



ONESNAŽEVANJE ZRAKA Z LEBDEČIMI (PM) DELCI TER PROUČEVANJE NJIHOVEGA VPLIVA NA MEMBRANE CELIC

Raziskovalno delo

Področje: *MEDICINA*

MENTOR:

strok. sod. Marko JERAN
Zdravstvena fakulteta in Fakulteta za elektrotehniko,
Univerza v Ljubljani

AVTORICI:

Kristina BERGLEZ
Manca OREL
dijakinji 4. letnika tehniške gimnazije

SO-MENTORICI:

dr. Ana KROFLIČ
Kemijski inštitut, Ljubljana

Tjaša KLEMEN, mag. bth.
Biotehniški izobraževalni center Ljubljana

Ljubljana, april 2021

ZAHVALA

Zahvaljujema se mentorju, strokovnemu sodelavcu **Marku JERANU** z Zdravstvene fakultete in Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani, za vso strokovno pomoč, čas in potrpežljivost pri delu. Hkrati se Vam zahvaljujema, da ste nama omogočili priložnost opravljanja dela izven okvirjev šole, kar nama je dalo še več motivacije in vpogleda v naravoslovje. Hvala za usmerjanje pri delu, predvsem pa sva Vam hvaležni za nepozabno izkušnjo ter vse znanje, ki je prišlo z njo. Hvala.

Zahvaljujema se tudi dr. **Ani KROFLIČ**, znanstveni sodelavki s Kemijskega inštituta v Ljubljani, za potrpežljivost na samem začetku in vse zlata vredne napotke pri skupnem sodelovanju. Tudi z Vašo pomočjo sva se veliko naučili. Predvsem hvala, da ste nama omogočili delo na področju analizne kemije. Hvala.

Hvaležni sva gospe **Urški SKUBE**, ki naju je prijazno vodila v laboratoriju za analizno kemijo in usmerjala pri poteku dela ter nama priskočila na pomoč pri analizi podatkov. Hvala tudi viš. znan. sod. dr. **Marjanu BELETU** prav tako s Kemijskega inštituta v Ljubljani za strokovno pomoč pri pregledu vzorcev z mikroskopijo SEM.

Hvala še šolski mentorici **Tjaši KLEMEN** za podporo, ki sva jo potrebovali tekom raziskovalnega dela.

Najlepša hvala *Skupini za atmosfersko kemijo Odseka za analizno kemijo Kemijskega inštituta Ljubljana in Laboratoriju za klinično biofiziko Zdravstvene fakultete ter Laboratoriju za fiziko Fakultete za elektrotehniko Univerze v Ljubljani*, za zagotovljeno infrastrukturo praktičnega dela. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v okviru raziskovalnih programov P3-0388 (*Mehanizmi varovanja zdravja*) in P1-0034 (*Analitika in kemijska karakterizacija materialov ter procesov*) Javne agencije RS za raziskovalno dejavnost (ARRS).

* * *

Še enkrat hvala vsem, ki ste nama stali ob strani in bili del najinega raziskovalnega dela.

Hvala!

*»Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.«
Marie Skłodowska-Curie, dvojna Nobelova nagrajenka: za fiziko (1903) in kemijo (1911)*

KAZALO VSEBINE

ZAHVALA.....	1
1. POVZETEK.....	6
ABSTRACT.....	7
2. UVOD.....	8
2.1 Pristop k delu in potek dela	8
3. TEORETIČNI DEL	10
3.1. Zrak in njegovo onesnaženje.....	10
3.1.1 Glavni onesnaževalci zraka.....	10
3.1.2 Lebdeči (PM) delci.....	10
3.1.3 Glavni viri PM onesnaženja.....	11
3.2 Kakovost zraka in življenje	12
3.2.1 Spremljanje kakovosti zraka	12
3.2.2 Vpliv onesnaženosti zraka na zdravje	13
3.3 Interakcija lebdječih delcev z biološkim gradivom.....	14
3.4 Celična membrana in fosfolipidni dvosloj kot model tekočega mozaika.....	14
3.5 Krvne celice.....	16
3.5.1 Eritrociti	16
3.6 Metode in tehnike raziskovalnega dela.....	17
3.6.1 Mikroskopija	17
3.6.2 Določanje koncentracije PM	18
3.6.3 Spektrometer za štetje submikronskih delcev	19
3.6.4 Pretočna citometrija.....	20
3.7 Cilj raziskovalnega dela.....	21
3.8 Hipotezi	22
4. EKSPERIMENTALNI DEL	23
4.1 Materiali in pripomočki	23
4.1.1 Analiza PM delcev iz zraka	23

4.1.2 Vpliv PM delcev na membrane eritrocitov	23
4.2 Merjenje delcev PM iz zraka	24
4.2.1 Tehtanje filtrov	24
4.2.2 Vzorčenje PM	25
4.2.3 Analiza delcev z SMPS	26
4.3 Vpliv PM delcev na membrane eritrocitov.....	27
4.3.1 Morfološki pregled vzorcev.....	27
4.3.2 Priprava eritrocitov za študij vpliva delcev PM ₁₀	27
4.3.3 Proučevanje vpliva delcev PM ₁₀ na eritrocite.....	27
5. REZULTATI	29
5.1 Rezultati analiz PM delcev	29
5.1.1 Rezultati vzorčenja s PM vzorčevalnikom	29
5.1.2 Rezultati analiz SMPS	32
5.1.3 Rezultati mikroskopiranja s SEM	34
5.2 Vpliv delcev PM ₁₀ na populacijo eritrocitov človeške krvi.....	37
5.2.1 Rezultati merjenja populacij eritrocitov s pretočno citometrijo	37
5.2.2 Rezultati mikroskopiranj z invertnim svetlobnim mikroskopom	38
5.2.3 Vpogled v sorodne študije – izpostavitve eritrocitov nanodelcem črnega ogljika.....	42
6. DISKUSIJA.....	43
6.1 Koncentracije PM delcev v zraku	43
6.2 Vpliv PM delcev na membrane eritrocitov.....	44
7. ZAKLJUČEK.....	46
8. VIRI.....	47
9. PRILOGA	49
9.1 Kvantitativno določanje eritrocitov v tretiranih vzorcih c pomočjo pretočne citometrije..	49
9.2 Razsevni diagrami.....	51

KAZALO SLIK

Slika 1: Vpliv onesnaževalcev zraka na zdravje ljudi (Vir: Poročilo o kakovosti zraka ¹).....	13
Slika 2: Prikaz zgradbe fosfolipida (Vir: Lipidi ¹⁶).....	15
Slika 3: Prikaz fosfolipidnega dvosloja (Vir: Lipidi ¹⁶).....	15
Slika 4: Invertni svetlobni mikroskop (Vir: Last avtorjev in mentorjev).	18
Slika 5: Zgradba spektrometra SMPS (Vir: Meritve delcev PM ₁₀ na merilnem mestu Hrastnik ²⁸). 19	
Slika 6: Shema pretočnega citometra (Vir: Uporaba pretočne citometrije za preučevanje mehanizmov toksičnosti ³¹).	20
Slika 7: (A) Tehnica za tehtanje filtrov. (B) Označeni plastični vsebniki za filtre in nosilci za vzorčenje (Vir: Last avtorjev in mentorjev).	25
Slika 8: (A) Tuba za vzorčenje. (B) in (C) Vstavljanje nosilcev v tubo za vzorčenje. (D) PM vzorčevalnik. (E) Tubi s filtri med vzorčenjem v PM vzorčevalniku. (F) Filtri po vzorčenju (Vir: Last avtorjev in mentorjev).....	26
Slika 9: Primer razsevnega diagrama po 24 urah: (A) razredčena kri, (B) delci PM ₁₀ s koncentracijo 200 µg/mL in (C) tretirani vzorec krvi s koncentracijo delcev PM ₁₀ 200 µg/mL. Trikotna oblika regije v zgornjem levem kotu predstavlja območje sipanja delcev PM ₁₀ , oznaka CB. Območje, ki spominja na obliko pravokotnika zajema območje eritrocitne (ERC) regije in območje v osrednjem delu (krog, ERC-spherocyte) na sferocitne oblike eritrocitov.....	28
Slika 10: SEM posnetek filtra z vzorcem jesenske kampanje.	34
Slika 11: Prah ERM – CZ100 PM ₁₀ (angl. fine dust). Slednjega smo uporabljali pri študiji vpliva na eritrocite.	35
Slika 12: Povečano polje delcev ERM – CZ100 PM ₁₀ (angl. fine dust).	36
Slika 13: Prikaz mikroskopiranja eritrocitov, ki so bili izpostavljeni PM ₁₀ delcem s koncentracijo 50 µg/mL (Vir: Last avtorjev in mentorjev).....	38
Slika 14: Prikaz mikroskopiranja eritrocitov, ki so bili izpostavljeni PM ₁₀ delcem s koncentracijo 100 µg/mL (Vir: Last avtorjev in mentorjev).	39
Slika 15: Prikaz mikroskopiranja eritrocitov, ki so bili izpostavljeni PM ₁₀ delcem s koncentracijo 200 µg/mL (Vir: Last avtorjev in mentorjev).	40
Slika 16: Zunajcelični vezikel na eritrocitni membrani v vzorcu s koncentracijo PM ₁₀ delcev 200 µg/mL po 24-urni izpostavitvi (Vir: Last avtorjev in mentorjev).....	41
Slika 17: (A) Kontrola eritrocitov človeške krvi v pufri. (B) Eritrociti človeške krvi z dodanimi nanodelci CB. (C) Povečan odsek eritrocitov človeške krvi z dodanimi nanodelci CB. (D) Eritrociti pasje krvi z nanodelci CB. (E) Povečan odsek eritrocitov pasje krvi z dodanimi nanodelci CB. (F)	

Povečana regija pasje krvi tretirane z nanodelci CB, kjer so poleg eritrocitov prisotni tudi trombociti. (Vir: Šuštar in sodelavci ³³).....	42
Slika 18: Razsevni diagrami pretočne citometrije.....	52
Slika 19: Razsevni diagrami pretočne citometrije.....	53
Slika 20: Razsevni diagrami pretočne citometrije.....	54
Slika 21: Razsevni diagrami pretočne citometrije.....	55
Slika 22: Razsevni diagrami pretočne citometrije.....	56
Slika 23: Razsevni diagrami pretočne citometrije.....	57
Slika 24: Razsevni diagrami pretočne citometrije.....	58
Slika 25: Razsevni diagrami pretočne citometrije.....	59
Slika 26: Razsevni diagrami pretočne citometrije.....	60
Slika 27: Razsevni diagrami pretočne citometrije.....	61
Slika 28: Razsevni diagrami pretočne citometrije.....	62

KAZALO TABEL

Tabela 1: Količina delcev PM _{2,5} – poletje.....	30
Tabela 2: Količina delcev PM _{2,5} – jesen.....	31
Tabela 3: Rezultati merjenj populacije eritrocitov s pretočnim citometrom po 1, 8 in 24 h.	49
Tabela 4: Rezultati citometrije na negativni kontroli in kontroli modelnega PM ₁₀ po 1, 8 in 24 h.	50
Tabela 5: Oznake vzorcev za merjenje s pretočno citometrijo.....	51

KAZALO GRAFOV

Graf 1: Primerjava masnih koncentracij – poletje/jesen in primerjava z mejno vrednostjo po WHO.....	32
Graf 2: Primerjava povprečne tedenske številčne porazdelitve – poletje/jesen.....	32
Graf 3: Primerjava povprečne tedenske masne porazdelitve – poletje/jesen.....	33
Graf 4: Rezultati merjenja populacij s pretočno citometrijo po 1, 8 in 24 h tretiranja eritrocitov z delci PM ₁₀	37

KAZALO PRILOG

9.1 Kvantitativno določanje eritrocitov v tretiranih vzorcih s pomočjo pretočne citometrije..	49
9.2 Razsevni diagrami.....	51

1. POVZETEK

Lebdeče (PM) delce uvrščamo med najbolj nevarna onesnaževala zraka, ki povzročajo resne posledice za zdravje ljudi. Daljša izpostavljenost višjim koncentracijam delcev lahko privede do hudih zdravstvenih zapletov in težkih kroničnih obolenj.

V raziskovalnem delu smo sledili koncentraciji PM delcev v zraku in proučevali njeno spreminjanje skozi letne čase (poletje in jesen). Rezultati eksperimentalnega dela so v hladnejšem obdobju pokazali višjo koncentracijo delcev v zraku. Povprečna dnevna masna koncentracija delcev PM_{2,5} je v jesenskem času znašala 30,85 µg/m³, kar pomeni, da je presegala mejno dnevno vrednost določeno po smernicah WHO. Jesenski rezultati nakazujejo, da je v Ljubljani raven onesnaženosti zraka problematična za zdravje ljudi. Z namenom interdisciplinarne sinteze znanja iz varovanja okolja in medicine smo zaradi razsežnosti vpliva PM delcev na človeški organizem nadalje proučevali delovanje modelnega primera delcev PM₁₀ na eritrocite človeške krvi. Izsledki raziskave so pokazali, da se z daljšo časovno izpostavljenostjo in večanjem koncentracije delcev PM₁₀ niža delež eritrocitne populacije. Pri daljši izpostavitvi eritrocitov delcem so bile opazne tudi spremembe oblik membrane. Z uporabo invertnega svetlobnega mikroskopa je bilo moč opaziti prehod iz ehinocitne oblike v stomatocitno.

Rezultate raziskave bi lahko v nadaljevanju uporabili za osnovo pri obsežnejšem tipu raziskovanja systemskega vpliva vdihanih PM delcev na celoten organizem.

Ključne besede: PM delci, onesnaženje zraka, zdravje, eritrociti, eritrocitne membrane, pretočna citometrija, vrstična elektronska mikroskopija (SEM), invertna svetlobna mikroskopija, odziv celic, medicina

ABSTRACT

Particulate matter (PM) is classified as one of the most dangerous air pollutants which cause numerous adverse health effects. Prolonged exposure to high PM concentrations can lead to serious health complications and severe chronic conditions.

Our research work focused on the concentration of PM in ambient air – we studied how it changes with different seasons (summer and autumn). The results of our experimental work showed that in colder periods the concentration of PM increased in the air. In autumn, average daily mass concentration was determined at $30,85 \mu\text{g}/\text{m}^3$, which means it exceeded the daily limit set by the WHO. These results indicate that the level of air pollution has a detrimental influence on human health in Ljubljana. Due to strong impacts of PM on our body, we further studied the impact of PM_{10} on human blood erythrocytes, with the aim of interdisciplinary synthesis of knowledge gained from the field of environmental protection and medicine. The results also showed that prolonged exposure and increasing concentration of PM_{10} particles cause a decrease in erythrocyte population. When erythrocytes were exposed to particles for a longer period, the changes in membrane shapes could be also observed. With help of scanning electron microscope (SEM), a transition from echinocyte to stomatocyte cell shape was observed.

The results of this research could be used as a basis for more extensive research on the systemic impact of inhaled PM particles in human body.

Key words: PM particles, air pollution, health, erythrocytes, erythrocyte membranes, flow cytometry, scanning electron microscopy (SEM), inverted microscopy, cell response, medicine

2. UVOD

Onesnaženje zraka v sodobnem času predstavlja vedno bolj pereč problem, saj so posledice prekomernega onesnaževanja že vidne po celem svetu. Ozaveščanje in raziskave na področju vpliva onesnaževalcev na človeški organizem trenutno predstavljajo nujnost, predvsem zaradi razumevanja problematike vseh ključnih deležnikov v sistemu.

Pričujoče raziskovalno delo je nastalo med poletnimi počitnicami ter v šolskem letu 2020/21. Raziskovanja smo se lotili s ciljem boljšega razumevanja onesnaženosti zraka in vpliva lebdječih delcev (PM) na membrane celic. S pomočjo PM vzorčevalnika in spektrometra za štetje submikronskih delcev smo za razumevanje materije najprej raziskali količino PM delcev v zraku v različnih letnih časih. Nadaljnji namen raziskave je bil ugotoviti, kako vseobsežen je vpliv PM delcev na krvne eritrocite.

Če želimo pojasniti vpliv onesnaženja okolja na organizem, je pomembno za študij uporabiti modele, ki bodo zagotavljali dovolj dober približek realnega stanja, hkrati pa ne bodo preveč splošni. V zadnjem času je bilo mogoče zaslediti uporabo različnih modelov celičnih kultur in modelnih celic (tj. liposomov oz. orjaških fosfolipidnih mehurčkov, GUVs), s katerimi so skušali pojasniti učinek delcev iz ozračja nanje. Ker je v krvi mogoče zaslediti največji odstotek hematokrita oz. eritrocitov, ki so med drugim odgovorni za prenos kisika po telesu, bi z njihovo pomočjo v nadaljevanju lahko pojasnili sistemski vpliv vdihanih nanodelcev na celoten organizem (oddajanje, sprejemanje kisika, vplivi na stres, itd.). Rezultate takšne raziskave bi lahko v nadaljevanju uporabili pri zasnovi raziskovanja vpliva delcev PM na membrane pljučnih celic.

2.1 PRISTOP K DELU IN POTEK DELA

Temeljniji praktični del smo opravili v *Skupini za atmosfersko kemijo*, ki deluje v okviru *Odseka za analizo kemijo* Kemijskega inštituta v Ljubljani, in *Laboratoriju za klinično biofiziko* Zdravstvene fakultete ter *Laboratorija za fiziko* Fakultete za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani. Delo je bilo nadzirano s strani tehnično usposobljenega osebja v sodelovanju z mentorji. Vso potrebo opremo so nama zagotovile inštitucije, s katerimi sva sodelovali.

Pred opravljanjem eksperimentalnega dela sva bili seznanjeni s temeljnimi varnostnimi predpisi, delovnimi aparaturami in eksperimentalno strategijo. Pred začetkom dela smo opravili tudi zdravniški pregled v okviru *Medicine dela, športa in prometa* Zdravstvenega doma Ljubljana ter test iz varstva pri delu.

Kemikalije in delovne raztopine, ki so bile opremljene z oznakami za nevarne snovi, smo obravnavali v skladu s predpisi o nevarnih snoveh. Skozi celoten proces smo nosili zaščitna sredstva (zaščitno masko, rokavice, zaščitna očala in haljo) in sledili smernicam za varno in učinkovito delo.

Za izvedbo poskusa na eritrocitih človeške krvi smo predhodno pridobili pisno soglasje na *Komisiji Republike Slovenije za medicinsko etiko* (2019) s številko 0120-146/2019/5. Kri je darovala odrasla zdrava oseba moškega spola, ki je bila del tega projekta (mentor). Odvzem je potekal po standardnem protokolu, na tešče ob 7.30 uri.

3. TEORETIČNI DEL

3.1. ZRAK IN NJEGOVO ONESNAŽENJE

3.1.1 Glavni onesnaževalci zraka

Onesnaževalce zraka kategoriziramo kot primarne in sekundarne onesnaževalce¹. Primarni onesnaževalci se v ozračje izločajo neposredno, medtem ko sekundarni onesnaževalci nastajajo v zraku z določenimi kemijskimi reakcijami (npr. oksidacija). Izvor onesnaževalcev zraka je lahko naraven, antropogen ali mešan².

Glavni onesnaževalci zraka so lebdječimi delci (PM), ogljikov monoksid (CO), ogljikov dioksid (CO₂) in ozon (O₃), črni ogljik (CB), določene kovine, oksidi sulfidov (SO_x), dušikovi oksidi (NO_x), amonijak (NH₃), metan (CH₄), hlapne organske spojine brez metana, ki vsebujejo benzen (C₆H₆), in policiklični aromatski ogljikovodiki (PAH)².

3.1.2 Lebdječimi (PM) delci

V Zemljini atmosferi je prisotnih veliko finih trdnih delcev, ki jih pogosto nazivamo s PM. Zmesi trdnih ali tekočih delcev z zrakom pravimo tudi aerosol. Aerosol je dvofazni sistem, sestavljen iz delcev in plina, v katerem ti lebdijo. Velikost teh delcev glede na njihov premer v grobem sega od 0,002 do 100 μm³.

Oznaka PM izhaja iz angleške besede »*particulate matter*«, kar prevajamo kot »*praškasta snov*«. PM glede na velikost delcev delimo v posamezne skupine. Najpogostejši in za zdravje najbolj nevarni skupini sta PM_{2,5} in PM₁₀. Števila ob oznaki označujejo največji aerodinamični premer delcev v tej skupini, in sicer zaporedoma 2,5 in 10 μm. Aerodinamični premer je uporaben, saj so delci nepravilnih oblik, zato jim težko določimo realno velikost. Aerodinamični premer je premer okroglega delca z gostoto 1000 kg/m³, ki se poseda z enako hitrostjo kot naš delec nepravilne oblike⁴.

Izraz PM tako označuje prah, ki je določen čas prisoten v atmosferskem aerosolu. Poleg O₃ in NO₂ veljajo PM delci za glavne sekundarne onesnaževalce zraka. Glavni prekurzorski (predhodni) plini za nastanek sekundarnih PM delcev so SO₂, NO_x in NH₃. Ti plini reagirajo v ozračju in tvorijo nehlapne sulfatne (SO₄²⁻), nitratne (NO₃⁻) in amonijeve (NH₄⁺) spojine².

Delce PM v največji meri sestavljajo anorganski ioni. Lahko so sestavljeni tudi iz organskega in anorganskega ogljika ter sledi strupenih kovin. Ogljik predstavlja pomembno frakcijo v atmosferskih delcih, zlasti v tistih iz urbanega okolja. Pojavlja se v zelo različnih oblikah, ki jih v

grobem lahko razdelimo v tri skupine – organski ogljik, elementarni oz. črni ogljik in ogljik karbonatnega vira (CO_3^{2-}). Ogljik v vseh oblikah nosi pomembno vlogo z vidika vpliva na zdravje, kemijskih procesov v atmosferi, zmanjševanja vidljivosti in vpliva na podnebne spremembe. Elementarni ogljik je primarno onesnaževalo in nastaja pri nepopolnem izgorevanju fosilnih goriv in biomase. Organski ogljik predstavlja kompleksno mešanico različnih ogljikovodikov, ki so lahko primarnega ali sekundarnega izvora. Primarni viri obsegajo procese izgorevanja, pri čemer nastajajo predvsem delci, ki so manjši od 1 μm . Preostali procesi, povezani z emisijami spor in cvetnega prahu, ostankov vegetacije, obrabo pnevmatik in re-suspencijo zemlje, pa vodijo do nastanka grobih primarnih delcev. Sekundarni nastanek organskega ogljika je povezan z reakcijami v atmosferi, kjer prihaja do pretvorbe hlapnih organskih spojin v trdne delce zaradi kondenzacije nizko hlapnih organskih komponent ali zaradi fizikalnih in kemijskih procesov plinastih zvrsti na površini delcev⁵.

Atmosferski aerosol lahko opišemo s številnimi lastnostmi. Ena izmed najosnovnejših, a hkrati najbolj uporabnih, je koncentracija delcev v zraku. Podatek pove število ali maso delcev, ki je prisotna v neki prostornini plina⁶. Glede na različne meteorološke dejavnike in vire onesnaženja velja, da se koncentracija onesnaževalcev v zraku skozi leto spreminja⁷.

3.1.3 Glavni viri PM onesnaženja

Atmosferski aerosoli so lahko naravnega ali umetnega izvora. Naravni aerosoli povzročajo predvsem alergije. Na njih ljudje nimamo vpliva, medtem ko so umetni aerosoli posledica človeškega delovanja. Številni umetni aerosoli, zlasti dim, so pogosto opredeljeni kot škodljivi ali moteči. Večina umetnih aerosolov nastane z mehanskimi ali termičnimi postopki, npr. med transportom in s kurjenjem. Med naravne vire onesnaženja zraka s PM uvrščamo vulkanski in saharški prah, gozdne požare ter morske aerosole. Antropogeni viri pa zajemajo izgorevanje goriv v termoenergetskih objektih in v industriji, ogrevanje stanovanjskih in drugih stavb ter promet⁸.

Največji antropogeni vir PM delcev predstavlja izgorevanje v gospodinjstvih in storitvenem sektorju⁷. Problematična je predvsem uporaba malih kurilnih naprav v zimskem obdobju. Lesna biomasa kot kurjava namreč predstavlja največji antropogeni vir organskih delcev v aerosolu. K izpustom delcev poleg kurjave pomembno prispeva tudi promet. Z vidika onesnaženosti zraka, predstavlja zimsko obdobje najbolj problematično obdobje v letu. Poleg kurjave in prometa k onesnaženosti pogosto pripomore tudi pojav temperaturne inverzije. Ta namreč močno omejuje prehod onesnaženega zraka v višje plasti ozračja. Najbolj očiten vpliv temperaturne inverzije nastopi ob zimskih večerih, ko se izpustom prometne konice pridruži še povečana koncentracija delcev zaradi večernega ogrevanja gospodinjstev⁷. Na povišano koncentracijo škodljivih delcev v

okolju vplivajo tudi določeni sezonski obredi, ki so del kulture posameznih narodov. V Sloveniji se tako ob prazniku dela (1. maj) zaradi množičnih prižiganj kresov onesnaženje zraka občutno poveča. Zaradi povečane uporabe pirotehnik se tudi v zadnjih tednih decembra poveča koncentracija škodljivih delcev v zraku⁴.

3.2 KAKOVOST ZRAKA IN ŽIVLJENJE

3.2.1 Spremljanje kakovosti zraka

Svetovna zdravstvena organizacija (angl. *World Health Organization* – WHO)⁹ določa mejno dnevno koncentracijo trdnih delcev PM_{2,5} za varovanje zdravja ljudi pri 25 µg/m³. Mejna letna vrednost za PM_{2,5} pa znaša 10 µg/m³. Mejna vrednost nam pove, kolikšna je najvišja dovoljena količina delcev PM_{2,5} v zraku, ki je še v mejah normale in ne povzroča večjih posledic za zdravje ljudi. Daljša izpostavljenost zraku s previsoko koncentracijo PM delcev namreč v človeškem organizmu povzroča različne bolezni in okvare organov⁹.

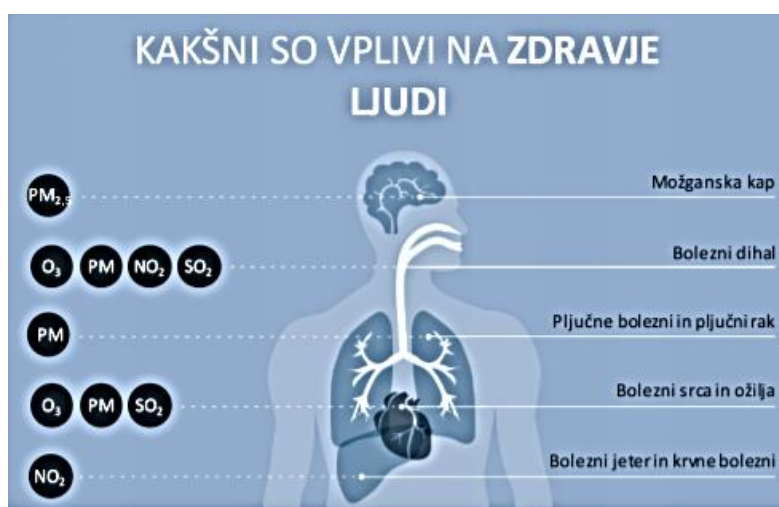
Za ocenjevanje kakovosti zraka je v Sloveniji zadolžena Agencija Republike Slovenije za okolje – ARSO. V skladu z Uredbo o kakovosti zraka in Pravilnikom o ocenjevanju kakovosti zunanjega zraka ocenjujejo kakovost zunanjega zraka s pomočjo meritev, ki potekajo skozi celo leto na istih lokacijah, razporejenih po celi Sloveniji, z indikativnimi meritvami ali objektivnimi ocenami⁷. Na stalnem merilnem mestu se izvajajo meritve neprekinjeno ali z naključnim vzorčenjem. Za njihovo izvajanje je predpisana zakonodaja z strogimi zahtevami. Zahteve glede indikativnih meritev so nižje, zato jih opravljajo s preprostejšimi metodami in z manjšo časovno pokritostjo. Indikativne meritve veljajo za manj natančne kot meritve na stalnih mestih. Način ocenjevanja kakovosti zraka je odvisen od onesnaženosti posameznih območij. Če je na nekem območju raven onesnaženosti zraka visoka, je zaradi natančnejšega monitoringa potrebno opraviti več meritev¹⁰.

Za lažje določanje ravni onesnaženja sta v Pravilniku o kakovosti zunanjega zraka določena zgornji in spodnji ocenjevalni prag za vsak posamezen onesnaževalec zraka⁷. Kadar so ravni onesnaženja nad spodnjim ocenjevalnim pragom, se meritve opravljajo na stalnih ocenjevalnih mestih. Če so ravni onesnaženja nad zgornjim ocenjevalnim pragom, se uporablja kombinacija meritev na stalnih mestih ter indikativnih meritev, z namenom da bi se tako natančneje izmerilo raven onesnaženosti in ustrezno ukrepalo. V primeru, da so ravni onesnaženja pod spodnjim ocenjevalnim pragom, zadoščajo že objektivne ocene onesnaženja, tako niso potrebne meritve na stalnih mestih¹⁰.

3.2.2 Vpliv onesnaženosti zraka na zdravje

Onesnaženost zraka je glavni razlog za prezgodnjo smrt in razvoj kardiovaskularnih in respiratornih obolenj ter karcinoma pljuč. Napredek navedenih bolezenskih stanj poteka hitreje, če izpostavljeni onesnaženosti zraka dodamo še nezdrav način življenja (npr. kajenje, alkohol, telesna neaktivnost). Izpostavljenost onesnaženemu zraku lahko pri otrocih in odraslih osebah povzroči zmanjšanje pljučne aktivnosti, respiratorne infekcije ali astmo. Izpostavljenost nosečnic lahko vpliva na plodnost, potek nosečnosti, fetus in v kasnejših obdobjih na razvoj otroka². Nekatere raziskave so pokazale, da se onesnaženost zraka lahko odraža tudi pri napredku diabetesa tipa 2, prekomerni telesni teži, prehitrem staranju, pojavi Alzheimerjeve bolezni in demence².

Kot že omenjeno, moramo ob glavnih plinastih onesnaževalcih NO_2 in O_3 posebno pozornost nameniti še delcem PM^2 . Tovrstni delci danes veljajo za primarnega krivca prezgodnje smrti. Najbolj so v nevarnosti otroci, astmatiki in ljudje z zmanjšano telesno odpornostjo¹¹. Delci $\text{PM}_{2,5}$ so po premeru veliko manjši od delcev PM_{10} , zato lahko ob vdihu prodrejo globlje v telo. Ob vdihu lahko namreč prodrejo vse do pljučnih alveol. Po absorpciji v krvni obtok povzročijo zoženje žil in nastanek strdkov, kar je lahko povod za srčni zastoj ali srčno kap. Po nekaterih raziskavah naj bi delci $\text{PM}_{2,5}$ zaradi hitrejšega staranja možganov in prekinitve komunikacije med posameznimi deli možganov zniževali kognitivne sposobnosti². Tuje znanstvene raziskave pa so prav tako pokazale, da se delci PM v sledovih pojavljajo tudi v možganskih deblih. Predvidevajo, da so delci dosegli možgane po vdihu skozi krvni obtok, zato se trenutno sklepa, da onesnaženje s PM vpliva tudi na razvoj nevrodegenerativnih bolezni, kot sta na primer Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen¹², povezujejo pa jih tudi z razvojem tumorjev¹³.



Slika 1: Vpliv onesnaževalcev zraka na zdravje ljudi (Vir: Poročilo o kakovosti zraka¹).

3.3 INTERAKCIJA LEBDEČIH DELCEV Z BIOLOŠKIM GRADIVOM

Vplivi PM na zdravje ljudi so odvisni od velikosti in oblike delcev ter od njihove kemijske sestave. Najpogostejši način vnosa PM delcev v telo je preko dihal, pri čemer lahko dosežejo prav vse dele pljuč.

Kovinski del delca se na primer ob vstopu v pljuča in v interakciji s pljučnimi celicami oksidira, to pa posledično povzroča poškodbe DNA, zvišuje tveganje za razvoj karcinoma in respiratorne bolezni (bronhitis)².

Raziskave so pokazale, da izpostavljenost nanodelcem pripomore k pljučnemu vnetju, preko sistemske cirkulacije pa se lahko prenesejo še v druge organe (jetra, srce, vranico, možgane). Vidne so bile tudi patofiziološke spremembe, povezane s kardiovaskularnimi boleznimi (spremembe srčne frekvence, povišan krvni tlak, aritmije itd.)³. Dokazano je, da povečanje koncentracije delcev velikosti 250 nm za 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ vodi do 8–18 % povečanja smrtnosti zaradi malignih motenj srčnega ritma in srčnega zastoja³.

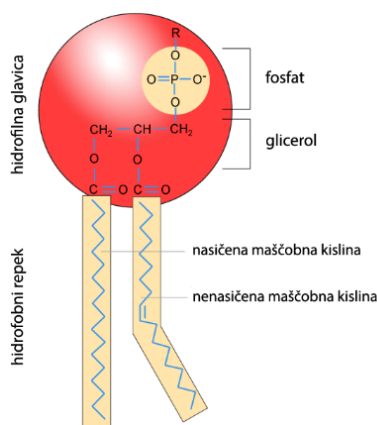
Opravljenе so bile tudi raziskave prehajanja delcev skozi kožo, kjer so ugotovili, da delci, večji od 100 nm, težko prehajajo skozi nepoškodovano kožo. Na živalskih modelih je bilo kljub temu vidno, da delci med 50 in 100 nm prehajajo skozi poroženelo plast in povzročajo celični imunski odgovor³.

Raziskovalci sklepajo, da bi lahko lebdječī delci povzročali preobremenitev fagocitov, kar sproži stresne reakcije, ki vodijo do vnetij. Kronično vnetje oslabi obrambo telesa pred drugimi boleznimi. Poleg omenjenega naj bi se lebdječī delci, ki so med drugim nerazgradljivi oz. slabo razgradljivi, akumulirali v tkivih in ovirali normalno delovanje organov. Zaradi svoje velike površine lahko nanodelci motijo biološke procese v telesu, pri čemer lahko vplivajo na regulatorne mehanizme uravnavanja encimov in drugih proteinov⁸.

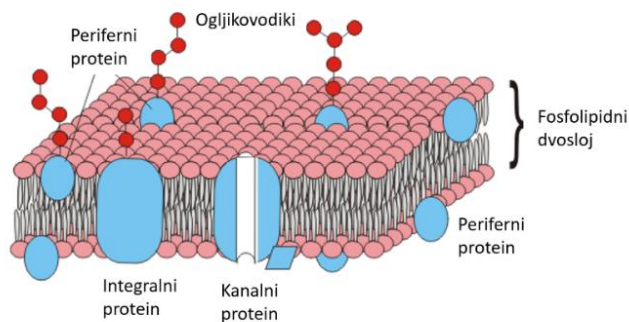
3.4 CELIČNA MEMBRANA IN FOSFOLIPIDNI DVOSLOJ KOT MODEL TEKOČEGA MOZAIKA

Model tekočega mozaika je teorija, ki se uporablja v celični biologiji za razlago zgradbe in funkcije celične membrane. Celična membrana (plazmalema) je en od osnovnih delov vsake celice. Njena glavna naloga je zaščita celice in prekomembranski transport. Debelina membrane je med 5 in 10 nm. Zgrajena je iz lipidov in proteinov. Osnovno strukturno ogrodje celične membrane predstavlja fosfolipidni dvosloj, ki omogoča fluidnost in elastičnost celice⁸.

Fosfolipide uvrščamo med lipide. Gradnika fosfolipidov sta hidrofobna repka in hidrofilna glavica. Glavico sestavljata fosfat in glicerol, repka pa gradita nasičena in nenasičena veriga maščobnih kislin. Amfifilna lastnost fosfolipidnih molekul omogoča, da se membranski lipidi v vodnem okolju združijo v stabilen dvosloj. Hidrofilna glavica se namreč orientira navzven, hidrofobni repki pa se združijo in tako preprečijo stik z vodo¹⁴. Energijsko je namreč najugodnejše, če je v stiku z okoliško vodno raztopino čim večji del hidrofilnega dela in hkrati čim manj hidrofobnega dela dvosloja. Kadar je plast dovolj velika, je tako energijsko najugodnejše, da se v vodni raztopini tvori fosfolipidni mehurček¹⁵.



Slika 2: Prikaz zgradbe fosfolipida (Vir: Lipidi¹⁶).



Slika 3: Prikaz fosfolipidnega dvosloja (Vir: Lipidi¹⁶).

Poleg fosfolipidov so v membrani tudi lipidi, ki spadajo med glikolipide in holesterol. Glikolipidi se nahajajo na zunanji strani membrane in sodelujejo pri zaščiti in obrambi celice. Holesterol je pomemben predvsem, ker poveča neprepustnost membrane za določene snovi, zmanjša fluidnost zunanje membrane ob povečanju temperature ter preprečuje, da bi membrana zmrznila ali da bi se zmanjšala njena fluidnost pri znižanju temperature¹⁷.

Poleg lipidov so glavni gradniki plazmaleme tudi membranski proteini. Proteini se vežejo s sladkorji in nastanejo glikoproteini. Ti so odgovorni predvsem za ohranjanje ali spreminjanje celične strukture in oblike, medcelično komunikacijo in aktivni oz. pasivni transport. Delujejo tudi kot receptorji za hormone in druge molekule¹⁷.

Celice za transport snovi skozi membrano uporabljajo različne mehanizme. Voda in nekatere manjše nepolarne molekule lahko skozi plazmalemo prehajajo nemoteno, njihov transport je odvisen le od njihove koncentracije znotraj in zunaj celice. Ioni in polarne molekule prehajajo skozi plazmalemo preko posebnih proteinskih kanalčkov. Snovi, ki so prevelike za transport skozi kanalčke, potujejo v celico in iz nje s pomočjo membranskega transporta¹⁴.

3.5 KRVNE CELICE

Kri je tekočina, ki nenehno kroži po telesu in mu zagotavlja hrano in kisik, ki ju potrebuje za nemoteno delovanje. Sama kri je sestavljena iz krvnega seruma (krvna plazma skupaj z beljakovino fibrinogenom) ter iz krvnih celic. Poznamo tri oblike krvnih celic; rdeče krvničke – eritrocite, bele krvničke – levkocite ter krvne ploščice – trombocite¹⁸.

Krvne celice se razvijejo iz krvotvornih matičnih celic in nastanejo v kostnem mozgu z močno reguliranim procesom hematopoeze. Matične celice hematopoeze se lahko spremenijo v rdeče krvne celice, bele krvne celice in trombocite. Omenjene matične celice najdemo v krvnem in kostnem mozgu pri ljudeh vseh starosti, pa tudi v popkih novorojenčkov. Matične celice iz vseh treh virov se lahko uporabljajo tudi za zdravljenje različnih bolezni, vključno z levkemijo, limfomom, odpovedjo kostnega mozga in različnimi imunskimi motnjami¹⁹.

Rdeče krvne celice ali eritrociti s kisikom oskrbujejo vse telesne celice. Vsebujejo hemoglobin (rdeče krvno barvilo), ki veže kisik, ogljikov dioksid in druge koristne ali škodljive pline, medtem ko bele krvne celice ali levkociti igrajo glavno vlogo pri obrambi organizma pred okužbami in ustvarjanju odpornosti s pomočjo protiteles. Krvne ploščice ali trombociti so odgovorni za strjevanje krvi skupaj s faktorji strjevanja, ki se nahajajo v plazmi. V rani, ki krvavi, se v nekaj minutah naredi strdek, ki tako zaustavi krvavitev²⁰.

3.5.1 Eritrociti

Eritrociti ali rdeče krvničke so krvne celice, ki s svojim delovanjem oskrbujejo telo s kisikom. Morfološko gledano so to sploščene celice v velikostnem razponu med 7 in 8 μm . Skoraj 33 % prostornine v njih zavzema hemoglobin, ki je ključen za prenos dihalnih plinov. Eritrociti nastanejo iz krvotvornih matičnih celic, ki tekom razvoja izgubijo jedro in organele²⁰. Metabolni

procesih, kot na primer tvorba ogljikove kisline iz vode ali tvorba ATP, v eritrocitu potekajo s pomočjo encimov. Zreli eritrociti zaradi odsotnosti jedra in preostalih organelov ne morejo sami obnavljati zaloge encimov in beljakovin, zaradi česar je življenjska doba celice v povprečju med 80 do 120 dni²¹.

Za eritrocite je značilno, da se lastnosti njihovih membran odražajo na obliki celotne celice, saj eritrocit nima niti notranjega citoskeleta, ki bi mu določal obliko. Eritrocit ima na celično membrano z notranje strani s posebnimi proteini pripeto proteinsko mrežo, ki ji pravimo membranski skelet. Ker se ta skoraj povsod prilega fosfolipidni dvojni plasti, ga lahko pri biofizikalnem opisu obravnavamo kot tretjo plast membrane. Fosfolipidni dvosloj in citoskelet skupaj dajeta membrani elastične in pretočne lastnosti, ki vplivajo na deformacijo eritrocitov v krvnem toku²². Ker ima eritrocitna membrana majhen elastični modul upogibanja, se eritrocit s spremembo svoje oblike enostavno prilagodi spremenjenim pogojem v okoliški raztopini. Takšna zgradba mu omogoča, da se njegova oblika optimalno prilagaja ozkim kapilaram, skozi katere potuje, kar je njegova ključna lastnost. Premer eritrocitov je namreč večji od premera kapilar v mikrocirkulatornem sistemu²², le dovolj velika elastičnost in primerno osmotsko ravnovesje pa jim omogočata, da nemoteno prehajajo skozi kapilarni sistem. Pomembno je, da ima eritrocitna celica pri dani prostornini na voljo dovolj membrane, kar je določeno z osmotskim ravnovesjem. Ker membrana slabo prenaša raztezanje, se pod preveliko obremenitvijo z lahko raztrga, kar pomeni, da pride do hemolize²¹.

3.6 METODE IN TEHNIKE RAZISKOVALNEGA DELA

3.6.1 Mikroskopija

Da bodo analize in dobljeni rezultati kar se da razumljivi in točni, se bomo med izvajanjem raziskovalnega dela poslužili mikroskopiranja. Ker v delu obravnavamo strukture različnih velikosti, je nujno potrebno, da uporabimo več različnih tipov mikroskopov. V pričujočem delu bomo uporabljali predvsem invertno svetlobno mikroskopijo ter vrstični elektronski mikroskop (angl. *Scanning Electron Microscope* – SEM).

Invertno mikroskopijo uporabljamo pri analizah celičnih kultur, ko so celice gojene v nadzorovanih pogojih. Invertni mikroskop nam omogoča opazovanje celic v gojišču v realnem času. Preparat je osvetljen od zgoraj. Zaradi lažjega mikroskopiranja se objektiv nahajajo pod mizico in tako višina gojišča ne ovira izostrovanja slike tudi pri večjih povečavah in manjših delovnih razdaljah²³.



Slika 4: Invertni svetlobni mikroskop (Vir: Last avtorjev in mentorjev).

SEM za opazovanje površine vzorca uporablja elektronski curek. S pomočjo tovrstne mikroskopije ugotavljamo predvsem morfologijo, po želji pa tudi elementno sestavo proučevanega vzorca. Opazujemo lahko zgradbo predmetov, prisotnost sekundarnih snovi, poškodbe materiala, velikost in obliko posameznih zrn^{24,25}. Vzorec pri mikroskopiranju s SEM obstreljujemo s snopom elektronov. Ko elektronski snop trči ob vzorec, nastanejo odbiti, sekundarni in Augerjevi elektroni ter elektromagnetni valovi v ultravijoličnem in rentgenskem delu spektra, ki jih detektiramo. SEM omogoča večje povečave od invertnega mikroskopa, od 20000- do 300000-krat²⁴.

3.6.2 Določanje koncentracije PM

Vzorčenje PM delcev iz zraka je potekalo z nizko-volumskim PMx sekvenčnim vzorčevalnikom²⁶. Meritev temelji na zbiranju frakcije delcev v zunanjem zraku na ustrezni filter in gravimetričnem določanju mase naloženega materiala²⁶. Z vzorčevalnikom lahko izvajamo meritve delcev PM₁₀ ali PM_{2,5}. Glede na velikost delcev, ki jih želimo vzorčiti, v vzorčevalno glavo namestimo ustrezne šobe²⁷.

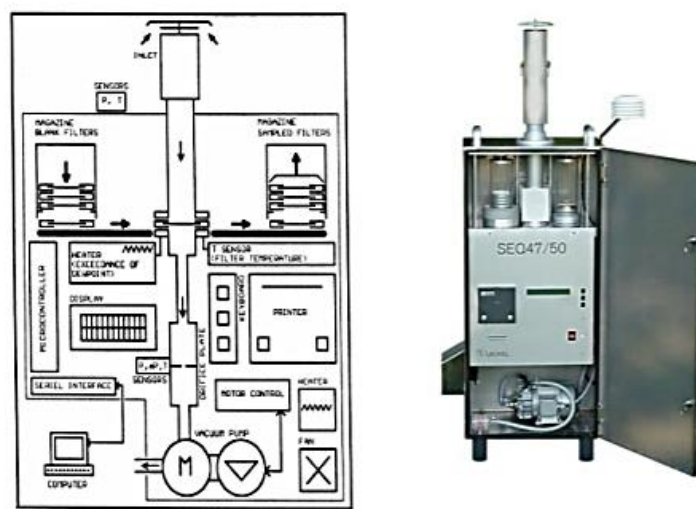
Vzorčevalnik je sestavljen iz ohišja iz nerjavečega jekla, v katerem je nameščena vakuumska črpalka z nastavljivim pretokom, tuba z nastavki za čiste filtre in termostatisirana tuba, kjer se zbirajo že vzorčeni filtri. Zunaj ohišja sta nameščena senzorja za merjenje temperature in atmosferskega tlaka²⁷. Vzorčevalnik je namenjen zunanjim meritvam pri vseh temperaturah in pogojih okolja. V tubo lahko vstavimo do 21 filtrov, ki jih vzorčevalnik sam menja ob nastavljenem datumu in uri. Najmanjši čas vzorčenja na enem filtru je 1 ura, najvišji pa 168 ur. Pretok zraka skozi vzorčevalnik je majhen, da ne pride do izgube lahkohlavnih snovi²⁸. Podatki se zapisujejo na spominski čip, ki

si zabeleži tudi podatke o realnem pretoku zraka, uri in datumu menjave filtra, zunanji temperaturi in tlaku ter o temperaturi znotraj vzorčevalnika²⁸.

3.6.3 Spektrometer za štetje submikronskih delcev

Spektrometer za štetje submikronskih delcev (angl. *Scanning Mobility Particle Sizer – SMPS*) meri velikost nanodelcev v aerosolu ozračja v realnem času. Z njim analiziramo submikronske nanodelce, in sicer njihovo številčno koncentracijo in velikostno distribucijo v zraku. Zanj je značilna izredno visoka ločljivost, natančnost ter hitro skeniranje. SMPS sestavljata dva funkcionalna dela; elektrostatski ločevalnik delcev z diferencialno-mobilnostnim analizatorjem ter števec delcev na osnovi kondenzacije. Zrak najprej potuje skozi silikagel, kjer se odstranijo vse molekule vode – delci iz zraka se popolnoma posušijo. Suhi delci v nadaljevanju potujejo skozi impaktor, ki prepusti zgolj delce manjše od določene velikosti. Na koncu se delci v električnem polju ločijo glede na razmerje med velikostjo in električnim nabojem. Po končanem procesu delci točno določene velikosti potujejo v drugi del inštrumenta²⁹. Števec delcev deluje s pomočjo optičnega laserskega merilnika. Ker so delci premajhni, da bi jih laser lahko zaznal, najprej potujejo v komoro s hlapi butanola. Tam butanol kondenzira na površini delcev in povzroči povečanje njihove prostornine do velikosti, ki jih laser lahko detektira. En merilni cikel traja 10 minut. Rezultat izrazimo kot porazdelitev števila delcev v posameznih velikostnih razredih²⁹.

Spektrometer se na splošno uporablja pri raziskavah aerosolov, tako v nanotehnologiji kot pri raziskavah ozračja in podnebja. Poleg omenjenega se uporablja tudi pri ugotavljanju kakovosti zraka v bivanjskih in industrijskih prostorih ter za karakterizacijo prahov oz. drugih aerosolov in testiranje filtrov²⁹.



Slika 5: Zgradba spektrometra SMPS (Vir: Meritve delcev PM₁₀ na merilnem mestu Hrastnik²⁸).

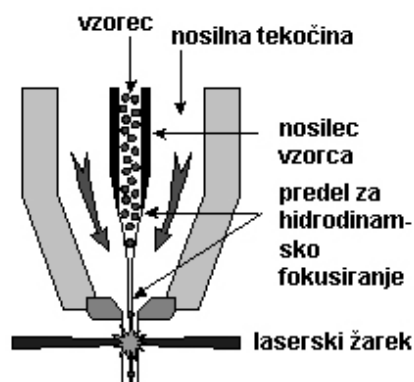
3.6.4 Pretočna citometrija

Pretočna citometrija je tehnika, s katero merimo in analiziramo lastnosti posameznih celic, ki v suspenziji ena za drugo potujejo skozi pretočni citometer, mi pa jih medtem osvetljujemo z ozkim snopom laserske svetlobe. V eni sekundi lahko analiziramo več tisoč celic, kar nam da zanesljivo podobo o njihovih fizikalnih in biokemijskih lastnostih. Ko svetlobni žarek zadane ob celico, se odbije, lomi ali pa se absorbira v fluorokromih (fluorescenčni proteini), ki jih predhodno vezemo na celice. Celica z vezanim fluorokromom nato oddaja svetlobo daljše valovne dolžine, ki jo detektiramo³⁰.

Sodobni citometer lahko analizira več tisoč delcev vsako sekundo, hkrati pa jih ločuje glede na določeno lastnost delca. Vsak pretočni citometer je sestavljen iz naslednjih enot:

1. enega ali več virov svetlobe določene valovne dolžine,
2. hidrodinamskega sistema, ki omogoča kontroliran pretok posameznih celic skozi merilno enoto,
3. detekcijskega sistema, ki zazna sprejeto svetlobo in
4. računalniškega sistema, ki izmerjeno svetlobo na detektorju spremeni v signal³⁰.

Merimo lahko sipanje svetlobe na celicah, pri čemer dobimo informacijo o velikosti in zrnatosti posamezne celice. Poleg navedenega lahko merimo s celic oddano fluorescenčno svetlobo, ki je posledica vezave specifičnih, s fluokromom označenih protiteles na opazovane celične označevalce. S kombiniranjem dobljenih podatkov lahko v vzorcu ločimo posamezne populacije celic, določimo njihov delež ali pa opazujemo specifični marker le na določeni populaciji celic. Z uporabo specializiranih pretočnih citometrov, imenovanih celični ločevalci, lahko posamezne populacije celic za nadaljnjo obdelavo tudi izoliramo. Večje število laserjev in fluorescenčnih detektorjev omogoča hitrejšo analizo delcev.



Slika 6: Shema pretočnega citometra (Vir: Uporaba pretočne citometrije za preučevanje mehanizmov toksičnosti³¹).

Sprva so bili pretočni citometri eksperimentalne naprave, kasneje pa so jih zaradi tehnološkega razvoja izboljšali in jih začeli uporabljati za klinične in raziskovalne namene³². Tradicionalna pretočna citometrija je bila prva metoda, ki je omogočala analizo večje populacije preiskovanih objektov v razmeroma kratkem času. Ima veliko statistično moč in daje dobro predstav o fizikalnih in kemijskih lastnostih celice, a je njena glavna pomanjkljivost nezmožnost pridobivanja slik preiskovanih celic. Pretočna citometrija s sočasnim zajemom slike, poznana tudi kot multispektralna slikovna pretočna citometrija, predstavlja novo močno orodje v celični biologiji. Je hibridna tehnika, ki združuje lastnosti klasične pretočne citometrije s prednostmi sodobne fluorescenčne mikroskopije, saj omogoča natančne objektivne analize preiskovanih objektov (celic) s hkratno visoko prostorsko ločljivostjo³².

Za razliko od klasične pretočne citometrije je *ImageStream* slikovni citometer zasnovan tako, da lahko sočasno posname do 12 različnih slik posamezne celice (na 12 kanalih na detektorju) neposredno v toku tekočine in s hitrostjo do 5000 slik na sekundo. S slikovno pretočno citometrijo lahko zelo natančno določimo lokacijo proteinskih struktur in organelov znotraj celice. Omogoča multiparametrične analize, s katerimi lahko hitro in učinkovito karakteriziramo obliko, velikost, granuliranost, teksturo, intenzivnost fluorescence in druge lastnosti posameznih celic znotraj večmilijonske populacije³².

3.7 CILJ RAZISKOVALNEGA DELA

Z namenom doprinosa k razumevanju problematike onesnaževanja okolja in vpliva onesnaževalcev na življenje ljudi je bil cilj raziskovalnega dela proučiti vpliv lebdječih PM delcev na membrane eritrocitov človeške krvi. Z raziskovanjem smo želeli postaviti tudi osnovno metodologijo, s katero bomo lahko v nadaljevanju proučevali vpliv izolatov delcev iz zraka na različne celice in na podlagi odzivov sledili njihovim učinkom na človeško telo.

Ker predstavljajo meritve kakovosti zraka pomembno izhodišče za naše delo, smo s PM vzorčevalnikom v poletnem in jesenskem obdobju na filtre lovili delce PM_{2,5}. Sočasno smo z SMPS določevali številčno ter masno porazdelitev submikronskih delcev v zraku in na ta način ovrednotili raven onesnaženja zraka z zdravju najbolj škodljivimi delci v Ljubljani.

V drugem delu raziskovanja smo eritrocite človeške krvi izpostavili modelnim delcem PM₁₀. Z invertno svetlobno mikroskopijo in dopolnilno z analizo SEM smo spremljali spreminjanje oblike eritrocitnih membran, da bi podrobno proučili razsežnost vpliva proučevanih delcev na krvne eritrocite.

3.8 HIPOTEZI

Skozi raziskovalno delo sta nas vodili dve glavni hipotezi.

1. Predvidevamo, da bo poletni koncentracija delcev $PM_{2,5}$ skladna z mejno letno vrednostjo, ki je definirana s strani WHO. Nadaljnje predvidevamo, da bo koncentracija omenjenih delcev v jesenskem času bistveno višja od koncentracije, ki bo določena v poletnem času.
2. Predvidevamo, da delci PM_{10} pomembno vplivajo na preživetje eritrocitov in njihovo obliko. Glede na 1-, 8- in 24-urno izpostavitve (tretiranje) eritrocitov delcem pričakujemo najvišji učinek delovanja delcev na eritrocite v primeru 24-urne izpostavitve.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 MATERIALI IN PRIPOMOČKI

4.1.1 Analiza PM delcev iz zraka

Material:

- etanol, C₂H₅OH (absolutni, Sigma-Aldrich)
- butanol, C₄H₉OH (brezvodni, 99,8 %, Sigma-Aldrich)
- silikagel, SiO₂ (Silica Gel 70-230 *Mesh*, visoke analitske čistosti, velikost por: 60 Å, Sigma-Aldrich)

Pripomočki in inventar:

- spektrometer za štetje submikronskih delcev (SMPS), *TSI SMPS Spectrometer 3936L75*
- nizkovolumski sekvenčni vzorčevalnik PM (PM₁/PM_{2,5}/PM₁₀), *Dado lab Giano sequential PM_x sampler*
- kvarčni filtri, *PALL Life sciences, USA, premer 47 mm*
- mikroanalizna tehtnica (v specialni klimatizirani tehtalnici), *Sartorius micro M3P*
- 100 mg utež za kalibriranje mikro-analizne tehtnice
- Sterilen plastičen pribor (pinceta, shranjevalniki filtrov)

4.1.2 Vpliv PM delcev na membrane eritrocitov

Material:

- Biološko gradivo – kri, odvzeta starejši osebi, ki je vodila raziskavo (mentor)
- Sterilno hranjen prah podoben PM₁₀ delcem (ERM – CZ100 PM₁₀, angl. *fine dust*)
- Fosfatno-citratni pufer (PBS) s pH vrednostjo 7,4 pripravljen iz:
 - o 137 mM natrijevega klorida (NaCl, *p. a.* trdni reagent, Sigma-Aldrich)
 - o 2,68 mM kalijevega klorida (KCl, *p. a.* trdni reagent, Sigma-Aldrich)
 - o 10,14 mM natrijevga hidrogenfosfata(V) (pripravljenega iz kristalohidrata Na₂HPO₄ × 2 H₂O, *p. a.* reagenta, Sigma-Aldrich)
 - o 1,84 mM kalijevega dihidrogenfosfata(V) (KH₂PO₄, brezvodni, *p. a.* reagent s kemijsko čistostjo ≥ 99,0 %, Sigma-Aldrich)

o 10,9 mM natrijev citrat (pripravljen iz kristalohidrata $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, reagent *analitske kakovosti*, Carlo Erba Reagents, in nato filtriran skozi filtre s prepustnostjo do 0,2 mikrona Chromafil RC-20/25 (Macherey-Nagel GmbH, Nemčija))

- imerzijsko olje za mikroskopijo (Nikon, tip N, 50 cc)

Pripomočki in inventar:

- invertni svetlobni mikroskop Eclipse TE2000-S (Nikon EM CCD), Tokio, Japonska, sklopljen s sistemom digitalnih kamer Spot boost (Visitron Systems)
- objektivna stekla (Brand)
- štiri-prekatne eksperimentalne kamrice za mikroskopijo (26 mm \times 43 mm, CoverWell™ perfusion chambers, PC4L-0.5, Grace Bio-Labs, Sigma-Aldrich)
- avtomatske pipete (20, 100, 1000 μL ; Eppendorf Research)
- konice za pipete (100, 1000 μL ; Merck)
- sterilne epice (Ratiolab)

4.2 MERJENJE DELCEV PM IZ ZRAKA

Na ustrezne filtre smo s pomočjo PM vzorčevalnika vzorčili PM delce iz zraka. Delovni filtri so narejeni iz kvarčnih vlaken. Kvarc oz. kremen je polimorfna modifikacija silicijevega dioksida (SiO_2) in je eden najpogostejših mineralov v naravi. Filtre s premerom 47 mm smo obremenili s konstantnim pretokom zraka skozi vzorčevalnik, in sicer 2,3 m^3/h v času 24 h.

Filtre smo izpostavljali zunanjemu zraku na območju Kemijskega inštituta v Ljubljani in spremljali sestavo zraka vsak dan posebej od 9. 8. 2020 do 15. 8. 2020 ter od 22. 11. 2020 do 28. 11. 2020. Z namenom natančne določitve razlike v teži posameznega filtra pred in po vzorčenju smo vsak filter posebej stehali že pred samim vzorčenjem. Na omenjeni način smo določili maso na filter odloženih PM delcev v 24 h izpostavitve. Pred uporabo smo filtre predhodno 4 ure žgali na 450 $^{\circ}\text{C}$, pri tem smo odstranili vse morebitne organske nečistoče.

4.2.1 Tehtanje filtrov

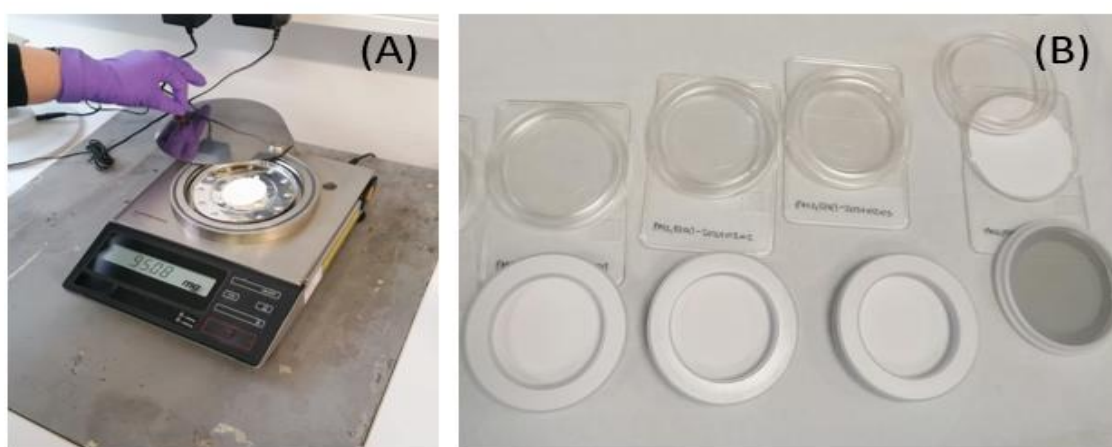
Tehtanje poteka v posebni klimatizirani sobi (tehtalni prostor), v kateri so konstantno nadzorovani zunanji delovni pogoji (20 $^{\circ}\text{C}$ in 45 % relativna vlažnost zraka – R_h). Pri delu rokujemo s tehtnico, ki je posebej namenjena tehtanju filtrov. V sobi za tehtanje filtre najprej kondicioniramo najmanj

24 ur, s čimer zagotovimo, da se popolnoma prilagodijo na pogoje v sobi. Šele po 24 urah pričnemo s tehtanjem.

Pred začetkom tehtanja je potrebno tehtnico umeriti. Najprej stehamo 100 μg utež, s pomočjo katere zagotovimo ustreznost umeritve tehtnice. Sledi tehtanje filtrov.

Vsak čist filter stehamo trikrat in si vsakič zapišemo njegovo težo ter napako tehtanja. Pri podajanju rezultatov upoštevamo povprečno maso filtra in predpisano napako. Ko filter stehamo, ga shranimo v plastičen vsebnik in ustrezno označimo.

Vsebnike označujemo po že vnaprej določenem redu: ime vzorca – leto.mesec.dan (primer: $PM_{2,5}(Q) - 20210118$).



Slika 7: (A) Tehtnica za tehtanje filtrov. (B) Označeni plastični vsebniki za filtre in nosilci za vzorčenje (Vir: Last avtorjev in mentorjev).

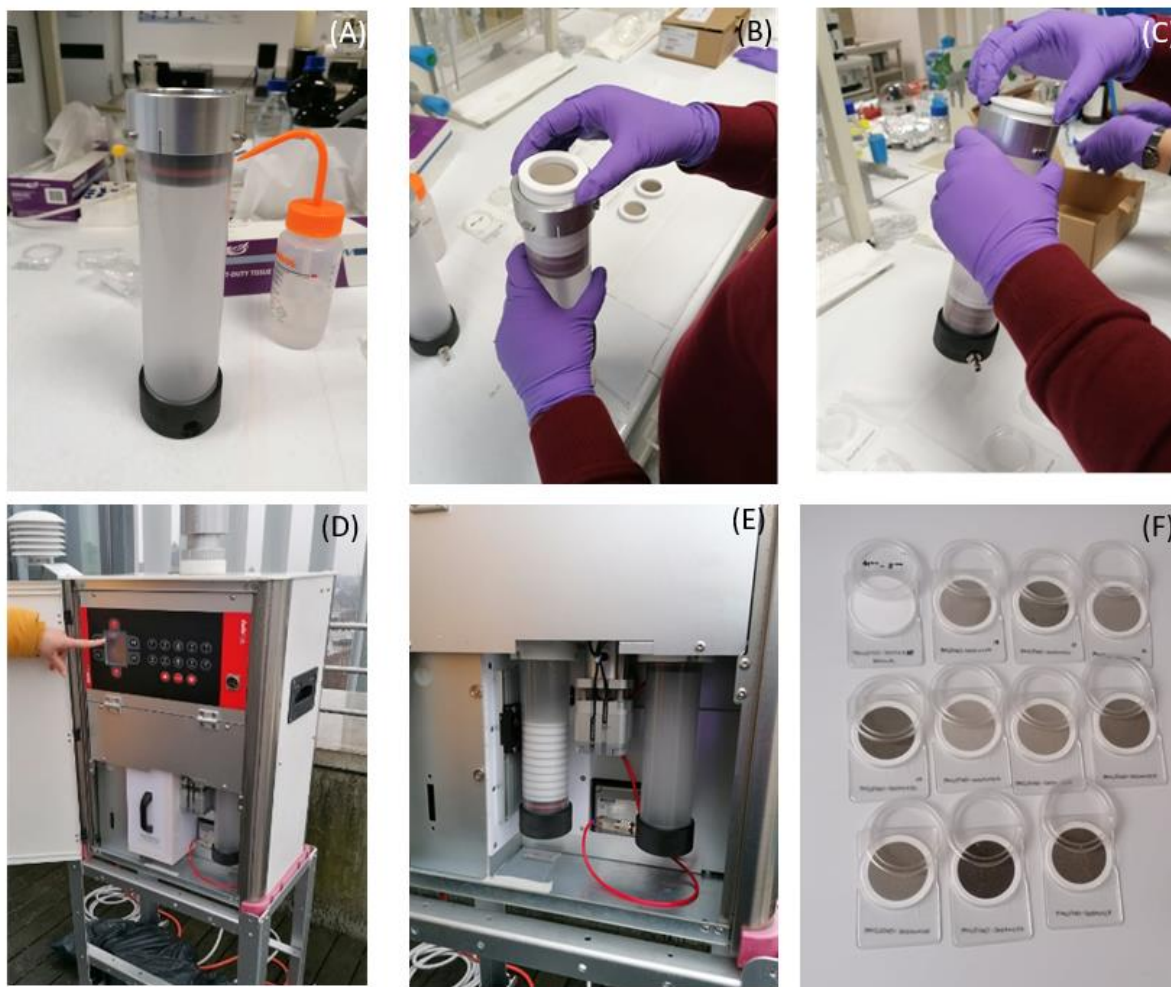
4.2.2 Vzorčenje PM

Nosilce za filtre je potrebno pred in po uporabi očistiti z etanolom. Pri vstavljanju čistih filtrov v nosilce za vzorčenje med zgornji in spodnji del nosilca vstavimo še podložko v debelini filtra. Podložka služi kot distančnik, saj so filtri zelo krhki in jih sile, katerim so izpostavljeni v vzorčevalniku, lahko poškodujejo. Nosilce s filtri vstavimo v tubo, in sicer po sistemu, da je spodaj filter z najkasnejšim datumom vzorčenja.

Tubo namestimo v PM vzorčevalnik in nastavimo program vzorčenja. V vzorčevalniku sta dve poziciji za filtre. Na desno pozicijo vstavimo tubo s čistimi filtri, na levo pa prazno tubo za vzorčene filtre. Vsak posamezen filter se je vzorčil 24 ur pri pretoku zraka $2,3 \text{ m}^3/\text{h}$.

Po končanem postopku vzorčenja filtre vzamemo iz vzorčevalnika in jih znova pustimo kondicionirati v klimatiziranem tehtalnem prostoru 24 ur. Med kondicioniranjem jih pokrijemo s plastičnim pokrovom, da jih zaščitimo pred svetlobo in preostalimi zunanjimi dejavniki. Filtre

znova stehamo po zgoraj opisanem postopku. Po tehtanju filtre ponovno shranimo v že prej označene plastične vsebnike.



Slika 8: (A) Tuba za vzorčenje. (B) in (C) Vstavljanje nosilcev v tubo za vzorčenje. (D) PM vzorčevalnik. (E) Tubi s filtri med vzorčenjem v PM vzorčevalniku. (F) Filtri po vzorčenju (Vir: Last avtorjev in mentorjev).

4.2.3 Analiza delcev z SMPS

Zunanji zrak smo istočasno sesali tudi v SMPS, kjer smo ga sproti analizirali po principu delovanja inštrumenta (poglavje 3.6.3). Pred merjenjem smo posušili v inštrumentu dehidrirani silikagel in s tem pripravili SMPS na analitsko merjenje. Merilno območje SMPS zajema velikosti delcev od 14,1 do 736,5 nm. En merilni cikel, v katerem inštrument pomeri vse delce v nastavljenem merilnem območju, je znašal 10 minut.

4.3 VPLIV PM DELCEV NA MEMBRANE ERITROCITOV

Prah ERM – CZ100 PM₁₀ smo uporabili kot standardni evropski referenčni material za delce PM₁₀. Za potrebe raziskave smo v sterilnih okoliščinah (laminarij) pripravili njegovo suspenzijo v koncentracijah 50, 100 in 200 µg/mL (uporaba sterilne deionizirane vode).

V ta namen smo pripravili založno suspenzijo delcev PM₁₀ s koncentracijo 20 mg/mL, ki smo jo v nadaljevanju dodajali v ustrezno nizkih odmerkih v delovno raztopino krvi oz. delovni pufer za kontrolo.

4.3.1 Morfološki pregled vzorcev

Po 1, 8 in 24 h tretiranja posameznega vzorca smo pred vsako meritvijo na pretočnem citometru opravili še morfološki pregled.

Morfološki pregled vzorcev krvi, delcev PM₁₀ in njihovih mešanic smo opravili z invertnim svetlobnim mikroskopom pri 100× povečavi z uporabo imerzijskega olja. Po 200 µL razredčene krvi, suspenzije delcev in mešanice delcev PM₁₀ s krvjo smo odpipetirali v eksperimentalne kamrice, ki omogočajo učinkovito analizo in analitičen zajem slike pod mikroskopom.

4.3.2 Priprava eritrocitov za študij vpliva delcev PM₁₀

Pripravo vzorca eritrocitov smo sledili s pomočjo pretočne citometrije. Zaradi porazdelitve delcev in opazovanja pod mikroskopom smo za izvedbo študije uporabili vzorec, ki je imel v eritrocitni regiji okvirno $1,0 \times 10^6$ celic (dogodkov)/µL. Na podlagi predhodnih izkušenj smo v 20,0 mL fosfatno-citratnega pufru (PBS) odpipetirali 50 µL sveže odvzete krvi, vsebino homogenizirali in ponovno izmerili koncentracijo celic.

4.3.3 Proučevanje vpliva delcev PM₁₀ na eritrocite

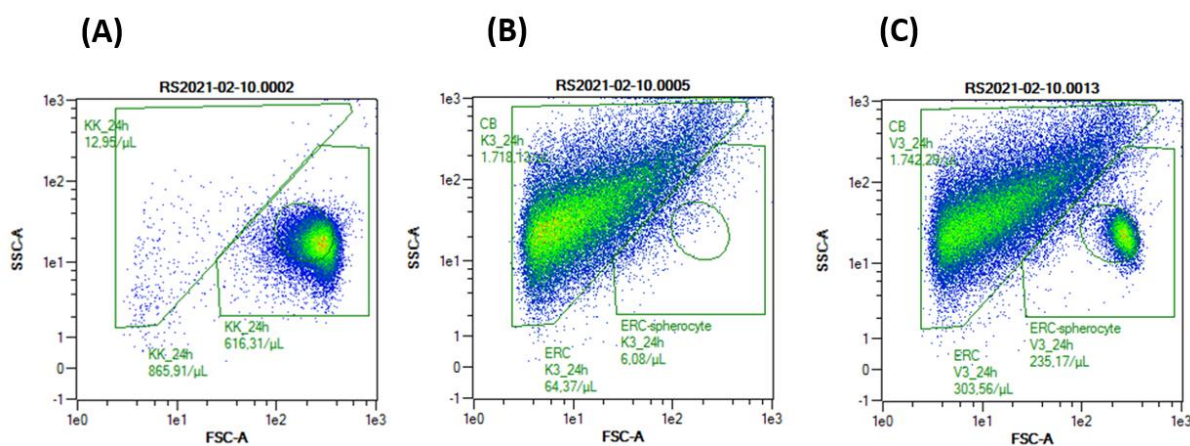
V predhodno sterilizirane 1 mL epice odpipetiramo:

1. Kontrola kri: 1,0 mL razredčene krvi z izmerjeno koncentracijo eritrocitov.
2. Kontrola pufer: 1,0 mL fosfatno-citratnega pufru (PBS).
3. Kontrola 1 (delci s koncentracijo 50 µg/mL): v 1,0 mL PBS smo suspendirali 2,5 µL založne suspenzije delcev PM₁₀ s koncentracijo 20 mg/mL.
4. Kontrola 2 (delci s koncentracijo 100 µg/mL): v 1,0 mL PBS smo suspendirali 5,0 µL založne suspenzije delcev PM₁₀ s koncentracijo 20 mg/mL.

5. Kontrola 3 (delci s koncentracijo 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$): v 1,0 mL PBS smo suspendirali 10,0 μL založne suspenzije delcev PM_{10} s koncentracijo 20 mg/mL .
6. Vzorec 1 (kri in delci PM_{10} s koncentracijo 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$): v 1,0 mL razredčene krvi smo suspendirali 2,5 μL založne suspenzije delcev PM_{10} s koncentracijo 20 mg/mL .
7. Vzorec 2 (kri in delci PM_{10} s koncentracijo 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$): v 1,0 mL krvi smo suspendirali 5,0 μL založne suspenzije delcev PM_{10} s koncentracijo 20 mg/mL .
8. Vzorec 3 (kri in delci PM_{10} s koncentracijo 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$): v 1,0 mL krvi smo odpipetirali 10,0 μL založne suspenzije delcev PM_{10} s koncentracijo 20 mg/mL .

Vzorci, tretirani z delci PM_{10} , smo pripravili v treh paralelkah.

Pripravljenim vzorcem smo po 1, 8 in 24 h tretiranja kvantitativno, s pomočjo pretočne citometrije, določili vsebnost eritrocitov. Po 1 uri tretiranja smo pripravljene vzorce (najprej kontrole nato tretirani vzorci) prvič analizirali in s prvimi meritvami v metodi tudi definirali regije za detekcijo. Zaznali smo 3 regije: populacijo delcev PM_{10} ter eritrocitno in sferocitno regijo. Rezultate meritev smo prenesli v programski paket *Microsoft Excell 2013* in jih za potrebe interpretacije statistično obdelali.



Slika 9: Primer razsevnega diagrama po 24 urah: (A) razredčena kri, (B) delci PM_{10} s koncentracijo 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in (C) tretirani vzorec krvi s koncentracijo delcev PM_{10} 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Trikotna oblika regije v zgornjem levem kotu predstavlja območje sipanja delcev PM_{10} , oznaka CB. Območje, ki spominja na obliko pravokotnika zajema območje eritrocitne (ERC) regije in območje v osrednjem delu (krog, ERC-spherocyte) na sferocitne oblike eritrocitov.

5. REZULTATI

5.1 REZULTATI ANALIZ PM DELCEV

5.1.1 Rezultati vzorčenja s PM vzorčevalnikom

Masne koncentracije PM_{2,5} v zraku, ki so podane v Tabeli 1 (poletje 2020) in Tabeli 2 (jesen 2020), smo izračunali po spodaj navedeni enačbi:

$$\gamma \left[\frac{\mu g}{m^3} \right] = \frac{m [\mu g]}{V [m^3]} = \frac{m [\mu g]}{t [h] \times \Phi \left[\frac{m^3}{h} \right]}$$

γ	masna koncentracija
m	masa PM _{2,5}
V	volumen prefiltriranega zraka
t	čas vzorčenja
Φ	pretok zraka

V tabeli 1 so prikazani podatki poletne kampanje, ki je potekala od 9. 8. 2020 do 15. 8. 2020. Po vzorčenju s PM vzorčevalnikom smo določili maso nanosa PM_{2,5} in izračunali masno koncentracijo delcev v zraku ter relativno napako podali glede na absolutno.

Največja napaka na mikroanalizni tehtnici je znašala $\pm 20 \mu g$. Ker smo vsak filter tehtali pred in po vzorčenju ter maso PM določili z odštevanjem, smo pri končnem rezultatu napako upoštevali dvakrat in določili absolutno napako mase PM_{2,5} pri $\pm 40 \mu g$.

Relativno napako sva izrazili po formuli: $X = \bar{x} \pm \Delta x = \bar{x} \left(1 \pm \frac{\Delta x}{\bar{x}} \right)$

x	relativna napaka
\bar{x}	aritmetična sredina
Δx	absolutna napaka

Tabela 1: Količina delcev PM_{2,5} – poletje.

Št. vzorca	Datum	Vzorec	Čas	Masa ₁ [μg]	Masa ₂ [μg]	Masa PM _{2,5} : $m_2 - m_1$	Masna koncentracija: γ [μg/m ³]	Rezultat z napako [μg/m ³]
1	9. 8. 2020	PM2.5(Q)- 20200809	12:00- 12:00	112190	113740	1550	28,08	28,08 (1 ± 0,03)
2	10. 8. 2020	PM2.5(PC)- 20200810	12:00- 12:00	88670	89880	1210	20,52	20,52 (1 ± 0,04)
3	11. 08. 2020	PM2.5(Q)- 20200811	12:00- 12:00	113680	114890	1210	21,92	21,92 (1 ± 0,04)
4	12. 8. 2020	PM2.5(Q)- 20200812	12:00- 12:00	113990	115050	1060	19,20	19,20 (1 ± 0,04)
5	13. 8. 2020	PM2.5(Q)- 20200813	12:00- 12:00	113280	114800	1520	27,54	27,54 (1 ± 0,03)
6	14. 8. 2020	PM2.5(Q)- 20200814	12:00- 12:00	114970	116130	1160	20,53	20,53 (1 ± 0,04)
7	15. 8. 2020	PM2.5(Q)- 20200815	12:00- 12:00	113650	114820	1170	21,20	21,20 (1 ± 0,04)

V tabeli 2 so prikazani podatki jesenske kampanje, ki je potekala 22. 11. 2020 – 28. 11. 2020. Podatke smo obravnavali po istem postopku, kot je opisan za Tabelo 1.

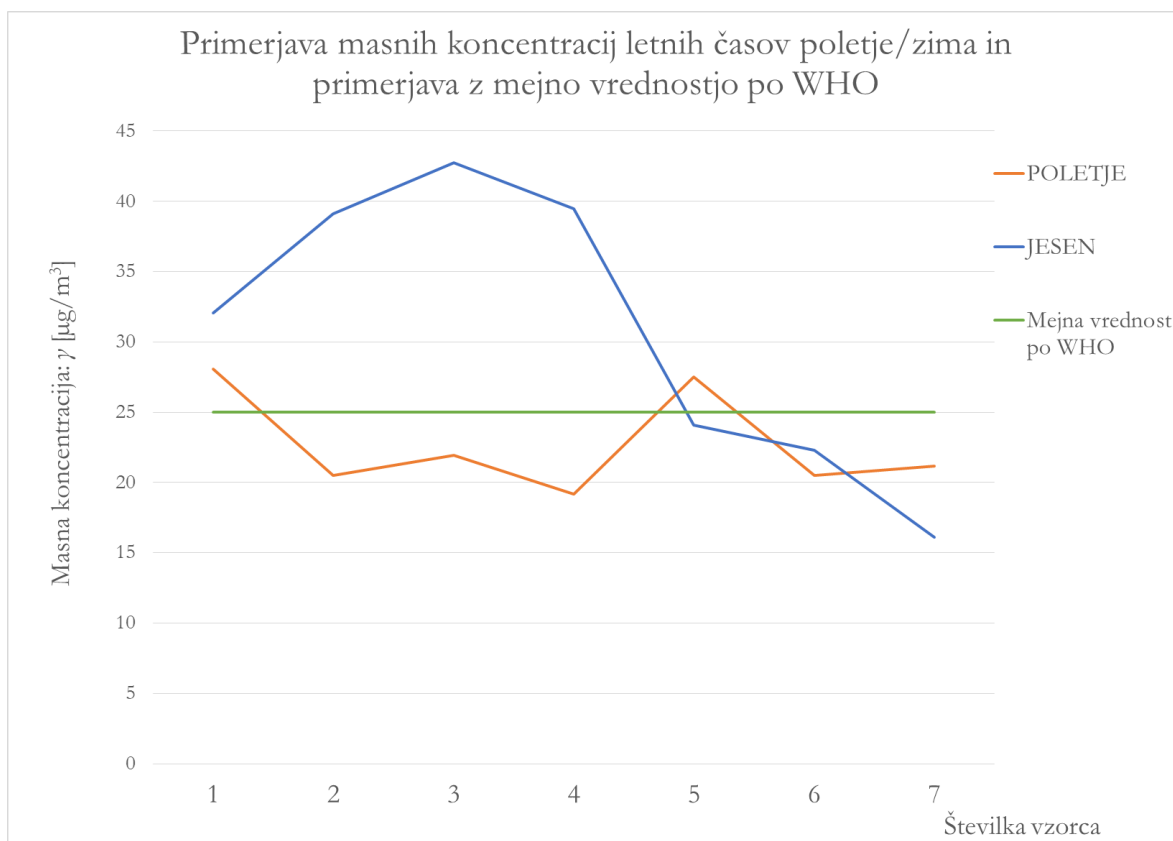
Tabela 2: Količina delcev PM_{2,5} – jesen.

Št. vzorca	Datum	Vzorec	Čas	Masa ₁ [μg]	Masa ₂ [μg]	Masa PM _{2,5} : $m_2 - m_1$	Masna koncentracija: γ [μg/m ³]	Rezultat z napako [μg/m ³]
1	22. 11. 2020	PM2,5(Q)-20201122	12:00-12:00	115750	117520	1770	32,07	32,07 (1 ± 0,03)
2	23. 11. 2020	PM2,5(Q)-20201123	12:00-12:00	115460	117620	2160	39,13	39,13 (1 ± 0,02)
3	24. 11. 2020	PM2,5(Q)-20201124	12:00-12:00	116940	119300	2360	42,75	42,75 (1 ± 0,02)
4	25. 11. 2020	PM2,5(Q)-20201125	12:00-12:00	116610	118790	2180	39,49	39,49 (1 ± 0,02)
5	26. 11. 2020	PM2,5(Q)-20201126	12:00-12:00	115660	116990	1330	24,09	24,09 (1 ± 0,03)
6	27. 11. 2020	PM2,5(Q)-20201127	12:00-12:00	115670	116900	1230	22,28	22,28 (1 ± 0,04)
7	28. 11. 2020	PM2,5(Q)-20201128	12:00-12:00	116390	117280	890	16,12	16,12 (1 ± 0,05)

Graf 1 prikazuje masne koncentracije PM_{2,5} poletne in jesenske kampanje. Iz grafa je razvidno, da so masne koncentracije delcev v zraku poleti večinoma nižje kot jeseni.

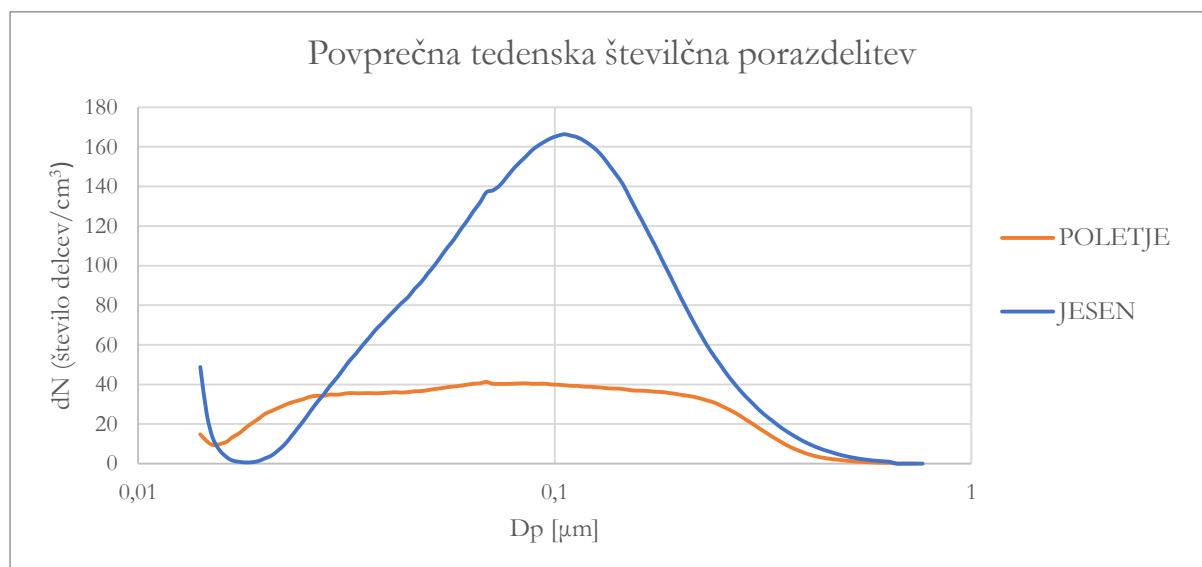
Povprečna masna koncentracija delcev PM v zraku je poleti znašala 22,71 μg/m³, jeseni pa 30,85 μg/m³. Povprečna masna koncentracija delcev v zraku je bila jeseni 36 % višja kot poleti.

Graf 1: Primerjava masnih koncentracij – poletje/jesen in primerjava z mejno vrednostjo po WHO.



5.1.2 Rezultati analiz SMPS

Graf 2: Primerjava povprečne tedenske številčne porazdelitve – poletje/jesen.



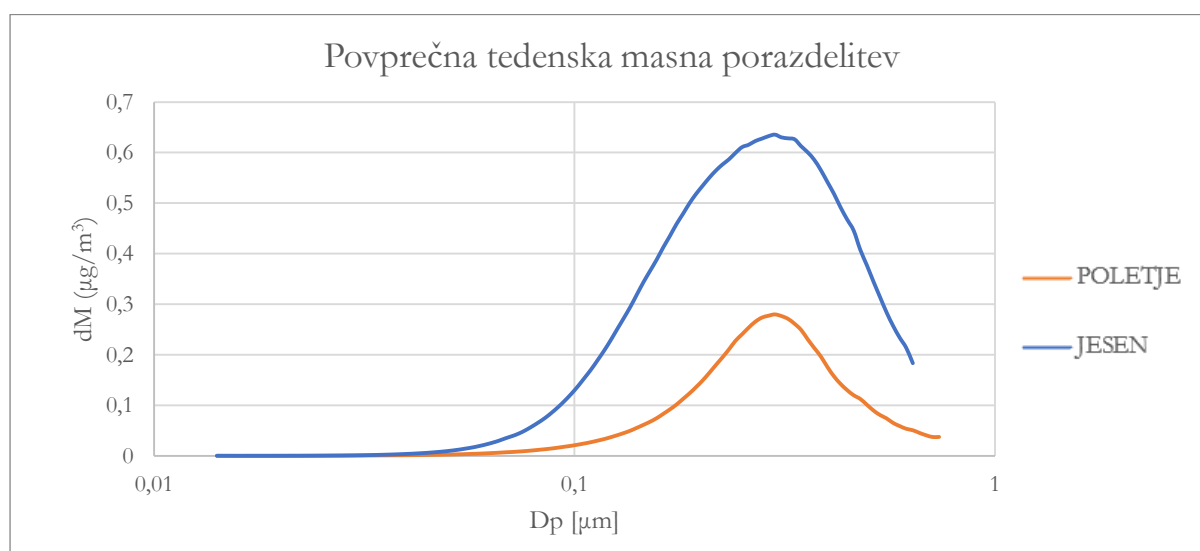
Graf 2 podaja primerjavo povprečne tedenske številčne porazdelitve nanodelcev med poletno in jesensko kampanjo. Iz grafa je razvidno, da je najvišja tedenska številčna koncentracija delcev poleti bistveno nižja od tedenske številčne koncentracije delcev jeseni. Jeseni je bila vrednost najvišje številčne koncentracije kar 400 % višja od vrednosti najvišje številčne koncentracije poleti.

Krivulja na grafu poletnih meritev postopoma narašča do vrednosti približno 35 delcev/cm³, kjer doseže približno stacionarno fazo pri velikosti delcev okrog 20 nm (vrednost siplje med 36 in 40 delcev/cm³), nakar začne pri velikosti delcev nad 240 nm koncentracija padati proti vrednosti 0 delcev/cm³.

Krivulja na grafu za jesensko obdobje najprej pada, pri velikosti delcev okrog 20 nm iz vrednosti 48 delcev/cm³ pada proti vrednosti 0 delcev/cm³, sledi enakomerno naraščanje in krivulja doseže najvišjo vrednost pri velikosti delcev približno 110 nm s 165 delci/cm³. V nadaljevanju začne takoj ponovno padati proti vrednosti 0 delcev/cm³.

Iz grafa lahko razberemo, da je bilo v jesenskem času prisotnih največ delcev velikosti približno 100 nm. Večjih delcev (do 736 nm) in manjših delcev je bilo bistveno manj. V krivulji poletne kampanje je razviden plato. Število delcev različnih velikosti je namreč konstantno (med 38 in 41 delcev/cm³). Pri največjih in najmanjših delcih je sicer prav tako opazen upad števila delcev v zraku.

Graf 3: Primerjava povprečne tedenske masne porazdelitve – poletje/jesen.



Na grafu 3 je prikazana primerjava povprečne tedenske masne porazdelitve delcev PM med poletno in zimsko kampanjo. Iz grafa je razvidno, da je tudi povprečna tedenska masna

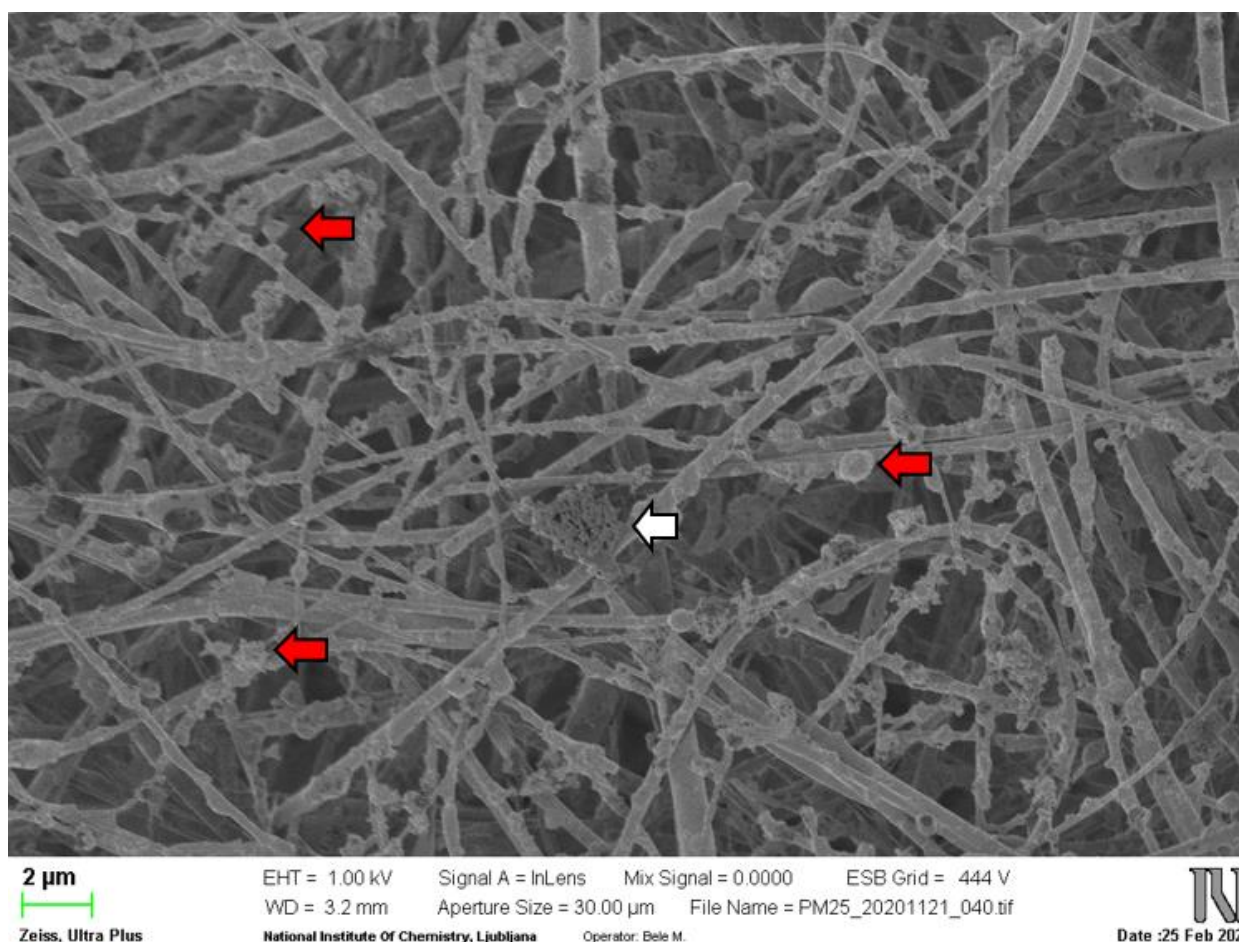
koncentracija delcev poleti manjša od povprečne tedenske masne koncentracije delcev jeseni. V jesenskem času je bila vrednost najvišje masne koncentracije 225 % višja od vrednosti najvišje masne koncentracije v poletnem času.

Krivulji obeh analiziranih obdobj najprej enakomerno naraščata, nato pa eksponentno dosežeta vrh; v poletnem času pri $0,28 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in v zimskem času pri $0,64 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Obe krivulji v nadaljevanju začneta padati proti vrednosti $0 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

V obeh primerih predstavljajo delci z velikostjo okrog 300–400 nm največjo maso delcev v zraku. V jesenskem času je masna koncentracija vrha pri 300–400 nm višja od poletne, saj je višje tudi število tako velikih delcev v zraku (graf 2).

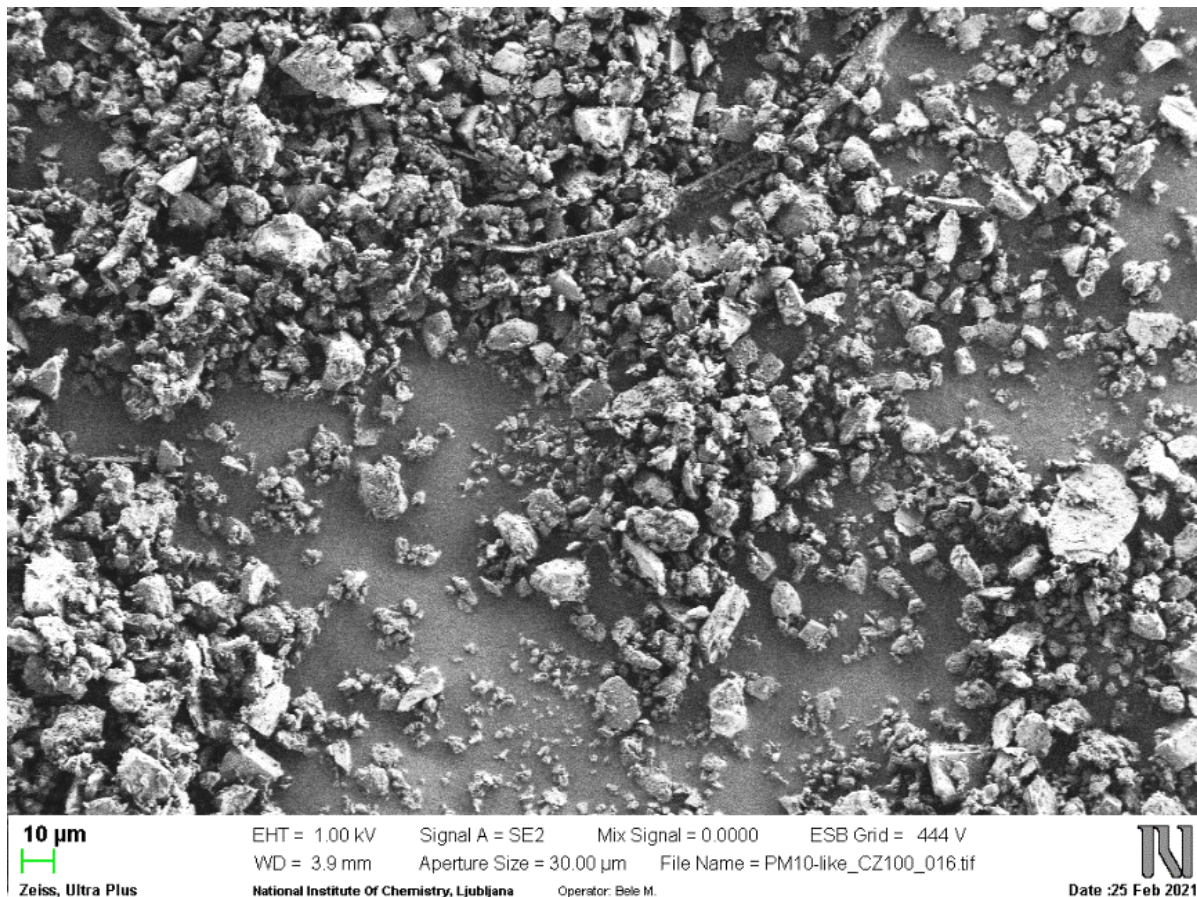
5.1.3 Rezultati mikroskopiranja s SEM

Slika 10: SEM posnetek filtra z vzorcem jesenske kampanje.

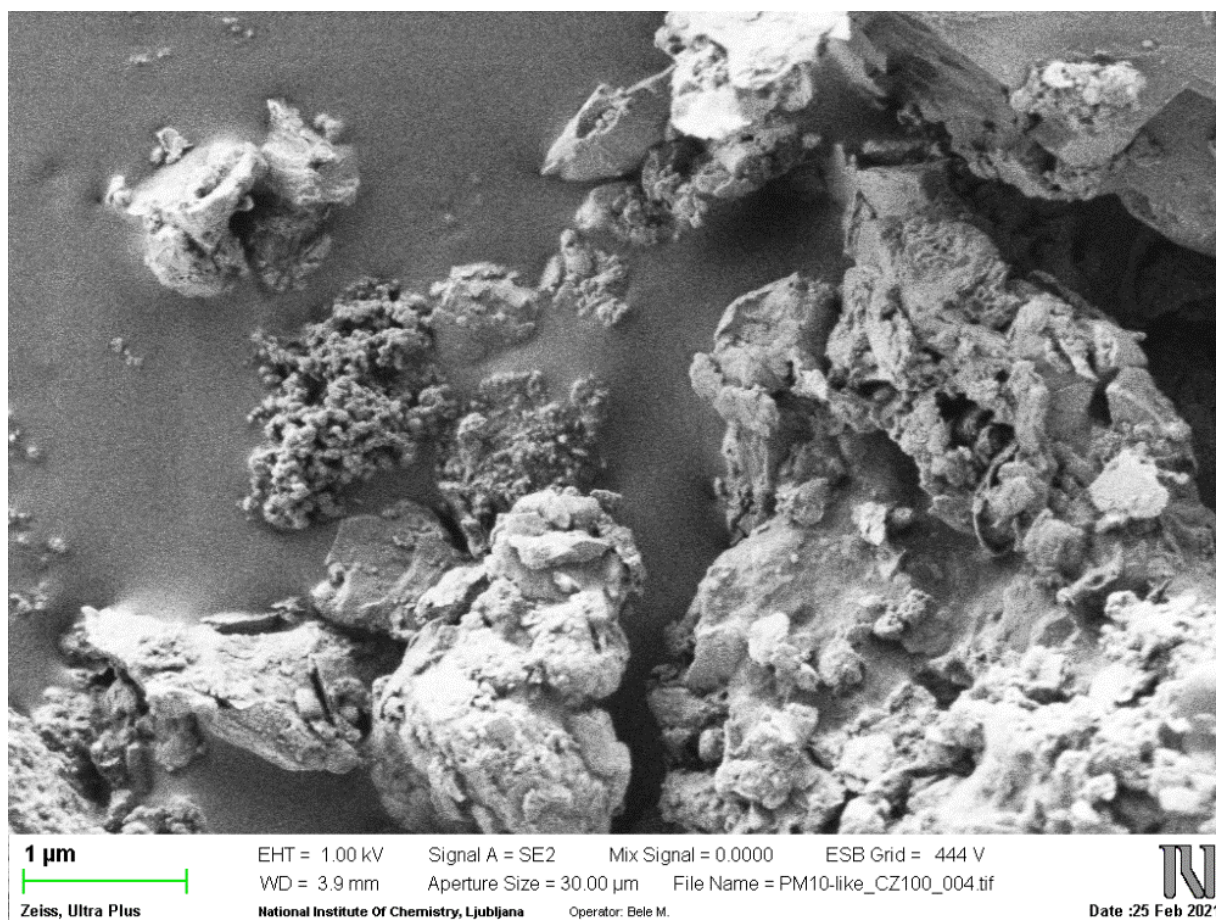


Slika 10 prikazuje SEM posnetek vzorca, ki je bil pridobljen v času jesenske kampanije. Vlakna na sliki predstavljajo filter. V osrednjem delu posnetka je opazen velik skupek saj (bela puščica), okoli vlaken pa opazimo tudi številne manjše skupke in druge delce PM (rdeče puščice).

Slika 11: Prah ERM – CZ100 PM₁₀ (*angl.* fine dust). Slednjega smo uporabljali pri študiji vpliva na eritrocite.



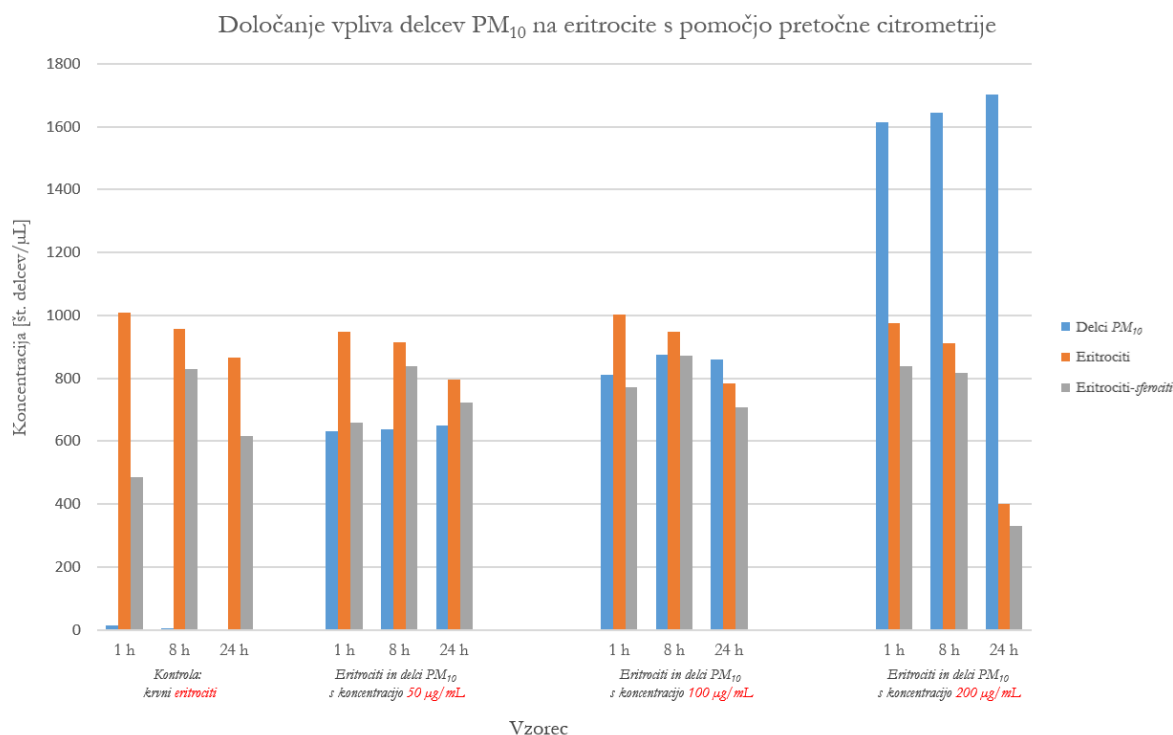
Slika 12: Povečano polje delcev ERM – CZ100 PM₁₀ (*angl.* fine dust).



5.2 VPLIV DELCEV PM₁₀ NA POPULACIJO ERITROCITOV ČLOVEŠKE KRVI

5.2.1 Rezultati merjenja populacij eritrocitov s pretočno citometrijo

Graf 4: Rezultati merjenja populacij s pretočno citometrijo po 1, 8 in 24 h tretiranja eritrocitov z delci PM₁₀.



Graf prikazuje časovno spreminjanje števila delcev (populacije) v negativni kontroli (kri) in s PM₁₀ delci tretiranih vzorcih (koncentracije 50, 100 in 200 µg/mL). Glavni trend, ki ga opazimo glede na naraščajočo časovno komponento, kaže na zmanjšanje populacije eritrocitov, ki so bili tretirani z delci PM₁₀. Pomemben vpliv igra tudi koncentracija delcev v vzorcih. Ob 24 h izpostavitvi zaznamo največji vpliv delcev pri koncentraciji 200 µg/mL.

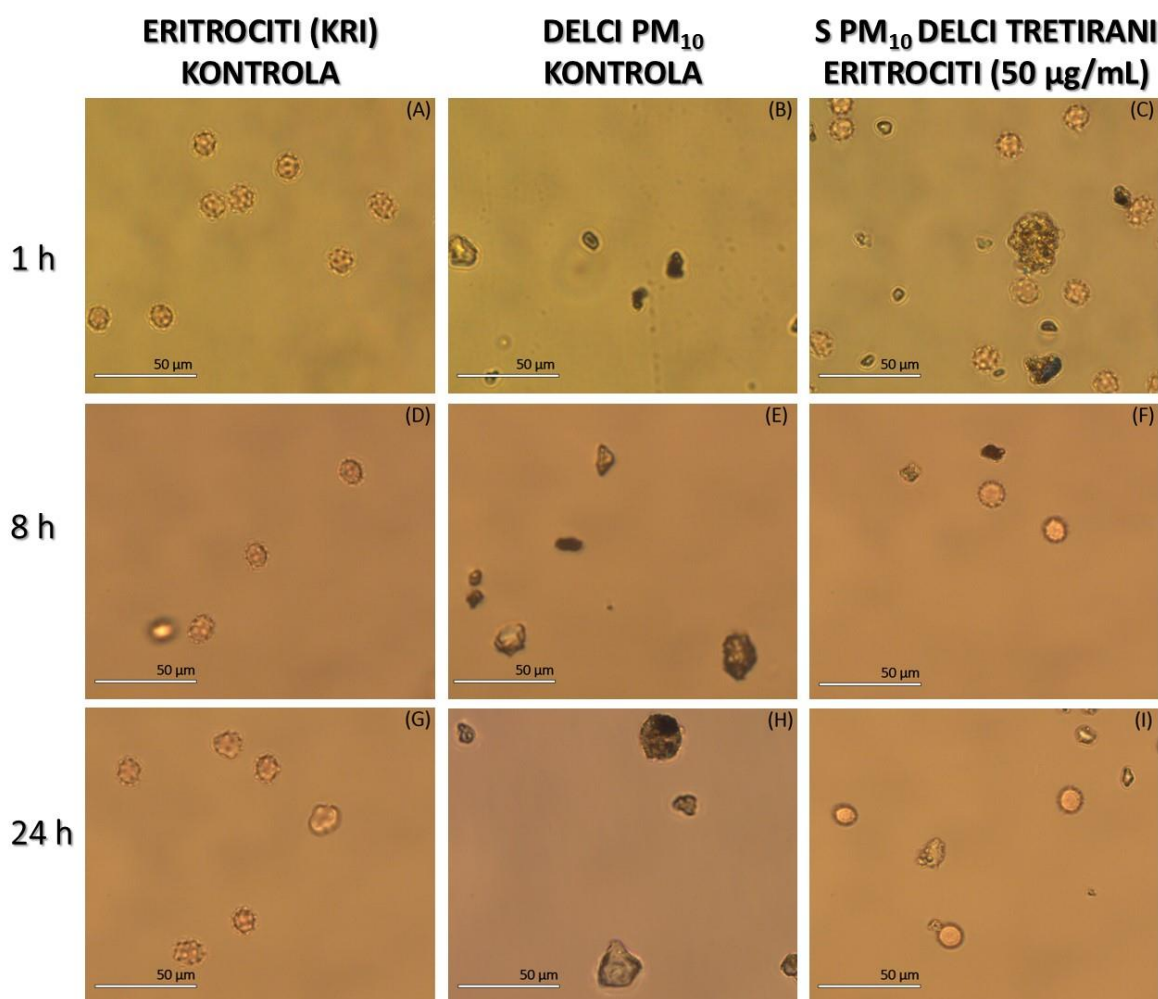
Pri koncentraciji delcev 50 µg/mL je količina eritrocitov po 24 h za 16 % nižja v primerjavi z 1-urno izpostavitvijo. Večji razkorak opazimo pri vzorcu s koncentracijo 100 µg/mL, kjer se je v času 24 h populacija eritrocitov znižala za 22 %. Večji padec koncentracije eritrocitov znotraj 24-urnega intervala je mogoče opaziti ob izpostavitvi delcem s koncentracijo 200 µg/mL, kjer padec znaša 59 %.

Nivo nihanja sferocitne populacije je po 1 in 8 h izpostavitve delcem s koncentracijama 50 in 100 µg/mL ustrezal trendu kontrolnega vzorca. Po 24 urah je bila sprememba le-teh največja. Nihanje je bilo sorazmerno osnovni eritrocitni regiji.

Sferocitne populacije v nadaljevanju pod invertnim svetlobnim mikroskopom nismo zaznali.

5.2.2 Rezultati mikroskopiranja z invertnim svetlobnim mikroskopom

Izpostavitev eritrocitov delcem PM₁₀ s koncentracijo 50 µg/mL

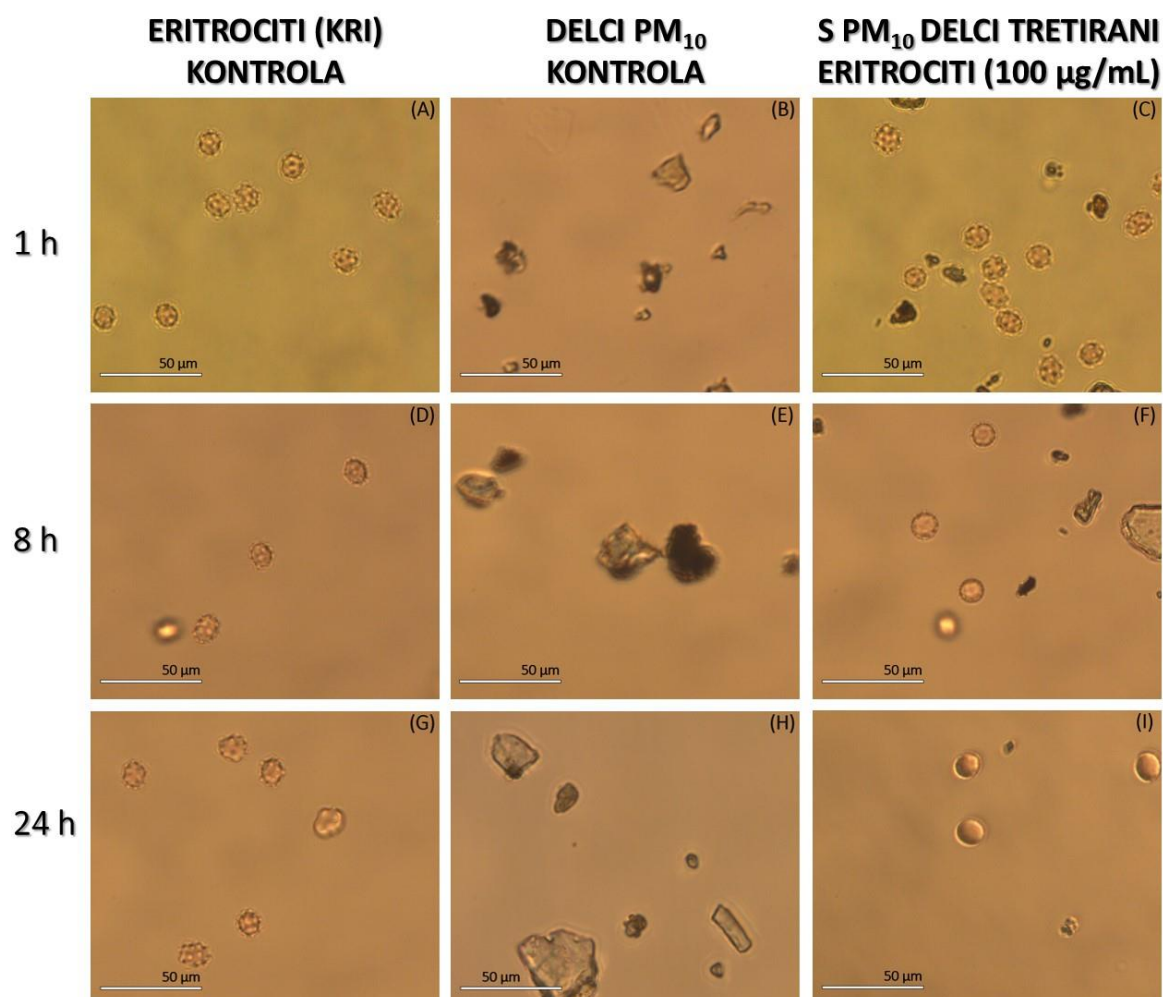


Slika 13: Prikaz mikroskopiranja eritrocitov, ki so bili izpostavljeni PM₁₀ delcem s koncentracijo 50 µg/mL (Vir: Last avtorjev in mentorjev).

Iz slik kontrole krvi opazimo, da se znotraj 24-urnega spremljanja oblika eritrocitov ni posebej spremenila (fotografije na odsekih: 13 (A), (D) in (G)). Eritrociti so skozi celotno obdobje opazovanja ostali v obliki ehinocitne strukture. Kontrolni posnetki delcev v pufru (na odsekih: 13 (B), (E) in (H)) kažejo na pojav aglomeracije delcev v zlepljene skupke. Na odsekih 13 (C), (F) in (I) lahko opazimo pojav spremembe oblike eritrocitov glede na časovno komponento izpostavitve delcem PM₁₀. Po 1-urni izpostavitvi delcem so eritrociti še ohranili prvotno obliko ehinocita (glede na kontrolo: kri), ki se je po 8 urah izpostavitve začela spreminjati. Membrana je videti nekoliko

napeta. Po 24-urni izpostavitvi je mogoče zaznati še neko bolj napeto membrano, oblika pa se v nekaterih primerih transformira v stomatocit.

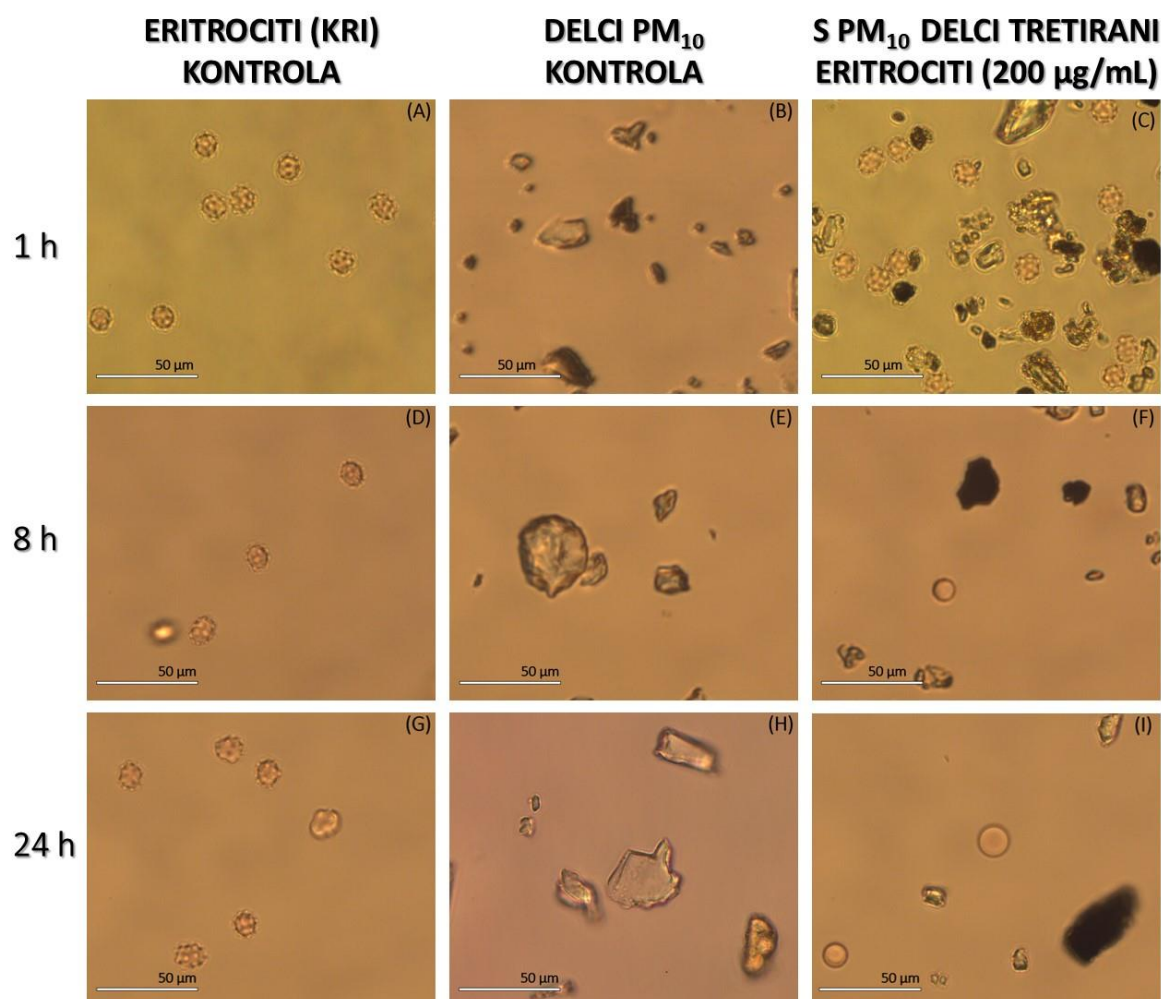
Izpostavitev eritrocitov delcem PM₁₀ s koncentracijo 100 µg/mL



Slika 14: Prikaz mikroskopiranja eritrocitov, ki so bili izpostavljeni PM₁₀ delcem s koncentracijo 100 µg/mL (Vir: Last avtorjev in mentorjev).

Pri pregledu kontrole delcev v PM₁₀ s koncentracijo 100 µg/mL (slika 14 (B), (E) in (H)) smo podobno kot v zgodnjem primeru opazili pojav aglomeracije. Zaznali smo večje zlepljene skupke kot pri nižji koncentraciji delcev. Eritrociti, ki so bili izpostavljeni delcem s koncentracijo 100 µg/mL (slika 14 (C), (F) in (I)) so prav tako skozi opazovano časovno obdobje spremenili svojo obliko. Po 1 h izpostavitve so ohranili začetno ehinocitno obliko, po 8 h je le-ta začela izginjati, saj so se v njihovi okolici pojavile spremembe in oblika je postala malenkostno bolj napeta kot v primeru izpostavitve 50 µg/mL PM₁₀. Po 24 h je mogoče opaziti največjo razliko v primerjavi z izhodno kontrolo, pojavijo se stomatocidi.

Izpostavitve eritrocitov delcem PM₁₀ s koncentracijo 200 µg/mL



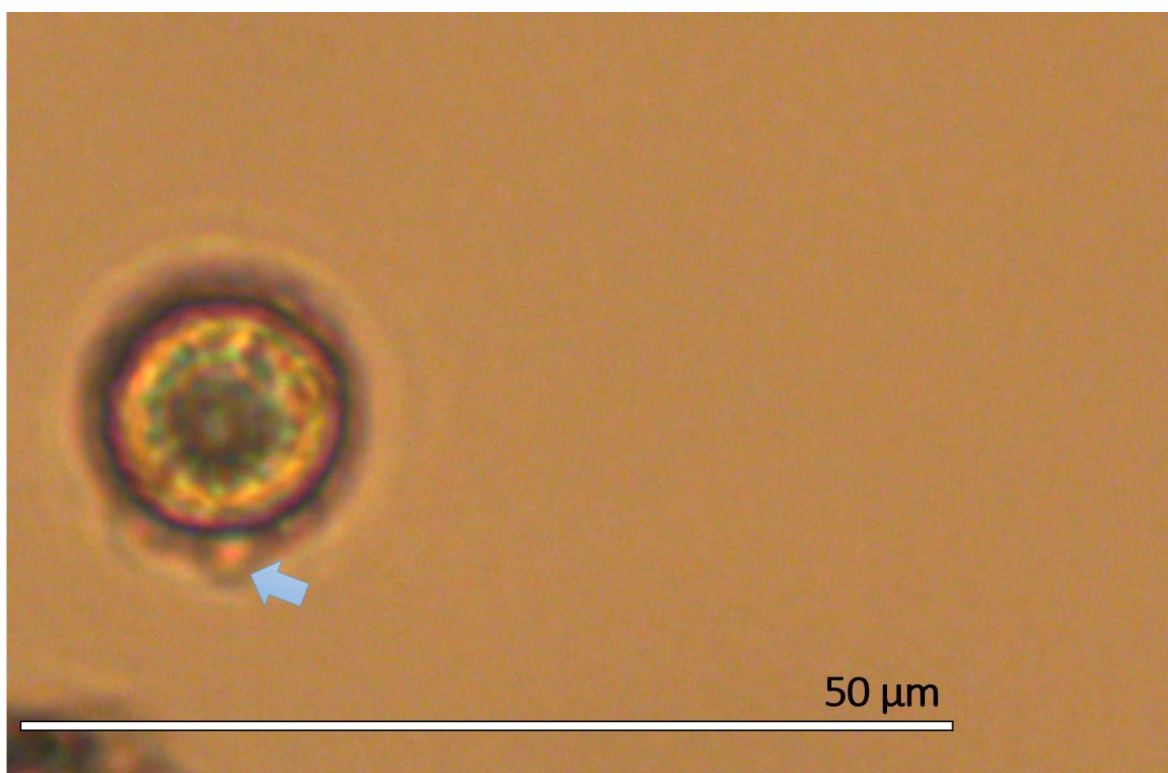
Slika 15: Prikaz mikroskopiranja eritrocitov, ki so bili izpostavljeni PM₁₀ delcem s koncentracijo 200 µg/mL (Vir: Last avtorjev in mentorjev).

Tudi slednji primer kaže na pojava aglomeratov delcev v pufrskem mediju (slika 15 (B), (E) in (H)). Velikost aglomeriranih struktur je bila bistveno večja kot v prej prikazanih primerih. Eritrociti, izpostavljeni delcem s koncentracijo 200 µg/mL (slika 15 (C), (F), (I)), so se skozi obdobje tretiranja in opazovanja spreminjali podobno kot predhodno opisana primera. Po 1 h izpostavitve so eritrociti še ohranili izhodno ehinocitno obliko, kateri se je po 8 h membrana že začela očitneje napenjati. Po 24 h je v vzorcih popokala večina eritrocitov, pri ohranjenih smo zaznali zgolj stomacitno obliko. Njihova membrana je na pogled, zaradi svoje ohlapnosti, imela že očitno nagnjenje k poku.

V času 24-urne izpostavitve eritrocitov delcem PM₁₀ s koncentracijo 200 µg/mL smo na membrani eritrocitov zaznali tudi pojav zunajceličnih veziklov. Zunajcelični vezikli so z membrano obdani

fragmenti celične membrane, ki jih celice vseh vrst sproščajo v svojo okolico tako *in vitro* kot tudi *in vivo*. Med drugim v medicini veljajo vezikli za bio-označevalce različnih bolezenskih stanj.

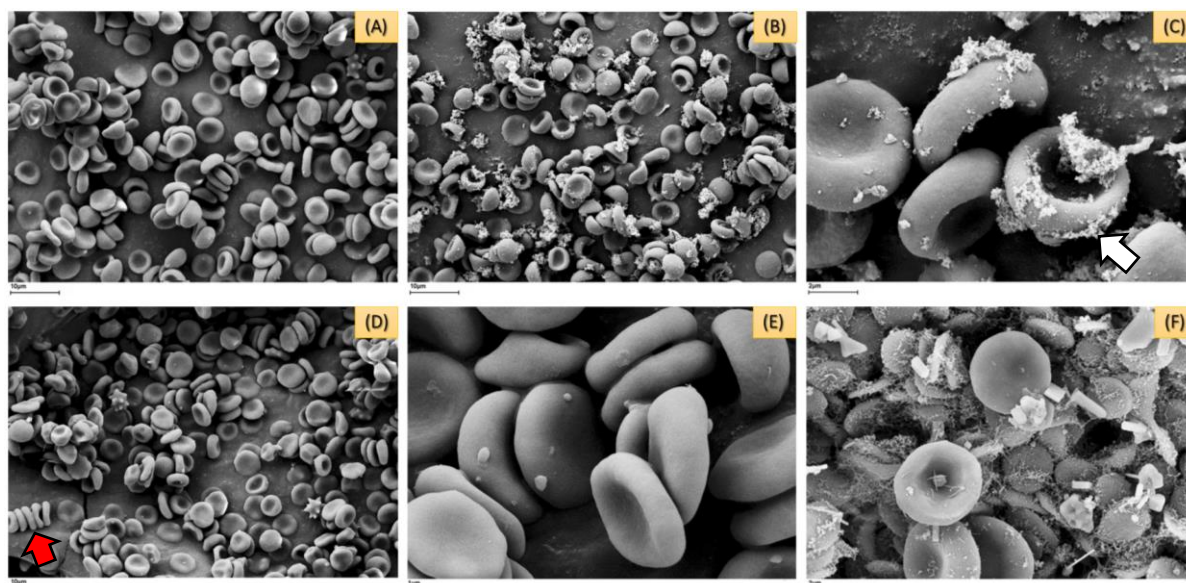
Eritrocitne celice so verjetno prisotnost delcev PM_{10} zaznale kot tujek in posledično sprožile sintezo veziklov. Predviden razlog za nastanek zunajceličnih veziklov zavisi verjetno tudi od poškodbe eritrocitne membrane z dodanimi delci. PM delci namreč s poškodbo membrane povzročijo, da se manjši membranski fragmenti sprostijo v okoliško raztopino, kjer se pretvorijo v vezikle.



Slika 16: Zunajcelični vezikel na eritrocitni membrani v vzorcu s koncentracijo PM_{10} delcev $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ po 24-urni izpostavitvi (Vir: Last avtorjev in mentorjev).

5.2.3 Vpogled v sorodne študije – izpostavitve eritrocitov nanodelcem črnega ogljika

V raziskovalni skupini, s katero izvajamo trenutni projekt, so se raziskovalci že pred časom dotaknili sorodne tematike. Proučevali so vpliv delovanja nanodelcev črnega ogljika na krvne celice in študirali bio-fizikalne integracije. Pri delu so se osredotočili na sesalsko kri, predvsem eritrocite človeške in pasje krvi, ki so jih izpostavili različnim dejavnikom, med katere sodijo tudi nanodelci črnega ogljika (CB). Študijo so spremljali tudi s SEM mikroskopijo.



Slika 17: (A) Kontrola eritrocitov človeške krvi v pufru. (B) Eritrociti človeške krvi z dodanimi nanodelci CB. (C) Povečan odsek eritrocitov človeške krvi z dodanimi nanodelci CB. (D) Eritrociti pasje krvi z nanodelci CB. (E) Povečan odsek eritrocitov pasje krvi z dodanimi nanodelci CB. (F) Povečana regija pasje krvi tretirane z nanodelci CB, kjer so poleg eritrocitov prisotni tudi trombociti. (Vir: Šuštar in sodelavci³³).

Na sliki 17, odseki (A), (B) in (C), so prikazani rezultati mikroskopije SEM človeških eritrocitov po daljši izpostavljenosti nanodelcem CB. Na odseku (C) so razvidni aglomerati nanomateriala, pritrjeni na membrano eritrocita v stomatocitni obliki. Bela puščica na odseku (C) označuje večji aglomerat, ki se je prilepil na dva stomatocita in pri tem ustvaril prehod oz. most med dvema celicama.

Odseki (D), (E) in (F) prikazujejo rezultat mikroskopije SEM pasjih eritrocitov po daljši izpostavljenosti nanodelcem CB. Rdeča puščica na odseku (D) prikazuje skupek stomatocitov povezan v niz, ki tvorijo verižico (*angl.* rouleaux).

Izkazalo se je, da večjih razlik med eritrociti človeške in pasje krvi po izpostavitvi delcem ni. V obeh poskusih je bil odziv eritrocitov enak.

6. DISKUSIJA

6.1 KONCENTRACIJE PM DELCEV V ZRAKU

Namen raziskave je bil ugotoviti, kdaj je količina PM delcev v ozračju višja in posledično katero obdobje leta je s tega vidika za človeka in njegovo zdravje bolj škodljivo. Pred začetkom raziskovalnega dela je bil torej cilj ugotoviti, kolikšna je na merilnem mestu količina PM delcev v ozračju v različnih letnih časih. Meritve smo razdelili v dve osrednji kampanji, s katerima smo skušali ugotoviti, ali je koncentracija delcev višja jeseni ali poleti. Postavili smo hipotezo, da bo koncentracija delcev v jesenskem času višja od koncentracije delcev poleti.

Prva kampanja je bila izvedena v poletnem obdobju med 9. 8. in 15. 8. 2020, drugo pa smo načrtovali v jesenskem času, in sicer med 22. 11. in 28. 11. 2020. V času obeh kampanj smo s pomočjo PM vzorčevalnika na kvarčne filtre lovili PM delce iz zraka.

Povprečna masna koncentracija PM delcev v zraku je v poletnem času opazovanja znašala 22,71 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, v jesenskem času pa 30,85 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Dobljene rezultate smo primerjali z izmerjenimi rezultati iz merilne postaje ARSO Bežigrad v Ljubljani, kjer izvajajo redni monitoring. Povprečna masna koncentracija PM delcev v zraku je pri njih v poletnem času znašala 15,71 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, v jesenskem pa 33,57 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Iz podanih rezultatov lahko razberemo, da se masna koncentracija PM delcev v času jesenske kampanje na merilni postaji ARSO v Bežigradu ujema z masno koncentracijo PM delcev na merilni postaji Kemijskega inštituta Ljubljana, medtem ko se podatki poletne kampanje med merilnima postajama razlikujejo. Povprečna poletna masna koncentracija izmerjena na ARSO je bila za kar 7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ nižja od naše. Sklepamo lahko, da je na takšne rezultate vplival lokalni izvor delcev zaradi čiščenja laboratorijev po požaru na Kemijskem inštitutu.

Iz rezultatov lahko zaključimo, da je jeseni koncentracija PM delcev v zraku višja kot poleti. Sklepamo lahko, da je to posledica toplotnega ogrevanja gospodinjstev in povečanega cestnega prometa na prehodu v zimsko obdobje. En največjih antropogenih virov PM delcev v Sloveniji je izgorevanje v gospodinjstvih in storitvenem sektorju. Problematična je predvsem uporaba malih kurilnih naprav, kjer se uporablja lesna biomasa, ta pa je še posebej aktualna v ne izrazito mrzlih jesenskih dneh. K izpustom delcev poleg kurjave močno prispeva tudi promet ter resuspenzija s cestišč, še posebej v Ljubljani, ki velja za najbolj prometno mesto v Sloveniji. Poleg kurjave in prometa k onesnaženosti pogosto dodatno doprinese tudi pojav temperaturne inverzije, ki je še posebej značilna za Ljubljansko kotlino.

Poleti je bila koncentracija PM delcev v zraku bistveno nižja, kar je smiselno, saj poleti toplotno ne ogrevamo gospodinjstev in ne prihaja do pojava temperaturne inverzije v nižinah. PM delci so se v zraku pojavljali predvsem zaradi prometa in resuspenzije s cestišč, saj je bil PM vzorčevalnik postavljen na območju, kjer je povečan promet. Poleg tega je na dobljene rezultate vplival že omenjeni lokalni izvor delcev PM_{2,5} v okolici Kemijskega inštituta (čiščenje laboratorija po požaru).

Podrobnejši pregled velikostne porazdelitve delcev je nadalje pokazal, da je v zraku manjših delcev več, večji delci pa predstavljajo večjo maso (vrh krivulj na grafu 3 je premaknjen k večjim delcem v primerjavi z grafom 2). Za zdravje ljudi so bolj problematični manjši delci, saj lahko skozi dihalno pot prodrejo dlje v pljuča. Nanodelci, ki prodrejo vse d konca dihalne poti, se namreč zadržijo v alveolah, s kopičenjem nanodelcev pa pride do zmanjšanja pljučne kapacitete. Nekatere komponente PM delcev so vodotopne, kar povzroči, da se po adsorpciji na pljučne celice v alveolah začnejo v telo dodatno sproščati vodotopne neškodljive (ioni) in škodljive snovi. Predstavniki škodljivih snovi so PAH, ki veljajo za toksinogene in karcinogene snovi.

Povprečna dnevna masna koncentracija delcev PM_{2,5} je v jesenski kampanji presegala mejno dnevno vrednost določeno po WHO. Jesenski rezultati tako kažejo, da je jeseni raven onesnaženosti zraka problematična za zdravje ljudi. Povprečna dnevna masna koncentracija delcev PM_{2,5} je v poletni kampanji pri nas znašala 22,71 µg/m³ in tako ni presegala mejne dnevne vrednosti po WHO. Vse izmerjene koncentracije so presegale priporočeno povprečno letno koncentracijo po smernicah WHO, ki znaša 10 µg/m³.

Hipotezo 1, kjer smo predvidevali:

- da bo poletni koncentracija delcev PM_{2,5} skladna z mejno letno vrednostjo, definirano s strani WHO;
- da bo v jesenskem času koncentracija PM_{2,5} delcev bistveno višja od koncentracije delcev poleti;

lahko v celoti potrdimo.

6.2 VPLIV PM DELCEV NA MEMBRANE ERITROCITOV

Raziskave smo se lotili z namenom ugotavljanja vpliva delcev PM₁₀ na membrane eritrocitov človeške krvi. Eritrocite smo izpostavili trem različnim koncentracijam PM₁₀ delcev, in sicer: 50, 100 in 200 µg/mL, ter jih opazovali in analizirali v treh časovnih intervalih (po 1, 8 in 24 h). Naš cilj je bil ugotoviti, katera izmed zgoraj navedenih koncentracij delcev bo pokazala največji vpliv na eritrocitne membrane in posledično na njihovo populacijo v vzorčni suspenziji.

Pri delu smo se opirali predvsem na morfološki pregled vzorcev s pomočjo invertnega svetlobnega mikroskopa in kvantitativne analize na pretočnem citometru.

Ugotovili smo, da delci PM₁₀ tvorijo aglomerate v pufru PBS (slike: 14, 15 in 16). Med aglomerati in eritrociti prihaja do interakcij (slika 17). S pomočjo invertnega mikroskopa smo ugotovili, da če se aglomerat na membrano prilepi preko večjega dela njene površine (slika 13), lahko pride do poškodbe eritrocita. Spremembe na eritrocitnih membranah so opazne pri vseh treh koncentracijah. Eritrociti so po nekaj-urni izpostavitvi namreč prešli iz ehinocitne v stomatocitno obliko (slike: 14, 15 in 16). Razlika v spremembi membrane je najbolj opazna pri vzorcu eritrocitov, ki so bili izpostavljeni delcem s koncentracijo 200 µg/mL, saj sta sprememba oblike membrane in tvorba aglomeratov vidni že po 1-urni izpostavitvi. Prav v vzorcu eritrocitov s koncentracijo delcev 200 µg/mL smo opazili tudi tvorbo zunajceličnih veziklov, ki med drugim veljajo za biomarkerje bolezenskih stanj. Iz navedenega lahko sklepamo, da je največja koncentracija delcev PM₁₀ najbolj negativno vplivala na eritrocite. V vzorcih z nižjo koncentracijo delcev PM₁₀ je bila sprememba vidna šele po 8-urni časovni izpostavitvi.

Glede na naraščajočo časovno komponento delcem izpostavljenih vzorcev kažejo rezultati pretočne citometrije na zmanjšanje populacije eritrocitov. Pomemben vpliv ima tudi koncentracija delcev, ki je bila dodana vzorcem. Pri nižjih koncentracijah pride do manjšega pokanja membran kot pri višjih. Ob 24-urni izpostavitvi zaznamo največji vpliv delcev s koncentracijo 200 µg/mL.

Če vplive PM delcev umestimo še v kontekst vpliva delovanja nanodelcev črnega ogljika na krvne celice, lahko zaključimo, da so eritrociti po večurni izpostavitvi v obeh primerih spreminjali obliko. Pojavljala se je aglomeracija nanomateriala oz. v našem primeru delcev PM₁₀. Pri izpostavitvi eritrocitov nanomaterialu črnega ogljika je prišlo do zlepljenja eritrocitov v večje aglomerate. V našem primeru pri izpostavitvi delcem PM₁₀ do očitnih zlepljenj ni prišlo. Razlog je verjetno v različno definiranih reakcijskih površinah materiala, njegovi velikosti in kemijski zgradbi. V nadaljevanju bomo študijo spremljali z mikroskopijo SEM, kjer bomo lahko z gotovostjo primerjali učinke delovanja delcev na krvne celice.

Hipotezo 2, kjer smo predvidevali, da:

- delci PM₁₀ pomembno vplivajo na preživetje eritrocitov in njihovo obliko;
- pričakujemo najvišji učinek delovanja delcev v času 24-urne izpostavitve;

lahko v celoti potrdimo.

7. ZAKLJUČEK

Motivacija za raziskovalno delo je bilo proučevanje vpliva PM delcev na zdravje človeka. Osredotočali smo se predvsem na študij vpliva PM delcev na eritrocite človeške krvi. Prizadevali smo si tudi ugotoviti, v katerem letnem času je koncentracija PM delcev v zraku najvišja in posledično kateri letni čas je za človekovo zdravje najbolj nevaren. Zaradi navedenega smo koncentracijo delcev v zraku primerjali v poletnem in jesenskem času.

S pridobljenimi podatki smo ugotovili, da je koncentracija PM_{2,5} delcev v ozračju jeseni mnogo višja v primerjavi s poletjem. Razlog za omenjeno vidimo predvsem v povečani uporabi kurilnih naprav in višjem deležu dnevnega cestnega prometa. Jesensko obdobje je tako za človekovo zdravje nevarnejše.

Po velikosti PM delce v grobem delimo v dve glavni skupini, in sicer PM_{2,5} in PM₁₀. Daljša izpostavljenost delcem lahko povzroči razvoj kardiovaskularnih in respiratornih obolenj. Za zdravje človeka so bolj nevarni delci PM_{2,5}, saj so po premeru manjši in lahko posledično prodrejo globlje v telo. Ker se v krvi nahaja največji odstotek eritrocitov (hematokrit), kateri so odgovorni za prenos kisika po telesu, bi z njihovo pomočjo lahko v nadaljevanju sklepali na sistemski vpliv vdihanih nanodelcev. Eritrocite smo izpostavljali različnim koncentracijam delcev PM₁₀ in preučevali njihov odziv. Izsledki raziskave so pokazali, da se z daljšim časom izpostavljenosti in višanjem koncentracije delcev PM₁₀ niža delež eritrocitne populacije. Pri daljši izpostavitvi eritrocitov delcem so opazne tudi spremembe oblik membrane. Najbolj očiten je prehod iz ehinocitne oblike v stomatocitno.

8. VIRI

1. Agencija Republike Slovenije za okolje. *Kakovost Zraka v Sloveniji v Letu 2018*. http://www.arso.gov.si/zrak/kakovost%20zraka/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/Letno_Porocilo_2018.pdf
2. European Environment Agency. *Air Quality in Europe - 2019 Report*. European Environment Agency; 2019. <https://www.eea.europa.eu/publications/air-quality-in-europe-2019>
3. Bilban M. Nanodelci. *Delo in varnost*. 2013;58(4):42-54. <https://www.dlib.si/stream/URN:NBN:SI:DOC-71DEG451/ca2a936a-ba21-4d21-8cfd-c39f6921704e/PDF>
4. Lesjak T. Ognjemeti in njihov vpliv na prisotnost trdnih delcev v zraku. Objavljeno na spletu 2016. <http://fundacija-avgustakuharja.si/wp-content/uploads/2020/10/2016-diploma-Tadej-Lesjak.pdf>
5. Siwek K, Osowski S. Data mining methods for prediction of air pollution. *International Journal of Applied Mathematics and Computer Science*. 2016;26(2):467-478. doi:10.1515/amcs-2016-0033
6. Hinds WC. Aerosol Technology: Properties, Behavior, and Measurement of Airborne Particles. Objavljeno na spletu januar 1999.
7. *Kakovost Zraka v Sloveniji v Letu 2018*. Agencija republike Slovenije za okolje; 2019:150.
8. Bilban Marjan. Onesnaževala zraka. *Delo in varnost*. 2014;59(4):16-19. <http://www.dlib.si/stream/URN:NBN:SI:DOC-JZ9QA2GF/b9d39915-55c9-40c1-9f75-3a3ea6c5412f/PDF>
9. World Health Organization. Ambient (outdoor) air pollution. Objavljeno na spletu 2018. Dostopno 20. februar, 2021. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)
10. Pravno-informacijski sistem Republike Slovenije, PIS. Pravilnik o ocenjevanju kakovosti zunanjega zraka (Uradni list RS, št. 55/11, 6/15 in 5/17). Objavljeno na spletu 2011. <http://www.pisrs.si/Pis.web/pregledPredpisa?id=PRAV10250>
11. Bratec J. Meritve nanodelcev nastalih pri laserskem tiskanju. Objavljeno na spletu 2015.
12. Damian Carrington. Air pollution particles in young brains linked to Alzheimer's damage. *Air pollution*. <https://www.theguardian.com/environment/2020/oct/06/air-pollution-particles-in-young-brains-linked-to-alzheimers-damage>. Objavljeno 6. oktober, 2020. Dostopno 22. februar, 2021.
13. Damian Carrington. Air pollution nanoparticles linked to brain cancer for first time. <https://www.theguardian.com/environment/2019/nov/13/air-pollution-particles-linked-to-brain-cancer-in-new-research>. Objavljeno 13. november, 2019. Dostopno 22. februar, 2021.
14. Nežman P. Priprava vodotopne fluorescenčne učinkovine za označevanje normalnih in rakavih celic urotelija sečnega mehurja in vitro. Objavljeno na spletu 2018. https://books.google.si/books/about/Priprava_vodotopne_fluorescen%C4%8Dne_u%C4%8Dink.html?id=rTzFwwEACAAJ&redir_esc=y
15. Kralj-Iglič V, Iglič A. Organske mikro- in nanocevke. *Proteus*. 2003;66(3):105-111. <http://physics.fe.uni-lj.si/publications/pdf/Proteus2003.pdf>
16. GO inštrukcije. Lipidi. Objavljeno 2019. Dostopno 16. januar, 2021. <https://www.gotel.si/instrukcije/lipidi>
17. Pajnič M. Vpliv nanomateriala črnega ogljika na membrane krvnih celic. Objavljeno na spletu 2019. <https://repozitorij.uni-lj.si/IzpisGradiva.php?id=112665&lang=slv&prip=dkum:8729640:d3>
18. Hoffman M. Picture of Blood. WebMD. Published 2014. Dostopno 2. januar, 2021. <https://www.webmd.com/heart/anatomy-picture-of-blood>

19. American Society of Hematology. Blood Basics. Objavljeno 2021. Dostopno 2. januar, 2021. <https://www.hematology.org/education/patients/blood-basics?>
20. Zavod Republike Slovenije za transfuzijsko medicino. Kri in krvne skupine. Dostopno 3. januar, 2021. <http://www.ztm.si/krvodajalstvo/kri-in-krvne-skupine/>
21. Narla M, Gallanher PG. Red cell membrane. ncbi.nlm.nih.gov. Objavljeno 2008. Dostopno 12. december, 2020. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2582001/>
22. Gerald L, Wortis M, Mukhopadhyay R. Stomatocyte–discocyte–echinocyte sequence of the human red blood cell: Evidence for the bilayer–couple hypothesis from membrane mechanics. Objavljeno na spletu 2002. Dostopno 12. december, 2020. <https://www.pnas.org/content/pnas/99/26/16766.full.pdf>
23. Labcompare. Inverted Microscopes. Labcompare.com. Dostopno 1. februar, 2021. <https://www.labcompare.com/Microscopy-and-Laboratory-Microscopes/6128-Inverted-Microscopes/>
24. Kramar S. Mikroskopija. *Priročnik: muzejska konzervatorska in restavratorska dejavnost*. 2015;6.3.2(2):1-14. Dostopno 12. december, 2020. http://www.sms-muzeji.si/ckfinder/userfiles/files/6-3-2-2015_p.pdf
25. Jeran M, Drab M, Veršnjak B, Košir S. Lastnosti vrstične elektronske mikroskopije (SEM) kot metode za preučevanje in karakterizacijo vzorcev. *Kemija v šoli in družbi*. 2019(1):1-5. <https://kemija.net/clanek/1663>
26. Ministry for the Environment. Good Practice Guide for Air Quality Monitoring and Data Management 2009. 2009. Dostopno 16. december, 2020. Ministry for the Environment
27. Pavli Peter. Navodila za uporabo referenčnega merilnika Leckel. Objavljeno na spletu 2011. Dostopno 26. februar, 2021. <https://db-airmontech.jrc.ec.europa.eu/download/PM-SI-ARSO-NAV.MO05.06PMNavodloLeckel-3.pdf>
28. Agencija Republike Slovenije za okolje. *Meritve Delcev PM10 Na Merilnem Mestu Hrastnik*.; 2009. Dostopno 26. februar, 2021. https://www.arso.gov.si/zrak/kakovost%20zraka/poro%C4%8Dila%20in%20publikacije/PM10_Hrastnik.pdf
29. TSI. Scanning mobility particle sizer spectrometer 3938. TSI.com. <https://tsi.com/products/particle-sizers/particle-size-spectrometers/scanning-mobility-particle-sizer-spectrometer-3938/>
30. Bushnell T. Seeing is Believing: An Introduction to Imaging Flow Cytometry. bitesizebio.com. Objavljeno 2014. Dostopno 15. december, 2020. <https://bitesizebio.com/20123/seeing-is-believing-an-introduction-to-imaging-flow-cytometry/>
31. Uporaba pretočne citometrije za preučevanje mehanizmov toksičnosti. *Laboratorijska biomedicina, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani*. Dostopno 12. januar, 2021. http://www.ffa.uni-lj.si/fileadmin/datoteka/KB/Gradivo/PC_gradivo_BMA.pdf
32. Barteneva NS, Vorobjev IA. Seeing is Believing: An Introduction to Imaging Flow Cytometry. bitesizebio.com. Objavljeno 2014. Dostopno 15. december, 2020. <https://bitesizebio.com/>
33. Šuštar V, in sodelavci. Interaction of carbon black nanomaterial on mammalian blood cells. *V pripravi*. 2021.

9. PRILOGE

9.1 KVANTITATIVNO DOLOČANJE ERITROCITOV V TRETIRANIH VZORCIH S POMOČJO PRETOČNE CITOMETRIJE

Tabela 3: Rezultati merenj populacije eritrocitov s pretočnim citometrom po 1, 8 in 24 h.

VZOREC	REGIJA: DELCI PM₁₀	REGIJA: ERITROCITI	REGIJA: ERITROCITI- SFERO CITI
	(št. delcev/ μ L)	(št. delcev/ μ L)	(št. delcev/ μ L)
Vzorec 1: kri in delci PM ₁₀ s koncentracijo 50 μ g/mL			
1 h	630,11	947,36	658,21
8 h	638,28	913,98	838,38
24 h	650,58	796,52	723,18
Vzorec 2: kri in delci PM ₁₀ s koncentracijo 100 μ g/mL			
1 h	810,80	1003,60	772,30
8 h	875,99	949,06	872,36
24 h	860,20	782,85	707,13
Vzorec 3: kri in delci PM ₁₀ s koncentracijo 200 μ g/mL			
1 h	1613,46	976,59	836,89
8 h	1643,11	910,58	817,94
24 h	1703,39	399,12	329,08

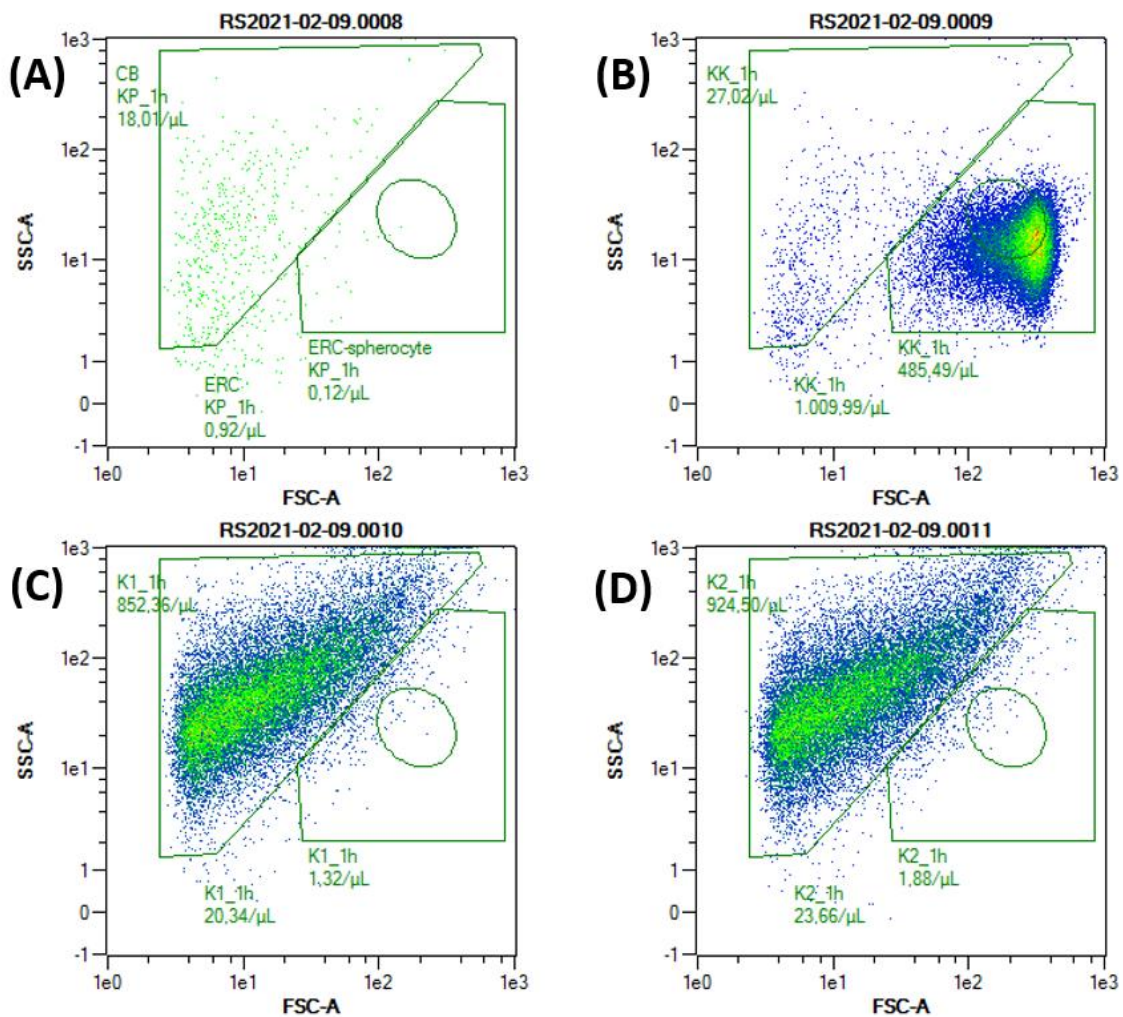
Tabela 4: Rezultati citometrije na negativni kontroli in kontroli modelnega PM₁₀ po 1, 8 in 24 h.

KONTROLA	REGIJA: DELCI PM₁₀	REGIJA: ERITROCITI	REGIJA: ERITROCITI- SFEROCITI
	(št. delcev/ μ L)	(št. delcev/ μ L)	(št. delcev/ μ L)
Kri			
1 h	13,92	1009,26	485,36
8 h	3,85	958,26	827,77
24 h	0	865,18	616,18
PM₁₀ s koncentracijo 50 μg/mL			
1 h	852,36	20,34	1,32
8 h	878,38	27,30	2,64
24 h	897,56	29,90	2,28
PM₁₀ s koncentracijo 100 μg/mL			
1 h	924,50	23,66	1,88
8 h	905,72	30,46	2,68
24 h	898,84	33,45	2,92
PM₁₀ s koncentracijo 200 μg/mL			
1 h	1729,74	43,29	3,56
8 h	1720,90	54,28	4,76
24 h	1718,13	64,37	6,08

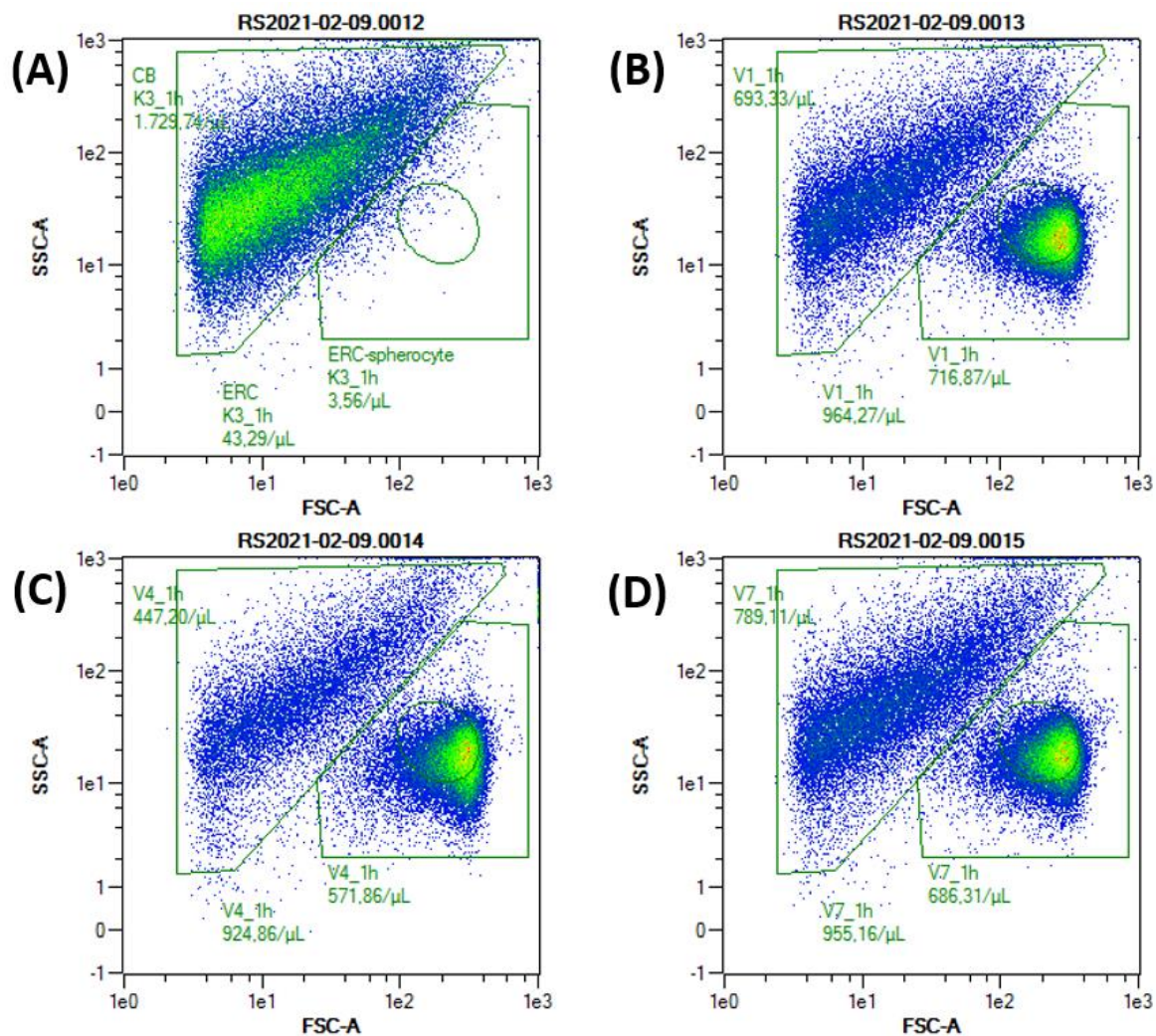
9.2 RAZSEVNI DIAGRAMI

Tabela 5: Oznake vzorcev za merjenje s pretočno citometrijo.

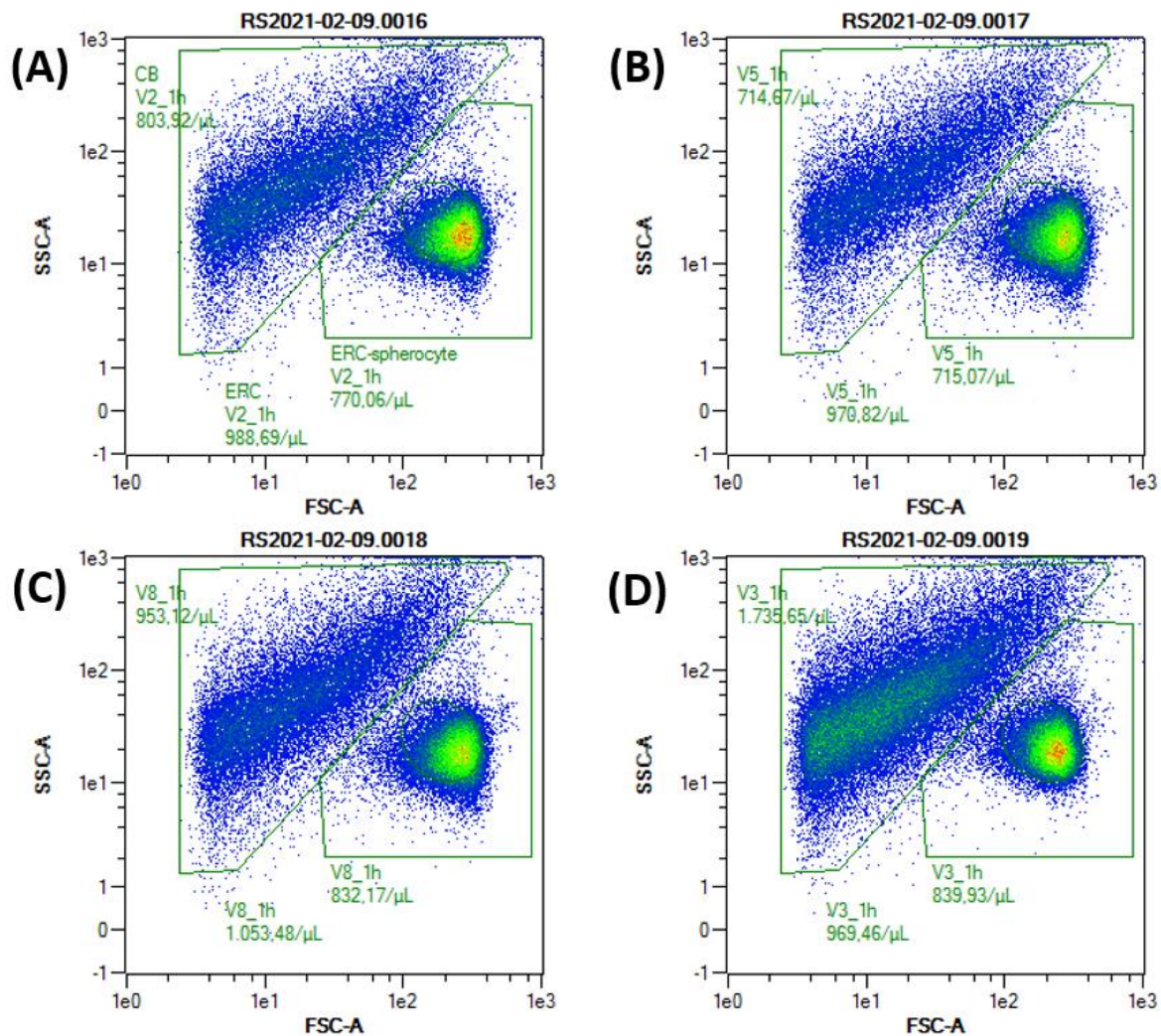
Kontrola	kontrola kri	KK
	kontrola pufer	KP
Kontrola pufer + delci PM₁₀	kontrola pufer + PM ₁₀ 50 µg/mL	K1
	kontrola pufer + PM ₁₀ 100 µg/mL	K2
	kontrola pufer + PM ₁₀ 200 µg/mL	K3
Kri + delci PM₁₀	50 µg/mL	V1
	100 µg/mL	V2
	200 µg/mL	V3
	50 µg/mL	V4
	100 µg/mL	V5
	200 µg/mL	V6
	50 µg/mL	V7
	100 µg/mL	V8
	200 µg/mL	V9



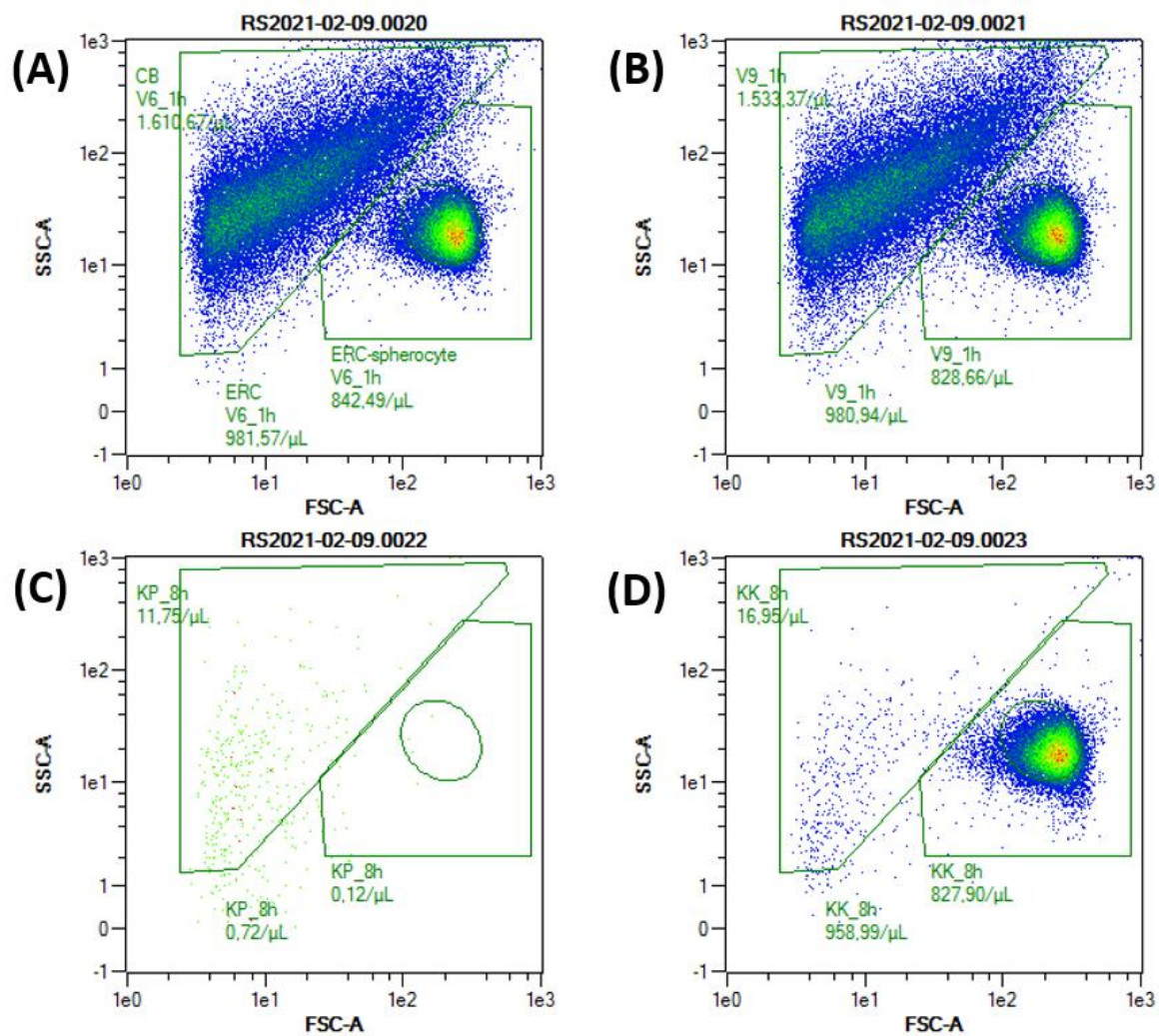
Slika 18: Razsevni diagrami pretočne citometrije.



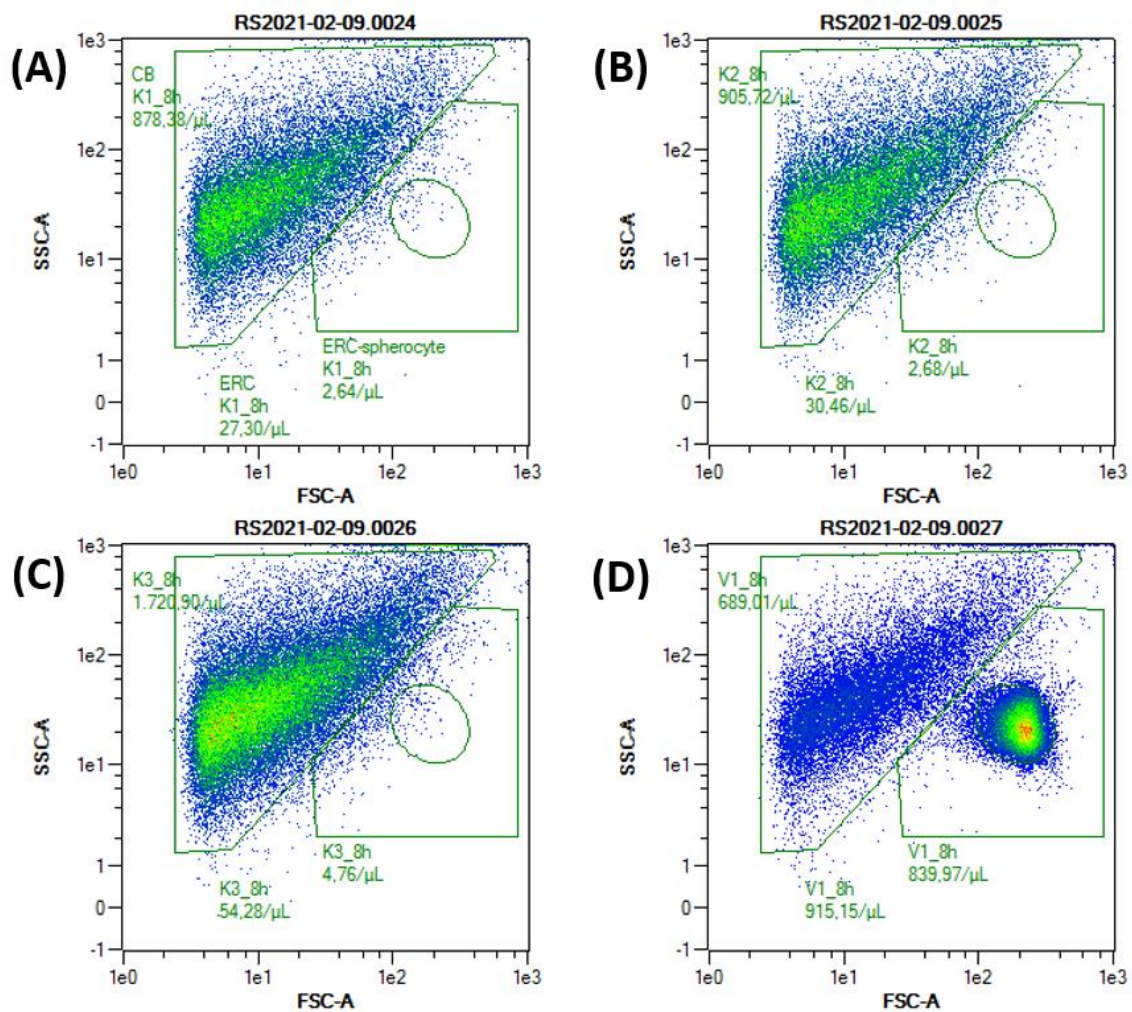
Slika 19: Razsevni diagrami pretočne citometrije.



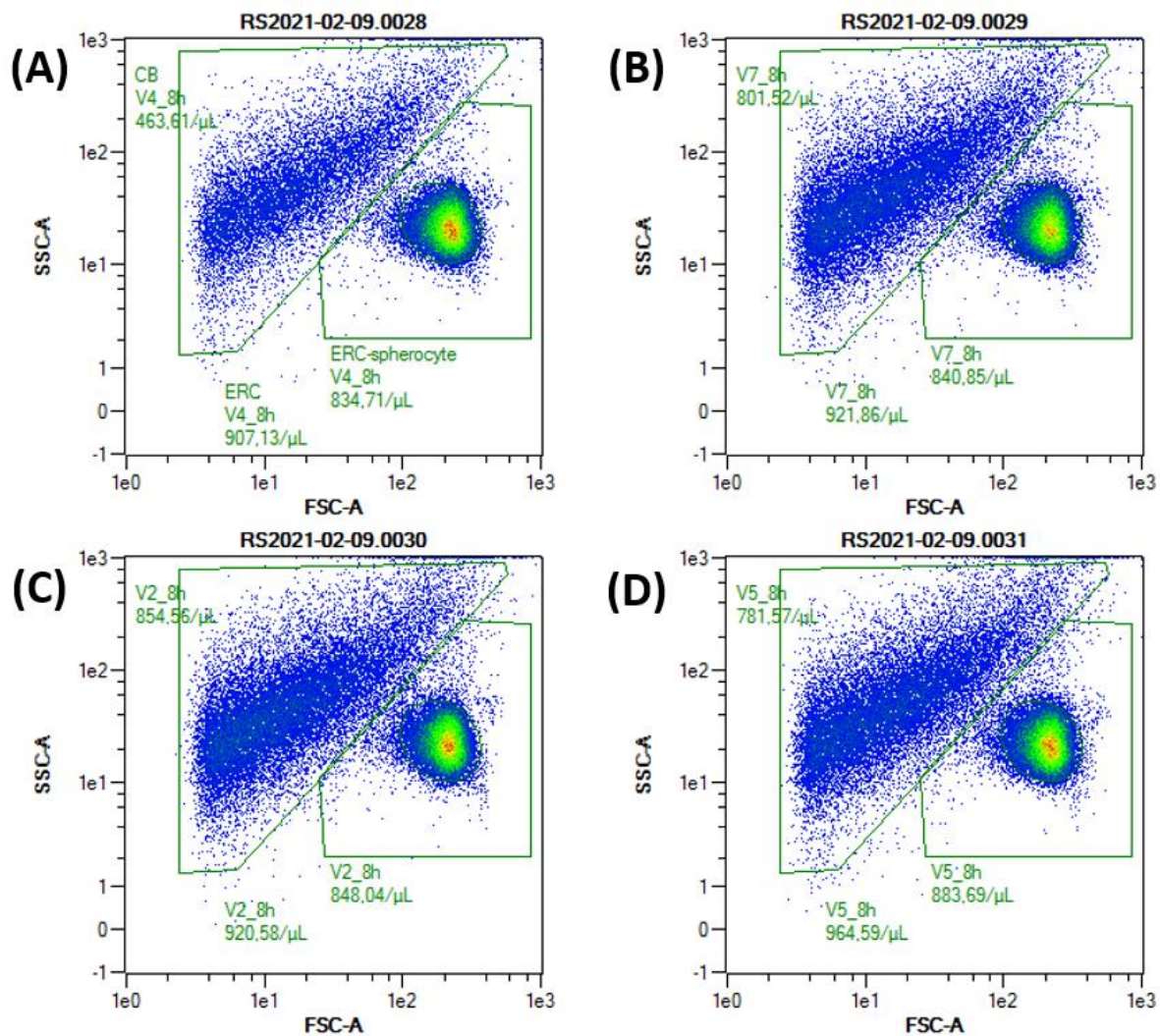
Slika 20: Razsevni diagrami pretočne citometrije.



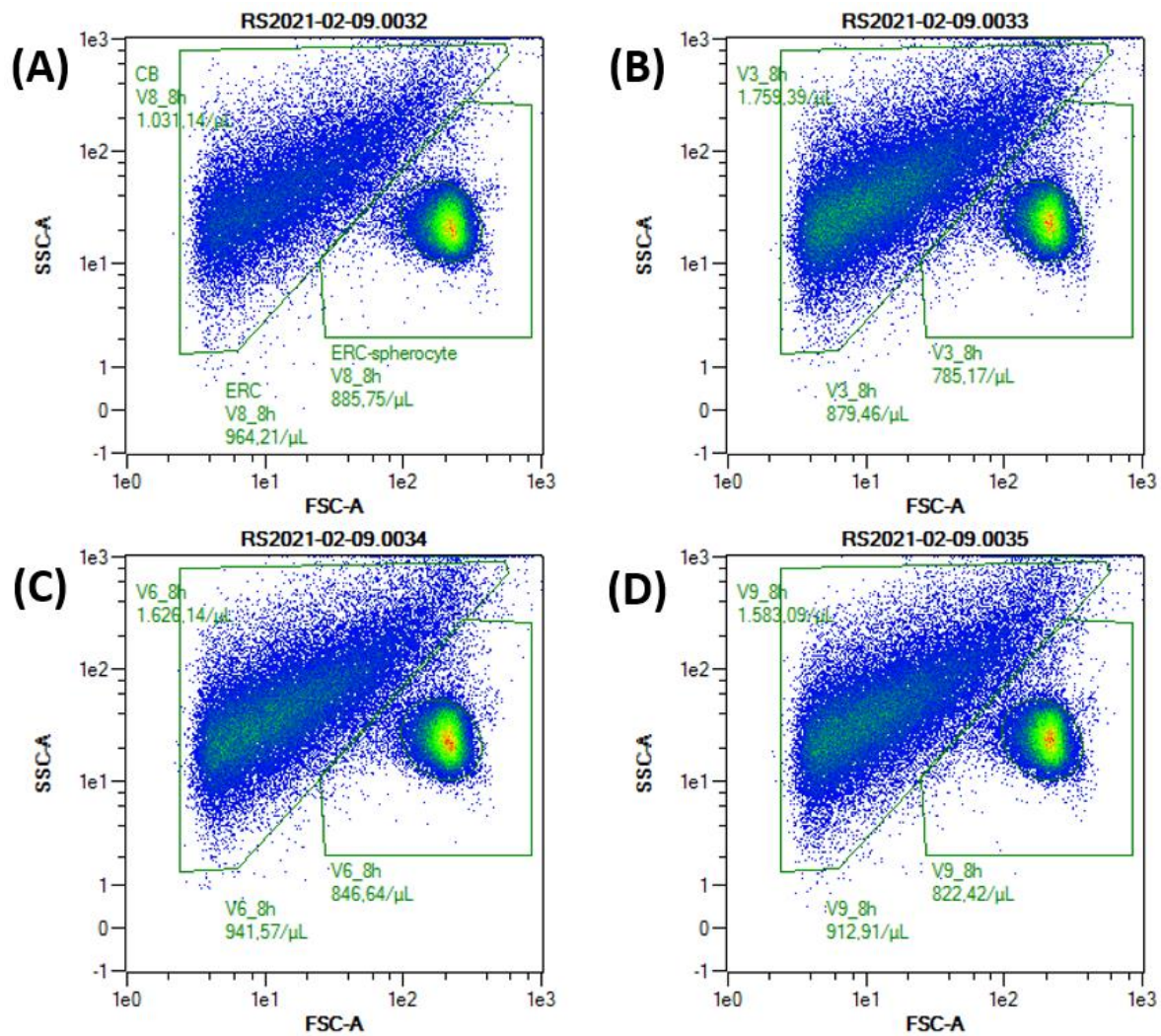
Slika 21: Razsevni diagrami pretočne citometrije.



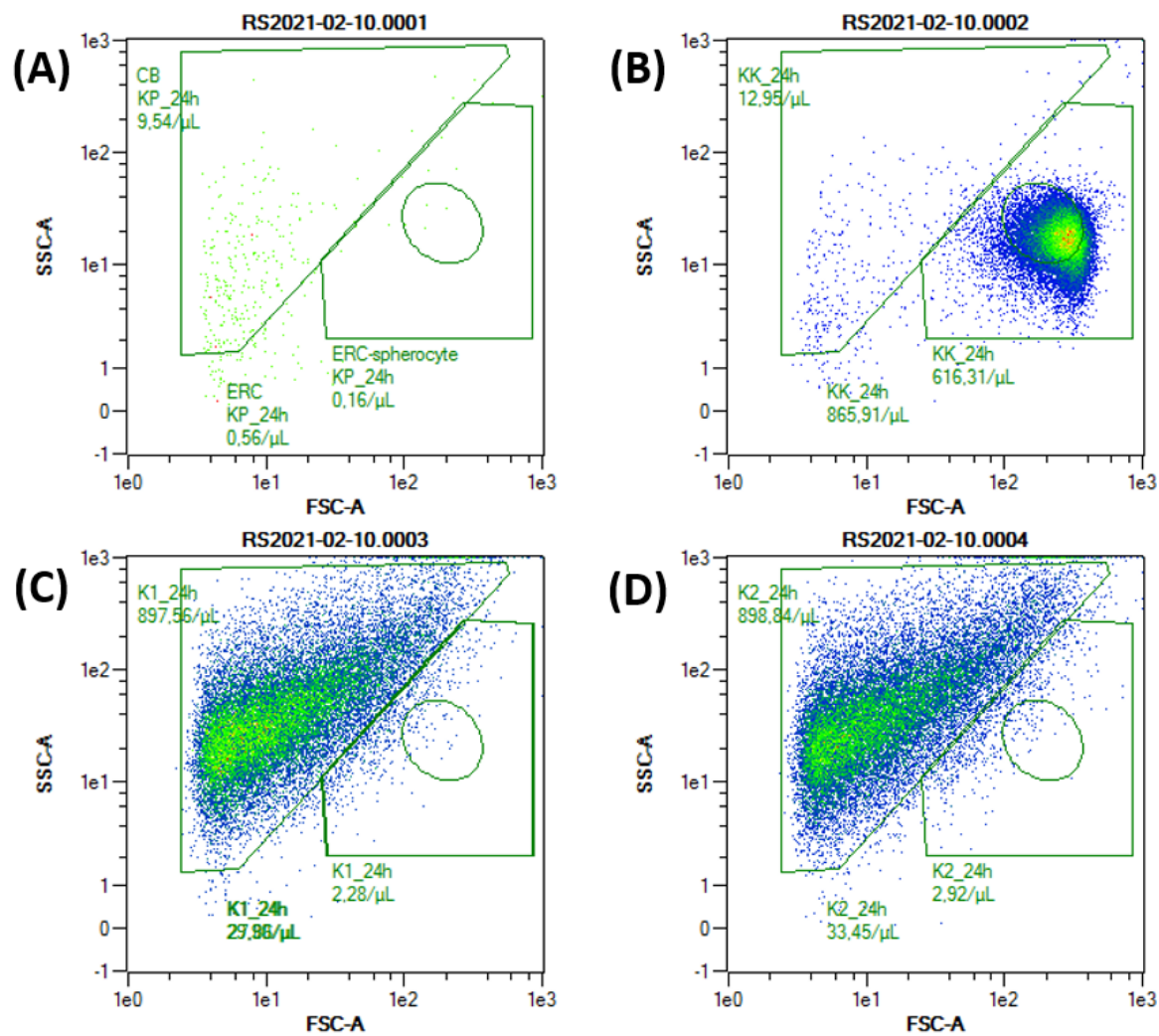
Slika 22: Razsevni diagrami pretočne citometrije.



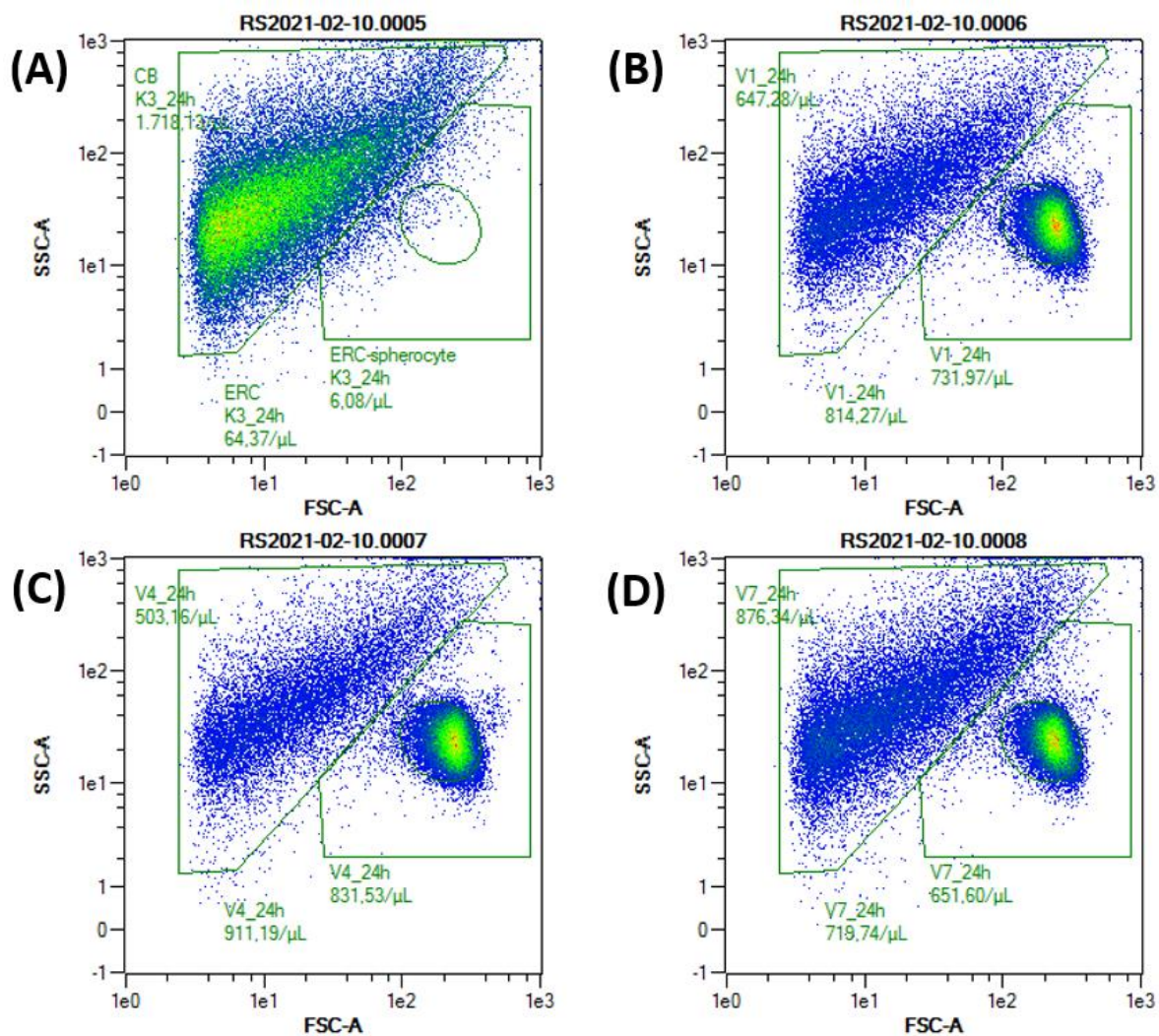
Slika 23: Razsevni diagrami pretočne citometrije.



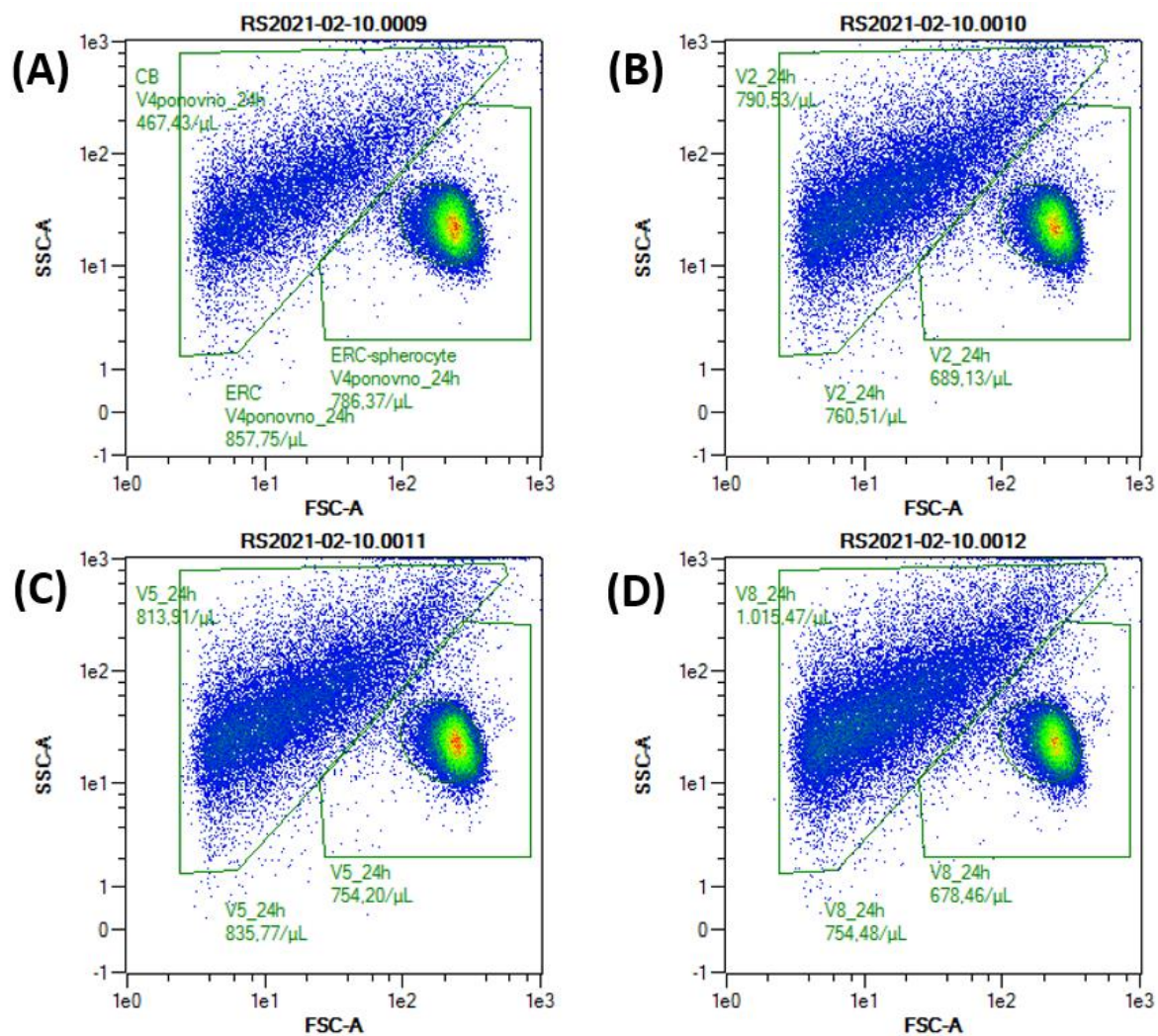
Slika 24: Razsevni diagrami pretočne citometrije.



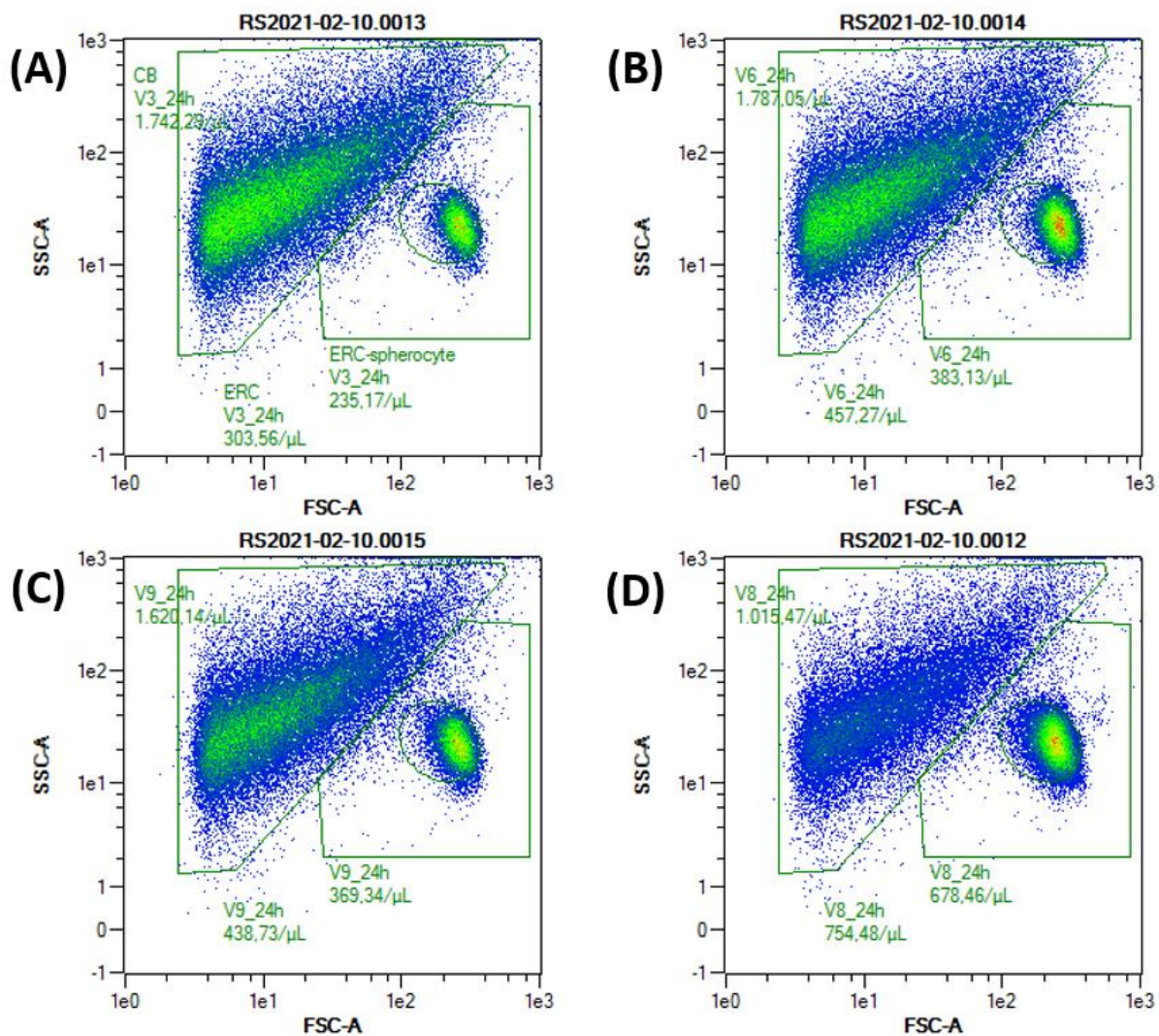
Slika 25: Razsevni diagrami pretočne citometrije.



Slika 26: Razsevni diagrami pretočne citometrije.



Slika 27: Razsevni diagrami pretočne citometrije.



Slika 28: Razsevni diagrami pretočne citometrije.