

Lietuvos sveikatos mokslų universiteto gimnazija

**Kauno tvirtovės VII fortas
Biochemijos edukacinė laboratorija**

**Spausdintuvo dažų toksinio poveikio tyrimas
modelinėse sistemose *in vitro***

Darbą atliko: Gustė Zakšauskaitė (IVg. kl.)

Darbo vadovė: Lina Trečiokaitė

Konsultantas: Emilija Radlinskaitė

Kaunas, 2019

Turinys

Įvadas	3
Darbo tikslas ir uždaviniai	4
Literatūros apžvalga	4
1.1 Spausdinimo aparatų dažų milteliai	4
1.2 Nanodalelių (silicio dioksido) poveikis ląstelėms	5
1.3 Ląstelių kultūros CHO, A549	6
Eksperimentinė dalis, darbo eiga ir metodai	7
2.1 Pirmas etapas	7
2.1.1 Ląstelių auginimas in vitro	7
2.1.2 Ląstelių persodinimas ir kultyvavimas	8
2.1.3 Ląstelių skaičiavimas su hemocitometru	8
2.2 Antras etapas.....	9
2.2.1 Terpės su spausdinimo dažais paruošimas	9
2.2.2 CHO-K1 ląstelių morfologinių pokyčių stebėjimas į terpę integruojant spausdinimo aparatų dažus ir silicio dioksido nanodaleles	10
2.3 Trečias etapas.....	11
2.3.1 Gyvybingumo tyrimas	11
Rezultatai	13
Išvados	14
Rekomendacijos	14
Literatūros sąrašas	15
Informacija apie instituciją ir asmenis, padėjusius atlikti tyrimą	18

Ivadas

Šiuolaikiniuose biuruose ypač paplitę spalviniai lazeriniai kopijavimo ir spausdinimo aparatai dirba elektrografiniu principu bei dažniausiai naudoja keturių spalvų miltelines dažančias medžiagas, dar vadinamas dažomaisiais milteliais (angl. toner)(V. Dagienė, G. Grigas, T. Jevsikova, 2016). Dažniausiai spausdinimo įrengimai stovi bendrojo naudojimo patalpose ir yra prieinami visam įstaigos personalui, dėl ko dalis dažų sudėtyje esančių dalelių patenka į aplinką bei į žmonių plaučius. Aparatų naudotojai tiesiogiai su šiais dažais kontaktuoja kuomet yra keičiamos spausdinimo aparato dažų kasetės. Aparatui spausdinant, tonerio dalelės nedidele apimtimi taip pat patenka į aplinką (Information about nanomaterials and their safety assessment, 2014). Siekiant aukštos spausdinimo kokybės, aparatų gamintojai naudoja dažus, kurių sudėtyje yra cheminių junginių mikro ir nanodaleles (Jurgis Kadziauskis, 2012).

XXI amžiuje buvo atrastas bei pradėtas plačiai taikyti būdas sumažinti spausdintuvo dažų prikibimą prie ryškinimo mazgo pernešimo veleno, papildant dažo sudėtį silicio oksido nanodalelėmis. Ši naujovė leido padidinti aparatų mazgų resursus, tačiau atsirado rizika, kad minėtoms nanodalelėms patekus į aplinką, jos galės nesunkiai pereiti per žmogaus odos ar plaučių ląstelių membranas. Spausdinimo įrengimų dažų gamintojai, atlikdami įstatymų reglamentuotus produkto toksinio poveikio tyrimus, vykdo įvairius testus, tačiau nepateikia duomenų apie dažų poveikio testavimą modelinėse eukariotinių ląstelių sistemose bei neakcentuoja būtinybės papildomai tirti silicio dioksido nanodalelių, esančių šių dažų sudėtyje, poveikį.

Problema. Spausdinimo aparatų dažų sudėtyje yra cheminių medžiagų, kurios aparatui veikiant patenka į aplinką, žmogaus plaučius ir gali turėti neigiamos įtakos sveikatai.

Iškeliami **hipotezė**, kad spausdinimo dažų sudėtyje esančios mikro ir nanodalelės gali turėti toksinį poveikį gyvoms ląstelėms. Tyrimo metu in vitro sąlygomis auginamos modelinės ląstelių kultūros bei tam tikrame etape į mitybinę terpę patalpinami pasirinkto gamintojo spalvinio kopijavimo aparato miltelių pavyzdžiai. Papildomai atliekamas tyrimas su modernių spausdintuvų dažų sudėtyje esančiomis silicio oksido nanodalelėmis. Mikro ir nanodalelių poveikis kultūrai stebimas vizualiai, panaudojant mikroskopijos metodus bei atliekant gyvybingumo (MTT) matavimus spektrofotometrijos metodu. Surinkti duomenys analizuojami bei daromos išvados.

Darbe naudotos metodikos gali būti naudingos Lietuvos rinkoje esančių spausdintuvų dažų toksinio poveikio nustatymui, tai gali būti ypač aktualu renkantis spausdintuvus mokykloms, biurams, ligoninėms ar naudojimui namuose.

Darbo tikslas ir uždaviniai

Darbo tikslas:

1. Nustatyti šiuolaikinio spausdintuvo dažų poveikį ląstelių kultūrai *in vitro* sąlygomis.

Darbo uždaviniai:

1. Laboratorijos sąlygomis sukurti modelinę tyrimų sistemą - pastoviąją eukariotinių ląstelių liniją;
2. Ištirti ląstelių jautrumą keturių skirtingų spalvų tonerių dalelėms;
3. Ištirti ląstelių jautrumą silicio dioksido nanodalelėms.

Literatūros apžvalga

1.1 Spausdinimo aparatų dažų milteliai

Spausdinimo ir kopijavimo aparatų dažų galimas poveikis žmogaus organizmui yra nagrinėjamas daug metų (Ru Bai, Lili Zhang, 2010), tačiau šioje technikos rinkoje veikia daug stambių gamintojų, kurie konkuruodami tarpusavyje kasmet į rinką išleidžia ar atnaujina platų aparatūros asortimentą (Best Sellers in Laser Computer Printers, 2018). Dėl to egzistuoja daug skirtingų dažų rūšių, kurių cheminė sudėtis dažnai kinta (Neha Verma, 2018). Tiksliai jų cheminė sudėtis dažniausiai nebūna skelbiama, nes tai yra gamintojo komercinė paslaptis, tačiau pavojingos cheminės medžiagos yra nurodomos saugos duomenų lape (SDL), kuris yra privalomas visoms Europos Sąjungos rinkose parduodamoms cheminėms medžiagoms (Regulation No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council, 2008). Pavyzdžiui šių dažų sudedamoji dalis (Canon firmos) SDL- titano dioksidas- Tarptautinės vėžio tyrimų agentūros buvo įvertintas kaip 2B grupės kancerogenas, tačiau nepakanka įrodymų apie jo poveikį žmonėms (Canon C-EXV 29 Cyan Toner safety data sheet, 2015). Poveikį gyvūnams bandyta pagrįsti tyrimu, kuomet žiurkėms buvo duota kvėpuoti oru, prisotintu titano dioksido miltelių, kurie nusėdo jų plaučiuose, o to pasekmė- ėmę vystytis navikai (Canon C-EXV 29 Magenta Toner safety data sheet, 2015). Nors rašoma medianinė mirtinoji dozė laboratorinėms žiurkėms yra LD50 > 2000 mg/kg (nuo kurios miršta 50% populiacijos narių), tačiau injekcinis titano

dioksido turinčių dažomųjų miltelių tyrimas parodė, kad žiurkių organizme nėra ryšio tarp dažų poveikio ir naviko vystymosi (Canon C-EXV 29 Black Toner safety data sheet, 2015).

1.2 Nanodalelių (silicio dioksido) poveikis ląstelėms

Siekiant sumažinti spausdinimo dažų atgeziją ryškinimo mazgo pernešimo velenui sugalvota jų sudėtį papildyti silicio dioksido (SiO_2) nanodalelėmis (A.V. Vannikov, A.V. Churkin, M.A. Solovieva, 2013). Tai padidino aparatų mazgų resursus, tačiau neišvengiamai šios dalelės patenka į aplinką spausdinimo metu (Demokritou, Philip, 2017) ir gali pakenkti žmogui. Atlikti tyrimai su žiurkėmis parodė, jog jų plaučių ląstelės nuo didelių šių miltelių kiekių yra pažeidžiamos ir gali žiurkėms sukelti net plaučių uždegimą (Canon C-EXV 29 Black Toner safety data sheet, 2015). Tačiau tyrimu naudoti labai dideli miltelinių dažų kiekiai smarkiai prasilenkia su realiai į organizmą patenkančiais kiekiais spausdintuvų eksploatacijos metu. Taip pat pastebėta, kad žmogus į spausdinimo miltelius tiesioginio santykio metu reaguoja itin jautriai: oda parausta, tačiau jokie sveikatos sutrikimai dar nėra tiksliai nustatyti (Sivakumar Murugadoss, Dominique Lison ir kiti, 2017). Todėl Harvardo visuomenės sveikatos nanotechnologijų ir nanotoksiškumo centre atliktas tyrimas, dėl spausdinimo metu į aplinką išskiriamų nanodalelių, leido teigti, jog spausdintuvų dažai ir SiO_2 nanodalelės potencialiai gali būti kvėpavimo takų, širdies bei kraujagyslių pažeidimų priežastimi, nes nustatytos šių dalelių koncentracijos yra ypatingai didelės (Lidia Zapór, 2016).

Silicio dioksido jonų poveikis vienaląsčiams nagrinėjamas Emilijos Radlinskaitės darbe „Silicio jonų koncentracijos vandenyje poveikis melsvabakterėms“ (Emilija Radlinskaitė, 2018). Buvo nustatyta, kad skirtingos jonų koncentracijos turi įtakos melsvabakterių augimui. Tai reiškia, kad ši medžiaga gali turėti įtakos ir kitiems gyviems organizmams, pvz. žmogaus plaučių ląstelėms. Spausdintuvuose esančių dažų sudėtyje yra nuo 1 iki 3% **silicio dioksido nanodalelių** (Canon C-EXV 29 Yellow Toner safety data sheet, 2015). Šis kiekis yra sąlyginai mažas, tačiau būtina atsižvelgti į nanodalelių dydį, kuris yra 15nm [MK Impex corp. SiO_2 -amorphous, Canada]. Toks mažas dalelių dydis leidžia nanodalelėms lengvai pereiti ląstelės membraną. Atsižvelgiant į tai, jog tyrimai su titano oksido nanodalelėmis įrodė neigiamą poveikį gyviems organizmams, reikalinga ištirti ir silicio dioksido nanodalelių, esančių spausdinimo aparatų dažuose, poveikį.

1.3 Ląstelių kultūros CHO, A549

In Vitro (*lot.*) bandymas, kuris yra atliekamas dirbtinėje sistemoje, pavyzdžiui mėgintuvėlyje arba flakone) tyrimams pasirinktos šios modelinės ląstelių sistemos:

CHO-K1 - Kinijos žiurkėno kiaušidžių (*angl.*, Chinese hamster ovary cells - CHO) ląstelės, jos sugeba produkuoti glikozilintus baltymus, kurie yra identiški žmonių baltymams. CHO ląstelės galima dauginti ilgai, auga imobilizuotos ant flakono paviršiaus, todėl negali išbėgti kartu su terpės nupilant, bei geba grietai daugintis. Taip pat CHO ląstelės nėra tokios paveikios virusinėms infekcijoms palyginus su kitomis gyvūlinėmis ląstelėmis (pvz. BHK linija) (Berting A, Farcet MR, Kreil TR, 2010). Ši ląstelių linija inkubuojama 37°C temperatūroje, drėgnoje ir 5 % CO₂ aplinkoje.

A549 – žmogaus plaučių alveolių epitelio ląstelės (*angl.*, adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells), augančios RPMI- 1640 terpėje, inkubuojamos 37°C temperatūroje, drėgnoje ir 5 % CO₂ prisotintoje aplinkoje. Šių ląstelių, priešingai nei CHO, persodinimų skaičius yra ribotas (Cell line profile A549, 2012) .

Eksperimentinė dalis, darbo eiga ir metodai

Eksperimentinė dalis suskirstyta į tris etapus:

Pirmame etape persodinamos ir kultivuojamos ląstelės, nustatoma jų koncentracija, vyksta pasiruošimas tyrimui.

Antrame etape tiriamas ląstelių jautrumas keturių skirtingų spalvų spausdinimo dažams ir silicio dioksido nanodalelėms bei stebimi vizualiniai pokyčiai.

Trečiame etape vykdomas MTT – gyvybingumo testas.

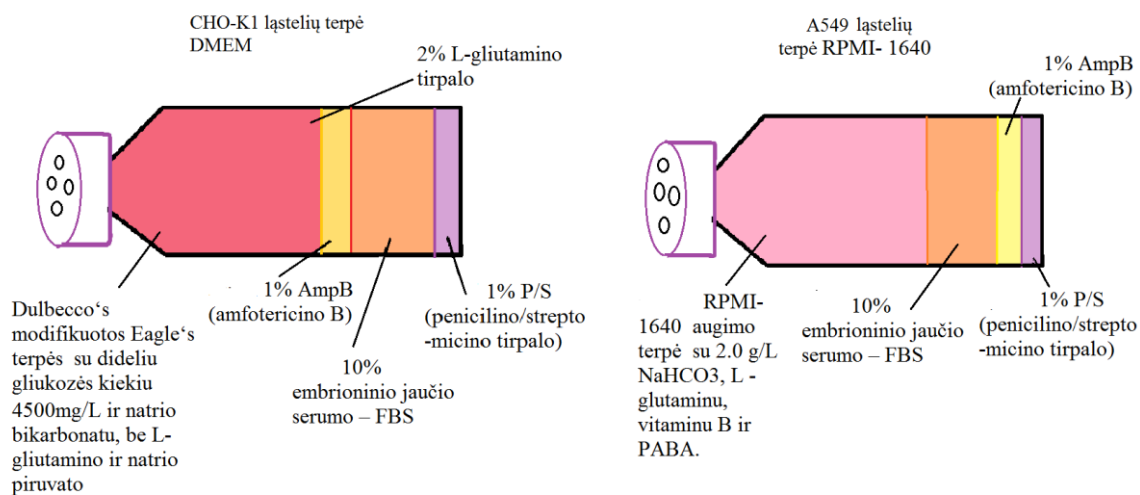
Eksperimentinė dalis išskirta į tris dalis, kad:

- būtų aiškiai matomas ląstelių paruošimas tyrimams: išmokstama jas auginti, persodinti bei sureguliuoti tinkamas inkubatoriaus sąlygas
- būtų vizualiai įrodytas spausdinimo dažų ir silicio dioksido skverbimas į ląsteles
- būtų įrodytas šių medžiagų poveikis ląstelių gyvybingumui

2.1 Pirmas etapas

2.1.1 Ląstelių auginimas In Vitro

CHO-K1 ir A549 linijų ląstelės augintos steriliuose 25ml talpos flakonėluose (Thermo Fisher Scientific, T25) su 5ml auginimo terpe. Flakonėluose esančios ląstelės auginamos inkubatoriuje (Heraeus Hera cell 150), kuriame palaikoma 37°C temperatūra, 90 % drėgmė ir 5% CO₂. Flakonėlio dangtelyje integruotos skylutės, kad į auginimo terpę laisvai patektų deguonis ir CO₂, kuris palaiko terpės pH pusiausvyrą (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 2011).



1 pav. DMEM ir RPMI-1640 terpių sudėtis

Terpėse DMEM ir RPMI-1640 yra visos medžiagos reikalingos ląstelių kultūros augimui: amino rūgštys, druskos, vitaminai ir energijos šaltinis- gliukozė bei auginimo faktorius (FBS). Siekiant išvengti infekcijos ląstelių kultūrose, darbo metu buvo naudojami tik sterilūs antgaliai, pipetės, auginimo flakonėliai, mėgintuvėliai ir indai bei dirbama steriliomis sąlygomis 2 klasės vertikalios srauto laminare (Heraeus HS12).

Prieš ląstelių persodinimą įvertinamas ląstelių monosluoksnis ir terpės spalva. Ląstelių kultūros auginimo metu pastebimas terpės spalvos pokytis iš rausvai rožinės spalvos (tinkamos augti ląstelėms) į gelsvą (nebetinkamos augti ląstelėms). Šį pokytį lemia terpėje esantis indikatorius fenolio raudonasis, kuris parodo terpės rūgštėjimą. Mikroskopu patikrinama ar ląstelėms užtenka vietos augti.

2.1.2 Ląstelių persodinimas ir kultyvavimas

Iš T25 flakonėlio CHO- K1 ląstelių auginimo terpė DMEM nupilama. Ląstelių sluoksnis praplaunamas 1ml PBS (fosfatinio buferinio tirpalo) ir šis išpilamas. Tuomet į tą patį flakonėlį įpilama 0,5 ml tripsino/EDTA tirpalo ir šis paliekamas inkubatoriuje 5- 10 min tam, kad nuo flakonėlio dugno atsiskirtų ląstelių monosluoksnis. Išėmus flakonėlį iš inkubatoriaus šis gerai pakratomas, kad ląstelės pilnai atsoktų nuo dugno, tai įsitikinama mikroskopu. Po to į flakonėlį su ląstelėmis įpilama 2ml DMEM augimo terpės. Paruošimas naujas sterilus 25ml flakonėlis, į kurį įpilama 5ml DMEM terpės ir du lašai ląstelių suspensijos. Naujas flakonėlis patalpinamas inkubatoriuje. Ląstelės persėjamos kas 5-6 dienas, priklausomai nuo terpės spalvos pokyčio ir ląstelių priaugimo.

Iš flakonėlio A549 ląstelių auginimo terpė nupilama. Ląstelių sluoksnis praplaunamas 1ml PBS (fosfatinio buferinio tirpalo) ir šis išpilamas. Tuomet į tą patį flakonėlį įpilama 0,5 ml tripsino/EDTA tirpalo ir šis paliekamas inkubatoriuje 5- 10 min. Ląstelių kultūra papildoma 2ml terpe RPMI-1640 ir nucentrifiguojama 2 ml steriliuose centrifuginiuose mėgintuvėliuose, nupilama ir užpilama praplovimui 1ml PBS, nucentrifiguojama ir nupilama. Po to į mėgintuvėlį su ląstelėmis įpilama 1 ml RPMI- 1640 augimo terpės ir ląstelės suspenduojamos į mėgintuvėlio sienelę. Paruošiamas naujas sterilus 25ml flakonėlis, į kurį įpilama 5 ml RPMI- 1640 terpės ir du lašai suspenduotų ląstelių suspensijos. Naujas flakonėlis patalpinamas inkubatoriuje. Ląstelės persėjamos kas 20 dienų.

2.1.3 Ląstelių skaičiavimas su hemocitometru

Jautrumo tyrimams naudojamos ląstelės, kai jų koncentracija yra 2–4 mln./ml. Siekiant įvertinti ląstelių koncentraciją prieš tyrimą bei įsitikinti ląstelių gyvybingumu atliekamas ląstelių skaičiavimas citometrijos metodu. Naudojamas Tripano mėlio tirpalas, kuris skverbiasi į negyvų ląstelių membranas jas dažydamas mėlyna spalva, tačiau dažas nėra absorbuojamas gyvų ląstelių. Todėl stebint mikroskopu, negyvos ląstelės atrodo tamsiai mėlynos.

Tirpalo paruošimui į 1,5 ml mėgintuvėlį pilama 4 mg Tripano mėlio miltelių, ant jų užpilama 1ml 1x PBS tirpalo ir gerai sumaišoma vorteksu. (darbas atliekamas laminare). Nupylus augimo terpę, ląstelių monosluoksnis užpilamas 1 ml PBS (1x) tirpalo. Praskalaujama ir iškart nupilama, kad būtų

nuplauta sena terpė ir žuvusios ląstelės. Ant ląstelių monosluoksnio pilama 2ml tripsino/EDTA tirpalo. Tripsinuojama 2-5min., kol ląstelės pilnai atsiskiria nuo flakonėlio sienelės ir ima plaukioti tirpale. Po to ląstelių suspensija papildoma 2ml augimo terpės tam, kad būtų sustabdytas tripsino poveikis. Ląstelės perpilamos į 15ml talpos mėgintuvėlį ir centrifuguojama ~ 5min. 1000aps./min. greičiu. Supernantantas nupilamas, o nusėdusios ląstelės praskiedžiamos 1 ml augimo terpės. Viskas gerai supipetuojama. Į 1,5ml mėgintuvėlį dedama 10μl terpės su ląstelėmis bei 90μl tripano mėlio ir gerai sumaišoma. Ant hemocitometro papučiamą drėgnu oru ir atsargiai prispaudžiamas dengiamasis stiklis, kol prilimpa prie hemocitometro kameros. Hemocitometro kamera užpildoma paruošta ląstelių ir tripano mėlio suspensija nuo kameros viršaus, atsargiai prilietus dengiamąjį stiklį, kad jis neatšoktų. Naudojant mikroskopą (Bresser Science Infinity), suskaičiuojamos gyvos ląstelės. Ląstelės skaičiuojamos dideliuose kampiniuose abiejų kamerų kvadratuose. Apskaičiuojama ląstelių koncentracija 1 ml suspensijos. Ląstelių koncentracija mililitre apskaičiuojama pagal formulę:

$$Ląstelių\ skaičius\ viduriniame\ ir\ kampiniuose\ kvadratuose \times \frac{Skiedimo\ koeficientas}{5\ (kvadratų\ skaičius)} \\ \times 10\ 000 \frac{ląstelių}{ml} = Ląstelių\ koncentracija\ mililitre$$

2.2 Antras etapas

2.2.1 Terpės su spausdinimo dažais paruošimas

Atsveriami po 0,005g keturių spalvų dažomųjų miltelių : juodos (Canon C-EXV 29 Black Toner), mėlynos (Canon C-EXV 29 Cyan Toner), raudonos (Canon C-EXV 29 Magenta Toner) ir geltonos (Canon C-EXV 29 Yellow Toner) spalvų, bei silicio dioksido nanodalelių (MK Impex corp. SiO₂-amorphous, Canada) ir suberiama į 5 Eppendorf mėgintuvėlius (3469NK Thermo Fisher Scientific), į kuriuos įpilama po 1ml DMEM terpės, šie supurtomi purtyklėje (VWR VV3), kol viskas tolygiai pasiskirsto po terpę. Tuomet paruošiama 15 sterilių mėgintuvėlių, į kuriuos pilama po 4 ml DMEM terpės. Paruošiamos trys skirtingos (50μg; 100μg; 200μg) kiekvienos spalvos dažų koncentracijos augimo terpėje, imant skirtingus suspensijų kiekius iš Eppendorf mėgintuvėlių ir supilant juos į paruoštus mėgintuvėlius su DMEM terpe, pagal lentelę, remiantis leistinėmis normomis:

1 lentelė. Dažų suspensijų kiekiai skirtingų koncentracijų paruošimui terpėje

Koncentracija	Suspensijos kiekis, į 4ml terpės
50 µg/ml	40 µl
100 µg/ml	80 µl
200 µg/ml	160 µl

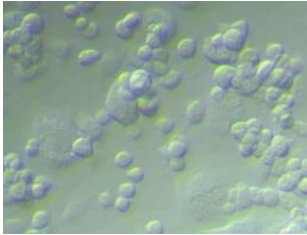
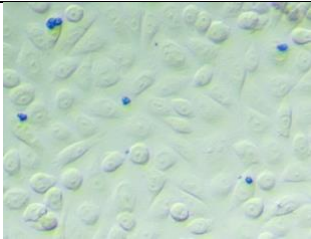
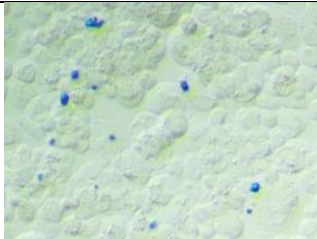
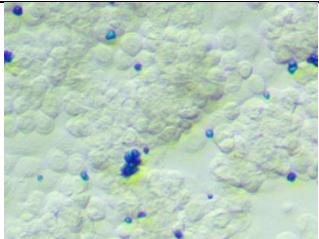
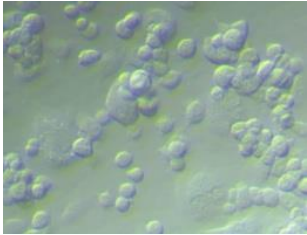



2.2.2 CHO- K1 ląstelių morfologinių pokyčių stebėjimas į terpę integruojant spausdinimo aparatų dažus (geltonos, mėlynos, juodos ir raudonos spalvų) ir silicio dioksido nanodaleles

Ląstelės persodinamos į 16 petri lėkštelių, į kurias dedama po 4ml naujos terpės ir po 0,06 ml ląstelių suspensijos (persodinimas į Petri lėkšteles vyksta pagal ląstelių persodinimo aprašą (2.1.2)). Iki tyrimo pradžios ląstelės kultyvuojamos inkubatoriuje tris paras.

Pertri lėkštelėse esanti terpė nupilama ir užpilama mėgintuvėluose esanti terpė su toneriais, paliekant vieną kontrolinę Petri lėkštelę, kiekvieną jų atitinkamai pažymint spalvos ir koncentracijos žymomis. Laikoma inkubatoriuje 2 valandas.

Po šio laiko tyrimo rezultatai stebimi invertuotu mikroskopu (VWR VisiScope IT 404).

2 lentelė. CHO-K1 ląstelės su skirtingų koncentracijų dažų ir SiO₂ nanodalelių suspensijomis

	Kontrolinė grupė	50 µg/ml	100 µg/ml	200 µg/ml
Mėlyni dažai				
SiO ₂				

Stebint ląsteles mikroskopu matomi pakitimai – silicio dioksido nanodalelės per ganėtinai trumpą laiko tarpą lengvai pereina pro ląstelių plazminę membraną, o spausdinimo dažų dalelės jas aplimpa.

Ląstelės stebimos su terpe, be jos bei po praplovimo su PBS, tokiu būdu geriau matomas dalelių skvarbumas ir pro plazminę membraną, o nepraėjusios dalelės pašalinamos. Ląstelės stebimos su skirtingomis spausdinimo dažų ir silicio dioksido nanodalelių koncentracijomis, kurioms didėjant, didėja dažų kiekis aplink ląstelę. Nuotraukos su likusiomis dažų spalvomis 1-ame priede.

Nuotraukose matome, kad spausdinimo dažų dalelės ir SiO₂ nanodalelės lieka prilipusios prie ląstelės. Kai kurios silicio dioksido nanodalelės net prasiskverbia pro ląstelių membranas, tai leidžia mažas jų dydis (15nm). (Tyrimo nuotraukos su kitų spalvų dažomaisiais milteliais pateikiamos priede Nr.1.)

2.3 Trečias etapas

2.3.1 Gyvybingumo tyrimas

Darbe gyvybingumo nustatymui yra pasirinktas MTT tyrimas - tai testas skirtas ląstelių metaboliniam aktyvumui įvertinti. Viduląstelinių procesų aktyvumą ląstelėse parodo redukuotų piridino dinukleotidų NAD(P)H kiekis. Redukuojant tetrazolio druską (MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromidas)) NAD(P)H jonais susidariusio chromoforo-formazano kiekis yra tiesiogiai proporcingas gyvų ląstelių kiekiui. Redukavus MTT tirpalą, jo spalva pasikeičia iš gelsvos į violetinę dėl susidariusių formazano druskų, kurių koncentracija išmatuojama spektrofotometru (L.Trečiokaitė, R.Paulauskaitė, R.Žūkienė, 2018).

Po 24h ląstelių auginimo (auginamos inkubatoriuje 37°C temperatūroje, 90% drėgnoje ir 5% CO₂ prisotintoje aplinkoje, DMEM terpėje) 96 šulinėlių skaidrioje plokštelėje, auginimo terpė nusiurbama ir ant ląstelių užpilama 200 µl terpės su skirtingomis koncentracijomis: 50µg, 100µg bei 200µg spausdinimo dažų ir silicio dioksido nanodalelių suspensijos, kurios ruošiamos pagal lentelę:

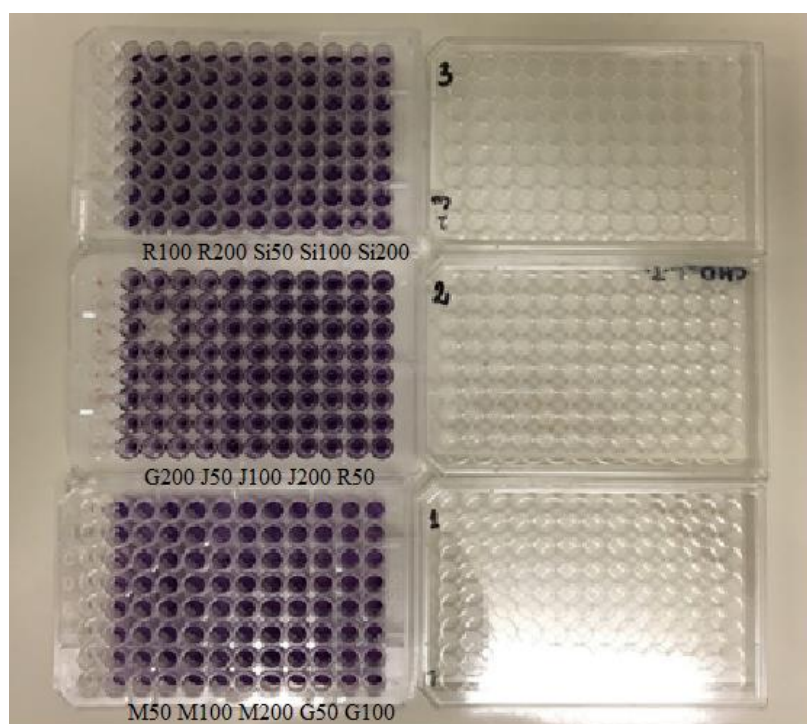
3 lentelė. Spausdinimo dažų ir SiO₂ nanodalelių suspensijų kiekiai skirtingų koncentracijų paruošimui terpėje

Koncentracija	Suspensijos kiekis į 200 µl terpės
50 µg/ml	0,02 µl
100 µg/ml	0,04 µl
200 µg/ml	0,08 µl

Kiekvienai tiriamai grupei skiriama 16 šulinėlių bei 8 šulinėliai, kuriuose ląstelės nesėjamos, o paliekama fono nustatymui su galutiniu tirpikliu, šiuo atveju izopropanoliu, ir inkubuojama 2 valandas. Po inkubacijos su dažomaisiais milteliais ir nanodalelėmis, terpė nusiurbama ir užpilama po 100µl 0,5mg/ml (ruošiamas iš 30ml terpės ir 0.015g MTT dažo) MTT tirpalo auginimo terpėje (tirpalas paruošiamas ir dar pusvalandį palaikomas inkubatoriuje, kad pilnai ištirptų MTT). Inkubuojama 45 min 37°C temperatūroje, CO₂ 5% inkubatoriuje. Praėjus inkubacijos laikui, terpė su MTT nusiurbama, ląstelės praplaunamos su PBS tirpalu du kartus, šis sausai išsiurbiamas ir užpilama 50µl izopropanolio, kuris ištirpina susidariusį formazaną ląstelėse. Šviesos absorbcija matuojama multifunkciniu mikrodalelių mikroplokštelių spektrofotometru (TECAN GeniosPro), esant 535 nm bangos ilgiui 25°C temperatūroje.

Kontrolinių šulinėlių absorbcija laikoma 100 procentiniu gyvybingumu.

MTT testas buvo atliekamas trijose 96 šulinėlių skaidriose plokštelėse. Visose plokštelėse paliekama tuščia 8 šulinėlių eilutė, fono apskaičiavimui bei antra dar viena tokia eilutė tik su ląstelėmis, kuri yra kontrolinė grupė. Visur kitur, iš eilės pagal lentelę, po 16 šulinėlių - 2 stulpelius, pilamos skirtingų koncentracijų spausdinimo dažų ir SiO₂ nanodalelių suspencijos.



2 pav. Šulinėliai su skirtingomis spausdinimo dažų ir nanodalelių koncentracijomis

M – Mėlynos spalvos (Canon C-EXV 29 Cyan Toner) dažų milteliai;

G - Geltona spalvos (Canon C-EXV 29 Yellow Toner) dažų milteliai;

J - Juoda spalvos (Canon C-EXV 29 Black Toner) dažų milteliai;

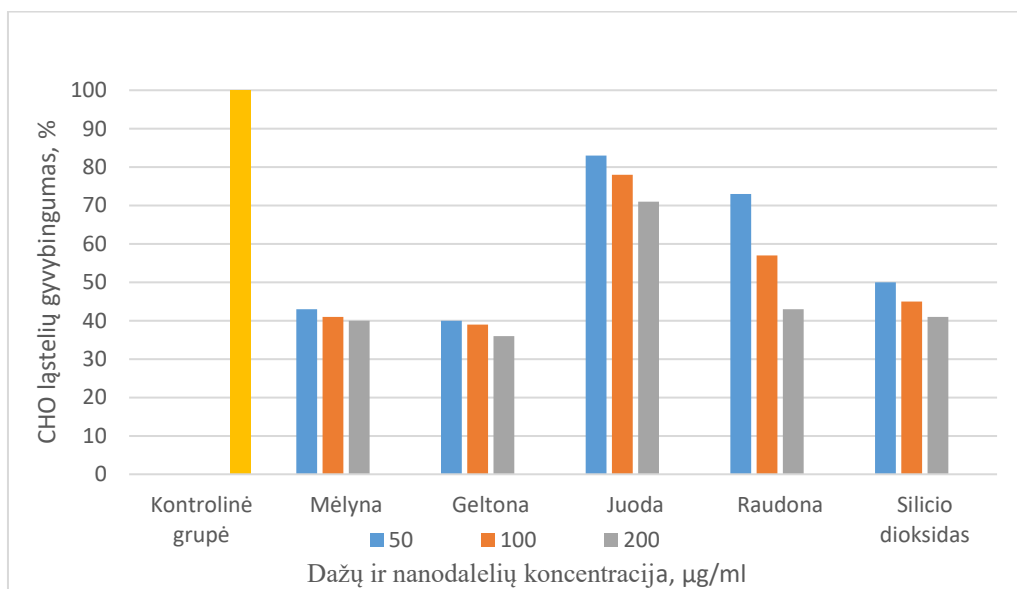
R - Raudona spalvos (Canon C-EXV 29 Magenta Toner) dažų milteliai.

50, 100, 200 – dažų ir nanodalelių koncentracija terpėje, $\mu\text{g/ml}$.

Kad rezultatai būtų tikslesni šviesos absorbcija matuota du kartus ir skaičiuojamas gautų rezultatų vidurkis (priedas Nr.2).

Rezultatai

Spektrofotometrijos absorbcijos duomenys buvo įrašyti duomenų registravimo žurnale. Iš gautų duomenų sudarius stulpelinę diagramą (3 pav.) galima matyti, kad ląstelių gyvybingumas mažėja didėjant spausdinimo dažų ir silicio dioksido nanodalelių koncentracijai terpėje. Didžiausią neigiamą įtaką ląstelių gyvybingumui daro mėlynos ir geltonos spalvų dažai bei silicio dioksido nanodalelės. Mažiausiai įtakos gyvybingumui turi juodos ir raudonos spalvų dažai. Tokius skirtumus lemia skirtinga dažų cheminė sudėtis.



3 pav. Ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo skirtingų spalvų dažų ir nanodalelių koncentracijų terpėje

Stebint vizualinius morfologinius pokyčius ląstelėse matyti, kad didėjant spausdinimo dažų ir silicio dioksido koncentracijoms terpėje, dažų dalelės jas aplimpa vis didesniais kiekiais, o silicio dioksido nanodalelės dėl savo mažo dydžio prasiskverbia pro ląstelių membranas.

Išvados

- 1) Panaudojant esamas metodikas, laboratorijos sąlygomis pavyko sukurti dvi modelines sistemas – CHO-K1 ląstelių liniją DMEM terpėje ir A549 ląstelių liniją RPMI-1640 terpėje. Atsižvelgiant į tai, kad CHO-K1 ląstelės auga sparčiau, jų persodinimo ciklas yra trumpesnis bei gali būti persodintos daug kartų, priešingai nei A549, buvo nuspręsta atlikti tyrimą su šia linija.
- 2) Atliekant morfologinį tyrimą (stebėjimas mikroskopu) pavyko nustatyti, kad spausdintuvų dažai po trumpo kontakto su CHO-K1 ląstelėmis prisikabina prie ląstelės membranos, o silicio oksido nanodalelės įveikia jos membraną ir patenka į ląstelės vidų. Tyrimas buvo atliktas su skirtingomis spausdinimo dažų koncentracijomis (50µg/ml, 100µg/ml ir 200µg/ml), jo rezultatai pateikiami priede Nr. 1. Didėjant šių medžiagų koncentracijoms terpėje jų prikibimas prie ląstelių proporcingai didėja. Todėl matome, jog didžiausias prikibimas buvo stebimas visų dažomųjų miltelių spalvų ir silicio dioksido 200µg/ml terpėje, lyginant su kitomis koncentracijomis.
- 3) MTT tyrimu buvo nustatyta, kad visų spalvų dažų ir silicio dioksido nanodalelių poveikis su CHO-K1 ląstelėmis turi neigiamos įtakos ląstelių gyvybingumui. Tai reiškia, kad ląstelių mirtingumas proporcingai didėja didėjant šių medžiagų koncentracijai. Ypač didelės įtakos mirtingumui, palyginus su kontroline grupe, turi mėlynos bei geltonos spalvų dažomieji milteliai ir silicio dioksido nanodalelės, o mažesniu mirtingumu pasižymi juodos ir raudonos spalvų dažais paveiktos ląstelės.

Rekomendacijos

Atsižvelgiant į darbo rezultatus, tikslinga būtų atlikti *in vitro* tyrimą su žmogaus plaučių ląstelių linija A-549, nes jis padėtų tiksliau suprasti spausdintuvų dažų poveikį žmogaus sveikatai. Žinant, kad rinkoje egzistuoja daugybė spausdintuvų gamintojų bei pasibaigusių spausdintuvo kasečių pildymo paslaugos, tikslinga ištirti ir palyginti skirtingų gamintojų originalių bei pildymui naudojamų dažų įtaką ląstelėms. Vertinant šio tyrimo metu gautus rezultatus, kad net netoksiško silicio dioksido nanodalelės prasiskverbia pro ląstelių membraną bei daro neigiamą įtaką ląstelių gyvybingumui, tikslinga atlikti tyrimus su visomis į valstybės rinką patenkančiomis medžiagomis, kurių sudėtyje yra nanodalelių. Tokių tyrimų atikimas dėl didelės spausdintuvų įvairovės ir lėto žmogaus plaučių ląstelių linijos augimo ciklo reikalautų didelių laiko sąnaudų (Cell line profile A-549, 2012).

Literatūros sąrašas

- [1] Berting A, Farcet MR, Kreil TR. Virus susceptibility of Chinese hamster ovary (CHO) cells and detection of viral contaminations by adventitious agent testing. Biotechnol Bioeng. 2010. Prieiga per: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5152558/>
- [2] Best Sellers in Laser Computer Printers. Prieiga per: <https://www.amazon.com/Best-Sellers-Electronics-Laser-Computer-Printers/zgbs/electronics/172648>
- [3] Canon C-EXV 29 Black Toner safety data sheet. 2015. Prieiga per: [635981367310431871EN\(2\).pdf](#)
- [4] Canon C-EXV 29 Cyan Toner safety data sheet. 2015. Prieiga per: [635981367332930882PS.pdf](#)
- [5] Canon C-EXV 29 Magenta Toner safety data sheet. 2015. Prieiga per: [635981367356992308OR.pdf](#)
- [6] Canon C-EXV 29 Yellow Toner safety data sheet. 2015. Prieiga per: [635981367380428830DL.pdf](#)
- [7] Campbell Reece „Biology” eight edition. 2008
- [8] Cell line profile A549. 2012. Prieiga per: <https://www.phe-culturecollections.org.uk/media/126404/a549-cell-line-profile.pdf?fbclid=IwAR1NQ6EK4pIN3M3ouCEtj1dEzdc9QSVLfmDjXu0S03OZzpLgLCTZdXtOc8E>
- [9] V. Dagienė, G. Grigas, T. Jevsikova Enciklopedinis kompiuterijos žodynas, 2016.
- [10] Demokritou, Philip. Nanoparticle exposures from nano-enabled toner-based printing equipment and human health: state of science and future research needs. 2017. Prieiga per: <https://doi.org/10.1080/10408444.2017.1318354>

- [11] Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 2011. Prieiga per: <http://himedialabs.com/TD/AT068.pdf>
- [12] ECACC General Cell Collection: NCI-H69/LX20 Prieiga per: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=96042332&collection=ecacc_gc
- [13] Emilija Radlinskaitė. „Silicio jonų koncentracijos vandenyje poveikis melsvabakterėms”, 2018.
- [14] Information about nanomaterials and their safety assessment. Toner. 2014. Prieiga per: <https://www.nanopartikel.info/en/nanoinfo/cross-cutting/1757-toner-crosscutting?fbclid=IwAR3EFJBU56daJICYAHP0mY44eCqYmQ-Nq0hMPPjp4-IBIJfdZaWmaC6RxOA>
- [15] Jurgis Kadziauskis „Biochemijos pagrindai” 2012.
- [16] Kalbos pratimai. Kn. 4: Leksika: 1. Skolinių vartojimas, Vilnius, 2003.
- [17] Lidia Zapór. Evaluation of Selected Toxicity Endpoints in Ovary Cells Exposed to Nanoceria., 2016 Prieiga per: http://ros.edu.pl/images/roczniki/2016/No2/29_ROS_N2_V18_R2016.pdf
- [18] „Linux” žodynėlis, Kaunas 2004.
- [19] L.Trečiokaitė, R.Paulauskaitė, R.Žūkienė, L.Ragelienė. Impact of BaSO₄ particles on the Viability of eukaryotic and prokaryotic cells. 2018
- [20] Nano materials in toner „raising safety concerns” August 12, 2015. Prieiga per: <https://www.therecycler.com/posts/nano-materials-in-toner-raising-safety-concerns/>
- [21] Neha Verma. Analysis of laser printer and photocopier toners by spectral properties. Spectrochimica, 2018.
- [22] Regulation (EC) No 1272/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures amending and repealing

Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006 (OJ L 353, 31.12.2008, p.1)

[23] Ru Bai, Lili Zhang. Pulmonary responses to printer toner particles in mice after intratracheal instillation, Toxicology Letters, 2010.

[24] Sivakumar Murugadoss, Dominique Lison, Lode Godderis, Sybille Van Den Brule, Jan Mast, Frederic Brassinne, Noham Sebaihi, Peter H. Hoet Toxicology of silica nanoparticles. 2017. Prieiga per: https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-017-1993-y?fbclid=IwAR3DWIQR-tvGzGe5RQp2LudjeF5RcWUsqnvFRJcq9_Scnxdc1qQdKu9jF_w

[25] L.Trečiokaitė, R.Paulauskaitė, R.Žūkienė, L.Ragelienė. Impact of BaSO₄ particles on the Viability of eukaryotic and prokaryotic cells. 2018

[26] A.V. Vannikov, A.V. Churkin, M.A. Solovieva. MONOCOMPONENT, NONMAGNETIC TONER WITH SURFACE SILICON OXIDE NONAPARTICLES ADDITION. 2013.

[27] V. Žalkauskas Šiuolaikinių kompiuterių programų ir tinklų žodynas, Vilnius, 2003.

Informacija apie instituciją ir asmenis, padėjusius atlikti tyrimą

Darbas buvo atliktas Kauno tvirtovės VII forte, jame įrengtoje biochemijos laboratorijoje. Ši įstaiga pasirinkta todėl, kad joje buvo sudarytos visos palankios sąlygos tyrimo atlikimui bei finansuojamas visų reikalingų reagentų įsigijimas.

Kauno tvirtovės VII fortas yra neformaliojo švietimo įstaiga, veikianti gamtos ir tikslųjų mokslų srityse. Ši įstaiga organizuoja įvairius neformalaus švietimo būrelius, tarp kurių ir biochemijos būrelis III-IV gimnazijos klasių moksleiviams, kuriame įgijau žinių būtinų tiriamajam darbui.

Biochemijos būrelio reikmėms įstaigoje yra įrengta II klasės biologinės saugos laboratorija, čia esanti aparatūra užtikrina reikalingą sterilumą bei leidžia atlikti įvairius tyrimus baltymų, genetikos, ląstelių biologijos bei biotechnologijų srityse. Tyrimo metu daugiausia teko naudotis laminaru, CO₂ inkubatoriumi, mikroskopais, mikroplokštelių spektrometru bei automatinėmis pipetėmis.

Kauno tvirtovės VII forte dirba bendrosios chemijos, biochemijos, genetikos mokytojai bei laborantai, su kuriais visuomet galima konsultotis. Darbo vadovu buvo pasirinkta Lina Trečiokaitė, nes ji šioje įstaigoje turi daugiausia patirties dirbant su ląstelių linijomis. Dėl darbo struktūros bei aprašo daugiausiai teko konsultotis su Emilija Radlinskaitė, nes ji turėjo sėkmingos patirties rengiant bei ginant brandos bei ES jaunojo mokslininko konkurso tiriamuosius darbus.