1	89 ± 0,3	95 ± 0,2	89 ± 0,3	99 ± 0,1	94,0 ± 2,1
	2,5	93 ± 0,3	85 ± 0,4	95 ± 0,2	89 ± 0,3	99 ± 0,1	92,2 ± 2,4
	4,5	72 ± 0,5*	88 ± 0,3	97 ± 0,2	89 ± 0,3	98 ± 0,1	88,8 ± 4,7
	7,5	72 ± 0,5*	86 ± 0,4	95 ± 0,2	90 ± 0,3	97 ± 0,2	88,0 ± 4,4
40 nm, 24 val.	0	92 ± 0,3	97 ± 0,2	96 ± 0,2	99 ± 0,1	99 ± 0,1	96,6 ± 2,6
	CB	95 ± 0,2	93 ± 0,3	97 ± 0,2	93 ± 0,3*	95 ± 0,2	94,6 ± 0,8
	0,25	95 ± 0,2	95 ± 0,2	99 ± 0,1	93 ± 0,3	95 ± 0,2	95,4 ± 1,0
	0,5	94 ± 0,2	96 ± 0,2	96 ± 0,2	96 ± 0,2	91 ± 0,3	94,6 ± 1,0
	1	87 ± 0,3	95 ± 0,2	95 ± 0,2	97 ± 0,2	99 ± 0,1	94,6 ± 2,0
	1,5	88 ± 0,3	97 ± 0,2	98 ± 0,1	94 ± 0,2	94 ± 0,2	94,2 ± 1,7
	2	95 ± 0,2	95 ± 0,2	97 ± 0,2	95 ± 0,2	96 ± 0,2	95,6 ± 0,4
	2,5	89 ± 0,3	95 ± 0,2	97 ± 0,2	95 ± 0,2	96 ± 0,2	94,4 ± 1,4
	4,5	90 ± 0,3	94 ± 0,2	96 ± 0,2	93 ± 0,3	90 ± 0,3	92,6 ± 1,2

**S8 lentelė.** Dvifaktorišės ANOVA analizės duomenys, vertinant donorių ir poveikio įtaką 5 nm ir 40 nm Au-ND genotoksiškumui

**Table S8.** Two-way ANOVA analysis of donor variability and treatment effects on Au-NPs genotoxicity

Testas <sup>1</sup>	Poveikis <sup>2</sup>	Vertinamas rodiklis <sup>3</sup>	Kintamieji <sup>4</sup>	Laisvės laipsnis <sup>5</sup>	Kvadratų suma <sup>6</sup>	Kvadratų vidurkis <sup>7</sup>	F statistika (df <sub>1</sub> , df <sub>2</sub> ) <sup>8</sup>	P-reiškėmė <sup>9</sup>	
Šarminis kometos testas / Alkaline Comet Assay	5 nm, 3 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai <sup>10</sup>	4	404,82	101,21	15,80	<0,0001	
			Poveikis <sup>11</sup>	9	295,11	32,79	5,12		0,0002
			Klaida <sup>12</sup>	36	230,58	6,41			
			Viso <sup>13</sup>	49	930,51	18,99			
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	1637,32	409,33	20,78	<0,0001	
			Poveikis	9	535,52	59,50	3,02	0,009	
			Klaida	36	709,08	19,70			
			Viso	49	2881,92	58,82			
	40 nm, 3 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	4	301,23	75,31	23,31	<0,0001	
			Poveikis	8	136,17	17,02	5,27	0,0003	
			Klaida	32	103,37	3,23			
			Viso	44	540,77	12,29			
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	526,53	131,63	22,47	<0,0001	
			Poveikis	8	134,98	16,87	2,88	0,02	
			Klaida	32	187,47	5,86			
			Viso	44	848,98	19,30			
	5 nm, 24 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	4	457,75	114,44	19,78	<0,0001	
			Poveikis	8	240,62	30,08	5,20	0,0003	
			Klaida	32	185,18	5,79			
			Viso	44	883,54	20,08			
Gyvybingumas % / Viability, %		Donorai	4	586,68	146,67	7,41	0,0002		
		Poveikis	9	329,78	36,64	1,85	0,09		
		Klaida	36	712,52	19,79				
		Viso	49	1628,98	33,25				

<sup>1</sup>Assay, <sup>2</sup>Treatment, <sup>3</sup>Biological Endpoint, <sup>4</sup>Source of Variation, <sup>5</sup>DF, <sup>6</sup>Sum of square (SS), <sup>7</sup>Mean square, <sup>8</sup>F statistics (df<sub>1</sub>, df<sub>2</sub>), <sup>9</sup>P-value, <sup>10</sup>Donors, <sup>11</sup>Exposure, <sup>12</sup>Error, <sup>13</sup>Total

**S8 lentelė. Tęsinys**

**Table S8. Continued**

Šarminis kometos testas	40 nm, 24 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	4	70,78	17,70	5,76	<b>0,002</b>
			Poveikis	7	35,39	5,06	1,65	0,16
			Klaida	28	85,98	3,07		
			Viso	39	192,14	4,93		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	131,42	32,86	6,72	<b>0,0005</b>
			Poveikis	8	53,20	6,65	1,36	0,25
			Klaida	32	156,58	4,89		
			Viso	44	341,20	7,76		

**S9 lentelė.** Ląstelių gyvybingumas, po 1 ir 24 val. poveikio 13 nm ir 50 nm dydžio Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND. Tyrimai atlikti su skirtingų donorų (D2, D3, D5, D6, D7, D9) periferinio kraujo vienbranduolėmis ląstelėmis. Statistiškai reikšmingi pokyčiai, lyginant su neigiama kontrole (0 µg/mL), pažymėti \* (z-testas) arba \* (Studento t-testas)

**Table S9.** Percentage of viable cells following 1- and 24-hour exposure to 13 nm and 50 nm size Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs. The study was conducted on PBMCs from 5 donors (D2, D3, D5, D6, D7, D9). Statistically significant changes, compared to untreated control (0 µg/mL) are indicated by an asterisk (\*) (z-test) or (\*) (Student t-test)

Poveikis	Koncentracija µg/mL	%Gyvybingumas ± SEM / %Viability						
		D2	D3	D5	D6	D7	D9	Vidurkis / Mean value
13 nm, 1 val.	0	95 ± 0,2	85 ± 0,4		89 ± 0,3	97 ± 0,2	93 ± 0,3	91,8 ± 2,2
	10	88 ± 0,3	84 ± 0,4		94 ± 0,2	93 ± 0,3	89 ± 0,3	89,6 ± 1,8
	15	88 ± 0,3	87 ± 0,4		96 ± 0,2	95 ± 0,2	90 ± 0,3	91,2 ± 1,8
	20	89 ± 0,3	92 ± 0,3		91 ± 0,3	93 ± 0,3	87 ± 0,3	90,4 ± 1,1
	30	87 ± 0,3*	93 ± 0,3		95 ± 0,2	91 ± 0,3	85 ± 0,4	90,2 ± 1,9
	40	85 ± 0,4	59 ± 0,5*		90 ± 0,3	95 ± 0,2	86 ± 0,4	83,0 ± 6,2
	50	86 ± 0,4*	81 ± 0,4		91 ± 0,3	96 ± 0,2	85 ± 0,4	87,8 ± 2,6
	60	82 ± 0,4*	87 ± 0,3		96 ± 0,2	92 ± 0,3	82 ± 0,4*	87,8 ± 2,8
	80	80 ± 0,4*	90 ± 0,3		94 ± 0,2	89 ± 0,3*	84 ± 0,4*	87,4 ± 2,4
	100	87 ± 0,3*	79 ± 0,4		82 ± 0,4	95 ± 0,2	84 ± 0,4*	85,4 ± 2,7
50 nm, 1 val.	0	94 ± 0,2	89 ± 0,3	90 ± 0,3		97 ± 0,2	90 ± 0,3	92,0 ± 1,5
	10	93 ± 0,3	93 ± 0,3	86 ± 0,4		94 ± 0,2	94 ± 0,2	92,0 ± 1,5
	15	95 ± 0,2	94 ± 0,2	92 ± 0,3		94 ± 0,2	95 ± 0,2	94,0 ± 0,6
	20	94 ± 0,2	88 ± 0,3	89 ± 0,3		93 ± 0,3	89 ± 0,3	90,6 ± 1,2
	30	92 ± 0,3	95 ± 0,2	90 ± 0,3		93 ± 0,3	92 ± 0,3	92,4 ± 0,8
	40	91 ± 0,3	94 ± 0,2	93 ± 0,3		87 ± 0,3*	93 ± 0,3	91,6 ± 1,3
	50	95 ± 0,2	94 ± 0,2	95 ± 0,2		89 ± 0,3*	94 ± 0,2	93,4 ± 1,1
	60	94 ± 0,2	95 ± 0,2	89 ± 0,3		87 ± 0,3*	87 ± 0,3	90,4 ± 1,7
	80	95 ± 0,2	89 ± 0,3	88 ± 0,3		89 ± 0,3*	88 ± 0,3	89,8 ± 1,3
	100	93 ± 0,3	88 ± 0,3	91 ± 0,3		95 ± 0,2	91 ± 0,3	91,6 ± 1,2



**S9 lentelė. Tęsinys**  
**Table S9. Continued**

13 mm, 24 val.	0	88 ± 0,3	88 ± 0,3		89 ± 0,3	93 ± 0,3	86 ± 0,4	88,8 ± 1,2
	10	86 ± 0,4	89 ± 0,3		89 ± 0,3	93 ± 0,3	86 ± 0,4	88,6 ± 1,3
	15	86 ± 0,4	85 ± 0,4		86 ± 0,4	87 ± 0,3	85 ± 0,4	85,8 ± 0,4*
	20	89 ± 0,3	89 ± 0,3		90 ± 0,3	79 ± 0,4*	86 ± 0,4	86,6 ± 2,0
	30	82 ± 0,4	82 ± 0,4		93 ± 0,3	85 ± 0,4	83 ± 0,4	85,0 ± 2,1
	40	81 ± 0,4	80 ± 0,4		92 ± 0,3	83 ± 0,4*	80 ± 0,4	83,2 ± 2,3
	50	85 ± 0,4	88 ± 0,3		88 ± 0,3	73 ± 0,4*	82 ± 0,4	83,2 ± 2,8
	60	83 ± 0,4	83 ± 0,4		89 ± 0,3	71 ± 0,5*	81 ± 0,4	81,4 ± 2,9*
	80	79 ± 0,4	85 ± 0,4		85 ± 0,4	90 ± 0,3	78 ± 0,4	83,4 ± 2,2
	100	81 ± 0,4	81 ± 0,4		89 ± 0,3	82 ± 0,4*	74 ± 0,4*	81,4 ± 2,4*
50 mm, 24 val.	0	91 ± 0,3	92 ± 0,3	94 ± 0,2		99 ± 0,1	87 ± 0,3	92,6 ± 2,0
	10	90 ± 0,3	91 ± 0,3	94 ± 0,2		98 ± 0,1	95 ± 0,2	93,6 ± 1,4
	15	88 ± 0,3	93 ± 0,3	96 ± 0,2		97 ± 0,2	95 ± 0,2	93,8 ± 1,6
	20	87 ± 0,3	97 ± 0,2	95 ± 0,2		96 ± 0,2	86 ± 0,4	92,2 ± 2,4
	30	91 ± 0,3	92 ± 0,3	96 ± 0,2		94 ± 0,2	92 ± 0,3	93,0 ± 0,9
	40	92 ± 0,3	94 ± 0,2	93 ± 0,3		95 ± 0,2	90 ± 0,3	92,8 ± 0,9
	50	87 ± 0,3	90 ± 0,3	88 ± 0,3		95 ± 0,2	86 ± 0,4	89,2 ± 1,6
	60	88 ± 0,3	88 ± 0,3	90 ± 0,3		93 ± 0,2	86 ± 0,4	89,0 ± 1,2
	80	90 ± 0,3	87 ± 0,3	85 ± 0,4*		94 ± 0,2	94 ± 0,2	90,0 ± 1,8
	100	94 ± 0,2	88 ± 0,3	94 ± 0,2		92 ± 0,3	92 ± 0,3	92,0 ± 0,8

**S10 lentelė.** Dvifaktorisės ANOVA analizės duomenys, vertinant donorų ir poveikio įtaką Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND genotoksiškumui

**Table S10.** Two-way ANOVA analysis of donor variability and treatment effects on Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs genotoxicity

Testas <sup>1</sup>	Poveikis <sup>2</sup>	Vertinamas rodiklis <sup>3</sup>	Kintamieji <sup>4</sup>	Laisvės laipsnis <sup>5</sup>	Kvadratų suma <sup>6</sup>	Kvadratų vidurkis <sup>7</sup>	F statistika (df <sub>1</sub> ,df <sub>2</sub> ) <sup>8</sup>	P-reikšmė <sup>9</sup>
Šarminis kometos testas / Alkaline Comet Assay	13 nm, 1 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai <sup>10</sup>	4	751,44	187,86	62,3 2	<0,0001
			Poveikis <sup>11</sup>	9	22,92	2,55	0,85	0,58
			Klaida <sup>12</sup>	36	108,51	3,01		
			Viso <sup>13</sup>	49	882,87	18,02		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	671,72	167,93	6,15	0,001
			Poveikis	9	339,62	37,74	1,38	0,23
			Klaida	36	983,08	27,31		
			Viso	49	1994,42	40,70		
	50 nm, 1 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	4	705,71	176,43	83,1 9	<0,0001
			Poveikis	9	28,76	3,20	1,51	0,18
			Klaida	36	76,35	2,12		
			Viso	49	810,83	16,55		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	57,48	14,37	1,99	0,12
			Poveikis	9	76,58	8,51	1,18	0,34
			Klaida	36	260,52	7,24		
			Viso	49	394,58	8,05		
	13 nm, 24 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	4	488,51	122,13	49,0 7	<0,0001
			Poveikis	9	26,50	2,94	1,18	0,34
			Klaida	36	89,59	2,49		
			Viso	49	604,61	12,34		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	270,32	67,58	4,06	0,008
			Poveikis	9	324,42	36,05	2,17	0,048
			Klaida	36	598,88	16,66		
			Viso	49	1193,62	24,36		

<sup>1</sup>Assay, <sup>2</sup>Treatment, <sup>3</sup>Biological Endpoint, <sup>4</sup>Source of Variation, <sup>5</sup>DF, <sup>6</sup>Sum of square (SS), <sup>7</sup>Mean square, <sup>8</sup>F statistics (df<sub>1</sub>, df<sub>2</sub>), <sup>9</sup>P-value, <sup>10</sup>Donors, <sup>11</sup>Exposure, <sup>12</sup>Error, <sup>13</sup>Total

**S10 lentelė. Tęsinys**

*Table S10. Continued*

Šarminis kometos testas	50 nm, 24 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	4	263,71	65,93	34,45	<0,0001
			Poveikis	9	19,73	2,19	1,15	0,36
			Klaida	36	68,89	1,91		
			Viso	49	352,33	7,19		
	Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	193,48	48,37	6,09	0,001	
		Poveikis	9	141,78	15,75	1,98	0,07	
		Klaida	36	286,12	7,95			
		Viso	49	621,38	12,68			
MB testas / MN assay	13 nm	MB % <sub>0</sub> / MN % <sub>0</sub>	Donorai	2	5,55	2,77	1,79	0,23
			Poveikis	4	21,70	5,42	3,50	0,06
			Klaida	8	12,39	1,55		
			Viso	14	39,63	2,83		
	BDI / CBPI	Donorai	2	0,11	0,06	4,26	0,06	
		Poveikis	4	0,08	0,02	1,44	0,31	
		Klaida	8	0,12	0,01			
		Viso	14	0,30	0,02			
	50 nm	MB % <sub>0</sub> / MN % <sub>0</sub>	Donorai	2	58,86	29,43	4,23	0,06
			Poveikis	4	41,19	10,30	1,48	0,30
			Klaida	8	55,68	6,96		
			Viso	14	155,69	11,12		
BDI / CBPI		Donorai	2	1,06	0,53	66,17	<0,0001	
		Poveikis	4	0,05	0,01	1,63	0,26	
		Klaida	8	0,06	0,01			
		Viso	14	1,17	0,08			

**S11 lentelė.** Ląstelių branduolio dalijimosi indeksas po poveikio 13 nm ir 50 nm dydžio Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ND ir apskaičiuotas ND citotoksiškumas. Tyrimai atlikti su 3 skirtingų donorų (D2, D7, D9) periferiniu krauju. Statistiškai reikšmingi pokyčiai, lyginant su neigiama kontrole (0 µg/mL), pažymėti \* (z-testas)

**Table S11.** Nuclear division index of PBMCs exposed to Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-NPs and their cytotoxicity. The study was conducted on PBMCs from 3 donors (D2, D7, D9). Statistically significant changes, compared to the negative control (0 µg/mL) are indicated by an asterisk (\*) (z-test)

Pirminis ND dydis (nm)	Koncentracija µg/mL	Branduolio Dalijimosi Indeksas (BDI) ± SEM / Nuclear division index (NDI)				Citotoksiškumas (%) / Cytotoxicity
		D2	D7	D9	Vidurkis / Mean value	
13	0	2,09 ± 0,04	2,05 ± 0,03	2,15 ± 0,03	2,10 ± 0,03	
	20	1,94 ± 0,03	1,88 ± 0,03	2,16 ± 0,03	1,99 ± 0,09	9,42
	40	1,97 ± 0,04	1,94 ± 0,03	2,09 ± 0,03	2,00 ± 0,05	8,81
	80	2,13 ± 0,03	1,75 ± 0,03*	2,16 ± 0,03	2,01 ± 0,13	7,60
	100	1,69 ± 0,03*	1,92 ± 0,04	2,01 ± 0,03	1,87 ± 0,1	20,36
50	0	1,40 ± 0,03	2,05 ± 0,03	2,15 ± 0,03	1,87 ± 0,23	
	20	1,38 ± 0,03	1,83 ± 0,03*	2,03 ± 0,04*	1,75 ± 0,19	14,13
	40	1,35 ± 0,03	1,95 ± 0,03	1,95 ± 0,04*	1,75 ± 0,2	13,60
	80	1,49 ± 0,03*	1,93 ± 0,03	1,99 ± 0,04*	1,80 ± 0,16	7,37
	100	1,60 ± 0,03*	1,87 ± 0,03	2,20 ± 0,03	1,89 ± 0,17	-2,38

**S12 lentelė.** Ląstelių gyvybingumas, po 1 ir 24 val. poveikio 10–20 nm dydžio SiO<sub>2</sub>-ND. Tyrimai atlikti su skirtingų donorų (D2, D3, D6, D7, D9) periferinio kraujo vienbranduolėmis ląstelėmis. Statistiškai reikšmingi pokyčiai, lyginant su neigiama kontrole (0 µg/mL), pažymėti \* (z-testas) arba \* (Studento t-testas)

**Table S12.** Percentage of viable cells following 1- and 24-hour exposure to 10-20 nm size SiO<sub>2</sub>-NPs. The study was conducted on PBMCs from 5 donors (D2, D3, D6, D7, D9). Statistically significant changes, compared to untreated control (0 µg/mL) are indicated by an asterisk (\*) (z-test) or (\*) (Student t-test)

Poveikis	Koncentracija µg/mL	%Gyvybingumas ± SEM / %Viability					Vidurkis / Mean value
		D2	D3	D6	D7	D9	
10-20 nm, 1 val.	0	100	98 ± 0,1	99 ± 0,1	98 ± 0,1	99 ± 0,1	98 ± 1,1
	10	98 ± 0,1	96 ± 0,2	97 ± 0,2	99 ± 0,1	97 ± 0,2	97,4 ± 0,5
	20	98 ± 0,1	93 ± 0,3	96 ± 0,2	97 ± 0,2	95 ± 0,2	95,8 ± 0,9
	40	97 ± 0,2	92 ± 0,3	96 ± 0,2	97 ± 0,2	96 ± 0,2	95,6 ± 0,9
	60	97 ± 0,2	92 ± 0,3	94 ± 0,2	94 ± 0,2	96 ± 0,2	94,6 ± 0,9*
	80	98 ± 0,1	91 ± 0,3*	95 ± 0,2	95 ± 0,2	95 ± 0,2	94,8 ± 2,5
	100	98 ± 0,1	92 ± 0,3	95 ± 0,2	94 ± 0,2	96 ± 0,2	95 ± 1,0
	150	95 ± 0,2*	94 ± 0,2	93 ± 0,3*	92 ± 0,3	95 ± 0,2	93,8 ± 0,6*
	200	98 ± 0,1	94 ± 0,2	93 ± 0,3*	90 ± 0,3*	93 ± 0,3*	93,6 ± 1,3*
	250	85 ± 0,4*	93 ± 0,3	91 ± 0,3*	89 ± 0,3*	85 ± 0,4*	88,6 ± 1,6*
	300	86 ± 0,4*	88 ± 0,3*	89 ± 0,3*	87 ± 0,3*	87 ± 0,3*	87,4 ± 0,5*
	350	86 ± 0,4*	89 ± 0,3*	88 ± 0,3*	88 ± 0,3*	86 ± 0,4*	87,4 ± 0,6*
	400	83 ± 0,4*	80 ± 0,4*	86 ± 0,4*	85 ± 0,4*	83 ± 0,4*	83,4 ± 1,0*
	450	79 ± 0,4*	85 ± 0,4*	85 ± 0,4*	84 ± 0,4*	84 ± 0,4*	83,4 ± 1,1*
500	80 ± 0,4*	83 ± 0,4*	81 ± 0,4*	81 ± 0,4*	79 ± 0,4*	80,8 ± 0,7*	
10-20 nm, 24 val.	0	95 ± 0,2	100	97 ± 0,2	98 ± 0,1	99 ± 0,1	97,8 ± 0,9
	10	96 ± 0,2	96 ± 0,2	98 ± 0,1	97 ± 0,2	98 ± 0,1	97 ± 0,5
	20	95 ± 0,2	96 ± 0,2	95 ± 0,2	95 ± 0,2	98 ± 0,1	95,8 ± 0,6
	40	94 ± 0,2	97 ± 0,2	93 ± 0,3	97 ± 0,2	96 ± 0,2	95,4 ± 0,8
	60	92 ± 0,3	95 ± 0,2*	91 ± 0,3	94 ± 0,2	92 ± 0,3*	92,8 ± 0,7*
	80	89 ± 0,3	91 ± 0,3	87 ± 0,3*	92 ± 0,3	92 ± 0,3*	90,2 ± 1,0*
	100	86 ± 0,4*	88 ± 0,3*	85 ± 0,4*	89 ± 0,3*	91 ± 0,3*	87,8 ± 1,1*
	150	75 ± 0,4*	86 ± 0,4*	75 ± 0,4*	87 ± 0,3*	87 ± 0,3*	82 ± 2,9*
	200	69 ± 0,5*	86 ± 0,4*	68 ± 0,5*	83 ± 0,4*	82 ± 0,4*	77,6 ± 3,8*
	250	63 ± 0,5*	83 ± 0,4*	66 ± 0,5*	81 ± 0,4*	80 ± 0,4*	74,6 ± 4,2*
	300	54 ± 0,5*	78 ± 0,4*	60 ± 0,5*	78 ± 0,4*	73 ± 0,4*	68,6 ± 4,9*

**S13 lentelė.** Dvifaktorinės ANOVA analizės duomenys, vertinant donorių ir poveikio įtaką SiO<sub>2</sub>-ND genotoksiškumui

**Table S13.** Two-way ANOVA analysis of donor variability and treatment effects on SiO<sub>2</sub>-NPs genotoxicity

Testas <sup>1</sup>	Poveikis <sup>2</sup>	Vertinamas rodiklis <sup>3</sup>	Kintamieji <sup>4</sup>	Laisvės laipsnis <sup>5</sup>	Kvadratų suma <sup>6</sup>	Kvadratų vidurkis <sup>7</sup>	F statistika (df <sub>1</sub> , df <sub>2</sub> ) <sup>8</sup>	P-reiškė <sup>9</sup>
Šarminis kometos testas / Alkaline Comet Assay	10-20 nm, 1 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai <sup>10</sup>	3	2,89	0,96	3,56	<b>0,02</b>
			Poveikis <sup>11</sup>	13	18,38	1,41	5,23	
			Klaida <sup>12</sup>	39	10,53	0,27		
			Viso <sup>13</sup>	55	31,79	0,58		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	15,05	3,76	0,78	0,54
			Poveikis	15	2296,35	153,09	31,66	<b>&lt;0,0001</b>
			Klaida	60	290,15	4,84		
			Viso	79	2601,55	32,93		
	10-20 nm, 24 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	3	286,27	95,42	10,01	<b>0,0001</b>
			Poveikis	9	2525,37	280,60	29,43	<b>&lt;0,0001</b>
			Klaida	27	257,43	9,54		
			Viso	39	3069,06	78,69		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	670,77	167,69	10,35	<b>&lt;0,0001</b>
			Poveikis	11	5407,25	491,57	30,34	<b>&lt;0,0001</b>
			Klaida	44	712,83	16,20		
			Viso	59	6790,85	115,10		
MB testas / MN Assay	10-20 nm	MB % / MN %	Donorai	2	21,04	10,52	4,23	0,06
			Poveikis	4	30,22	7,56	3,04	0,09
			Klaida	8	19,89	2,49		
			Viso	14	71,15	5,08		
	BDI / CBPI	Donorai	2	0,55	0,27	26,76	<b>0,0003</b>	
		Poveikis	4	0,06	0,01	1,35	0,33	
		Klaida	8	0,08	0,01			
		Viso	14	0,69	0,05			

<sup>1</sup>Assay, <sup>2</sup>Treatment, <sup>3</sup>Biological Endpoint, <sup>4</sup>Source of Variation, <sup>5</sup>DF, <sup>6</sup>Sum of square (SS), <sup>7</sup>Mean square, <sup>8</sup>F statistics (df<sub>1</sub>, df<sub>2</sub>), <sup>9</sup>P-value, <sup>10</sup>Donors, <sup>11</sup>Exposure, <sup>12</sup>Error, <sup>13</sup>Total

**S14 lentelė.** Ląstelių branduolio dalijimosi indeksas po poveikio 10-20 nm dydžio SiO<sub>2</sub>-ND ir apskaičiuotas ND citotoksiškumas. Tyrimai atlikti su 3 skirtingų donorų (D2, D6, D7) periferiniu krauju. Statistiškai reikšmingi pokyčiai, lyginant su neigiama kontrole (0 µg/mL), pažymėti \* (z-testas)

**Table S14.** Nuclear division index of PBMCs exposed to SiO<sub>2</sub>-NPs and their cytotoxicity. The study was conducted on PBMCs from 3 donors (D2, D6, D7). Statistically significant changes, compared to negative control (0 µg/mL) are indicated by an asterisk (\*) (z-test)

Pirminis ND dydis (nm)	Koncentracija µg/mL	Branduolio Dalijimosi Indeksas (BDI) ± SEM / Nuclear division index (NDI)				Citotoksiškumas (%) / Cytotoxicity
		D2	D6	D7	Vidurkis / Mean value	
10-20	0	1,90 ± 0,04	1,56 ± 0,03	1,70 ± 0,03	1,72 ± 0,10	
	50	1,86 ± 0,04	1,46 ± 0,03*	1,67 ± 0,03	1,66 ± 0,12	7,87
	100	1,96 ± 0,04	1,57 ± 0,03	1,82 ± 0,03*	1,78 ± 0,11	-8,80
	150	1,89 ± 0,04	1,3 ± 0,03*	1,64 ± 0,03	1,61 ± 0,17	15,28
	200	1,82 ± 0,04	1,25 ± 0,02*	1,87 ± 0,04*	1,65 ± 0,20	10,19

**S15 lentelė.** Ląstelių gyvybingumas, po 3 ir 24 val. poveikio PS-ND. Tyrimai atlikti su skirtingų donorų (D2, D6, D7, D8, D9) periferinio kraujo vienbranduolėmis ląstelėmis. Statistiškai reikšmingi pokyčiai, lyginant su neigiama kontrole (0 µg/mL), pažymėti \* (z-testas) arba \* (Studento t-testas)

**Table S15.** Percentage of viable cells following 3- and 24-hour exposure to PS-NPs. The study was conducted on PBMCs from 5 donors (D2, D6, D8, D9). Statistically significant changes, compared to untreated control (0 µg/mL) are indicated by an asterisk (\*) (z-test) or (\*) (Student t-test)

Poveikis	Koncentracija µg/mL	%Gyvybingumas ± SEM / %Viability					Vidurkis / Mean value
		D2	D6	D7	D8	D9	
80 nm, 3 val.	0	95 ± 0,22	99 ± 0,1	98 ± 0,14	92 ± 0,27	96 ± 0,2	96 ± 1,2
	10	94 ± 0,24	96 ± 0,2	95 ± 0,22	92 ± 0,27	96 ± 0,2	94,6 ± 0,8
	15	93 ± 0,26	96 ± 0,2	97 ± 0,17	91 ± 0,29	93 ± 0,26	94 ± 1,1
	20	97 ± 0,17	97 ± 0,17	93 ± 0,26	91 ± 0,29	96 ± 0,2	94,8 ± 1,2
	30	95 ± 0,22	98 ± 0,14	96 ± 0,2	93 ± 0,26	95 ± 0,22	95,4 ± 0,8
	40	97 ± 0,17	97 ± 0,17	96 ± 0,2	92 ± 0,27	96 ± 0,2	95,6 ± 0,9
	50	94 ± 0,24	98 ± 0,14	96 ± 0,2	96 ± 0,2	97 ± 0,17	96,2 ± 0,7
	60	91 ± 0,29	98 ± 0,14	99 ± 0,1	94 ± 0,24	97 ± 0,17	95,8 ± 1,5
	75	95 ± 0,22	98 ± 0,14	99 ± 0,1	92 ± 0,27	91 ± 0,29	95 ± 1,6
	85	98 ± 0,14	99 ± 0,1	95 ± 0,22	96 ± 0,2	95 ± 0,22	96,6 ± 0,8
100	94 ± 0,24	98 ± 0,14	94 ± 0,24	90 ± 0,3	90 ± 0,3	93,2 ± 1,5	
80 nm, 24 val.	0	95 ± 0,22	98 ± 0,14	99 ± 0,1	95 ± 0,22	95 ± 0,22	96,4 ± 0,9
	10	95 ± 0,22	98 ± 0,14	95 ± 0,22	96 ± 0,2	95 ± 0,22	95,8 ± 0,6
	15	94 ± 0,24	97 ± 0,17	96 ± 0,2	97 ± 0,17	94 ± 0,24	95,6 ± 0,7
	20	95 ± 0,22	98 ± 0,14	98 ± 0,14	96 ± 0,2	95 ± 0,22	96,4 ± 0,7
	30	95 ± 0,22	99 ± 0,1	91 ± 0,29	97 ± 0,17	93 ± 0,26	95 ± 1,4
	40	97 ± 0,17	99 ± 0,1	98 ± 0,14	98 ± 0,14	97 ± 0,17	97,8 ± 0,4
	50	94 ± 0,24	99 ± 0,1	97 ± 0,17	94 ± 0,24	94 ± 0,24	95,6 ± 1,0
	60	93 ± 0,26	94 ± 0,24	94 ± 0,24	92 ± 0,27	91 ± 0,29	92,8 ± 0,6*
	75	95 ± 0,22	98 ± 0,14	93 ± 0,26	92 ± 0,27	91 ± 0,29	93,8 ± 1,2
	85	91 ± 0,29	94 ± 0,24	97 ± 0,17	91 ± 0,29	91 ± 0,29	92,8 ± 1,2*
100	98 ± 0,14	97 ± 0,17	96 ± 0,2	89 ± 0,31	96 ± 0,2	95,2 ± 1,6	



**S16 lentelė.** Dvifaktorinės ANOVA analizės duomenys, vertinant donorų ir poveikio įtaką PS-ND genotoksiškumui

**Table S16.** Two-way ANOVA analysis of donor variability and treatment effects on PS-NPs genotoxicity

Testas <sup>1</sup>	Poveikis <sup>2</sup>	Vertinamas rodiklis <sup>3</sup>	Kintamieji <sup>4</sup>	Laisvės laipsnis <sup>5</sup>	Kvadratų suma <sup>6</sup>	Kvadratų vidurkis <sup>7</sup>	F statistika (df <sub>1</sub> , df <sub>2</sub> ) <sup>8</sup>	P-reikšmė <sup>9</sup>
Šarminis kometos testas / Alkaline Comet Assay	70 nm, 3 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai <sup>10</sup>	4	205,47	51,37	44,77	<b>&lt;0,0001</b>
			Poveikis <sup>11</sup>	10	100,02	10	8,72	
			Klaida <sup>12</sup>	40	45,89	1,15		
			Viso <sup>13</sup>	54	351,38	6,51		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	152,26	38,06	11,56	<b>&lt;0,0001</b>
			Poveikis	10	50,8	5,08	1,54	
			Klaida	40	131,75	3,29		
			Viso	54	334,8	6,2		
	70 nm, 24 val.	DNR kiekis kometos uodegoje, % / %TDNA	Donorai	4	358,12	89,53	10,23	<b>&lt;0,0001</b>
			Poveikis	10	490,41	49,04	5,61	
			Klaida	40	349,96	8,75		
			Viso	54	1198,49	22,19		
		Gyvybingumas % / Viability, %	Donorai	4	88,62	22,16	6,66	<b>0,0003</b>
			Poveikis	10	119,2	11,92	3,59	
			Klaida	40	132,98	3,33		
			Viso	54	340,8	6,31		
MB testas / MN Assay	70 nm	MB % / MN %	Donorai	2	7,86	3,93	1,75	<b>0,21</b>
			Poveikis	6	85,87	14,31	6,39	
			Klaida	12	26,9	2,24		
			Viso	20	120,63	6,03		
	BDI / CBPI	Donorai	2	0,24	0,12	16,74	<b>0,0003</b>	
		Poveikis	6	0,16	0,03	3,69		
		Klaida	12	0,09	0,01			
		Viso	20	0,48	0,02			

<sup>1</sup>Assay, <sup>2</sup>Treatment, <sup>3</sup>Biological Endpoint, <sup>4</sup>Source of Variation, <sup>5</sup>DF, <sup>6</sup>Sum of square (SS), <sup>7</sup>Mean square, <sup>8</sup>F statistics (df<sub>1</sub>, df<sub>2</sub>), <sup>9</sup>P-value, <sup>10</sup>Donors, <sup>11</sup>Exposure, <sup>12</sup>Error, <sup>13</sup>Total

**S17 lentelė.** Ląstelių branduolio dalijimosi indeksas po poveikio PS-ND ir apskaičiuotas ND citotoksiškumas. Tyrimai atlikti su 3 skirtingų donorų (D2, D7, D8) periferiniu krauju. Statistiškai reikšmingi pokyčiai, lyginant su neigiama kontrole (0 µg/mL), pažymėti \* (z-testas)

**Table S17.** Nuclear division index of PBMCs exposed to PS-NPs and their cytotoxicity. The study was conducted on PBMCs from 3 donors (D2, D7, D8). Statistically significant changes, compared to negative control (0 µg/mL) are indicated by an asterisk (\*) (z-test)

Pirminis ND dydis (nm)	Koncentracija µg/mL	Branduolio Dalijimosi Indeksas (BDI) ± SEM / Nuclear division index (NDI)				Citotoksiškumas (%) / Cytotoxicity
		D2	D7	D8	Vidurkis / Mean value	
70-80	0	1,96 ± 0,03	1,99 ± 0,04	2,32 ± 0,02	2,09 ± 0,11	
	25	1,79 ± 0,04	2,07 ± 0,03*	2,22 ± 0,03*	2,03 ± 0,13	5,70
	50	1,77 ± 0,04	1,92 ± 0,03	1,92 ± 0,04*	1,87 ± 0,05	20,47
	75	1,81 ± 0,04	1,86 ± 0,04*	1,91 ± 0,05*	1,86 ± 0,03	20,93
	100	1,78 ± 0,03	1,88 ± 0,03*	1,97 ± 0,04*	1,87 ± 0,06	19,66
	125	1,82 ± 0,04	1,78 ± 0,03*	2,11 ± 0,04*	1,9 ± 0,10	16,91
	150	1,76 ± 0,04	1,78 ± 0,03*	2,03 ± 0,04*	1,86 ± 0,09	21,24

**S18 lentelė.** Nanodalelių genotoksiškumo rezultatų apžvalga. + žymi teigiamus, o – neigiamus rezultatus

**Table S18.** Overview of nanoparticle genotoxicity results. + indicates positive, and – indicates negative results

Testas / Assay	Nanodalelės / Nanoparticles	Statistiškai reikšmingas pažeidų padidėjimas (bent 4 koncentracijos) / Significant increase of DNA damage	Dozinė priklausomybė / Dose-response relationship	Reikšminga koreliacija su citotoksiškumu / Correlation with cytotoxicity	Dvifaktorinė ANOVA / Two-way ANOVA	
					Donorai / Donors	Dozės / Doses
Šarminis kometos testas (1 arba 3 val.)	10–30 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	+	+	-	+	+
	<50 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	+	+	-	+	+
	35 nm PVP-Ag	+	-	-	+	-
	10-20 nm SiO <sub>2</sub>	+	+	+	+	+
	13 nm Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	+	-	-	+	-
	50 nm Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	+	+	-	+	-
	5 nm Au	+	+	-	+	+
	40 nm Au	+	+	-	+	+
Šarminis kometos testas (24 val.)	10–30 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	+	+	-	+	+
	<50 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	+	+	+	-	+
	35 nm PVP-Ag	+	+	+	+	+
	10-20 nm SiO <sub>2</sub>	+	+	+	+	+
	13 nm Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	+	-	+	+	-
	50 nm Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	+	-	-	+	-
	5 nm Au	+	+	-	+	+
	40 nm Au	+	+	-	+	-
SCM testas	10–30 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	+	+	+	+	-
	<50 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	+	+	-	+	-
MB testas	10–30 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	+	-	+	+	+
	<50 nm Co <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	+	+	+	+	+
	35 nm PVP-Ag	-	-	-	+	-
	10-20 nm SiO <sub>2</sub>	-	+	-	-	-
	13 nm Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	+	+	-	-
	50 nm Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	-	-	+	-	-
	80 nm PS	-	-	-	-	+

Vilniaus universiteto leidykla  
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius  
El. p. [info@leidykla.vu.lt](mailto:info@leidykla.vu.lt), [www.leidykla.vu.lt](http://www.leidykla.vu.lt)  
[bookshop.vu.lt](http://bookshop.vu.lt), [journals.vu.lt](http://journals.vu.lt)  
Tiražas 15 egz.