

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA**

Lado OTRIN

**VPLIV IZBRANIH MAGNETNIH NANODELCEV NA  
MORFOLOGIJO ERITROCITOV**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2014

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA**

**Lado OTRIN**

**VPLIV IZBRANIH MAGNETNIH NANODELCEV NA MORFOLOGIJO  
ERITROCITOV**

**MAGISTRSKO DELO**  
(Magistrski študij – 2. stopnja)

**THE EFFECT OF THE SELECTED MAGNETIC NANOPARTICLES ON  
MORPHOLOGY OF ERYTHROCYTES**

**M. Sc. Thesis**  
(Master Study Programmes)

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija – 2. stopnje, molekulske biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, na Odseku za sintezo materialov Inštituta Jožefa Štefana, na Kliničnem oddelku za gastroenterologijo Kliničnega centra Ljubljana ter v laboratoriju Ortopedske klinike Kliničnega centra Ljubljana.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Damjano Drobne ter za recenzentko prof. dr. Veroniko Kralj Igljč.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Damjana DROBNE  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Veronika KRALJ IGLIČ  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Laboratorij za biofiziko

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisani se strinjam z objavo svoje naloge v polnem besedilu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddal v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Lado Otrin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2

DK

KG magnetni nanodelci/biokompatibilnost/morfologija eritrocitov/SEM

AV OTRIN, Lado, dipl. biol. (UN)

SA DROBNE, Damjana (mentor)

KZ SI – 1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2014

IN VPLIV IZBRANIH MAGNETNIH NANODELCEV NA MORFOLOGIJO ERITROCITOV

TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)

OP XI, 73 str., 5 pregl., 18 sl., 5 pril., 143 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Namen magistrskega dela je bil sistematično preučiti vpliv izbranih magnetnih nanodelcev na eritrocite. Vpliv interakcij maghemitnih ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in kobaltovo-feritnih (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) nanodelcev različnih velikosti in površinskih lastnosti z eritrociti smo preučili z vrstično elektronsko mikroskopijo (SEM), testom sedimentacije in aglutinacije ter z dvema različnima pristopoma testiranja hemolize. S SEM smo opazovali morfološke spremembe eritrocitov po izpostavitvi izbranim magnetnim nanodelcem. Vpliv spremembe eritrocitne morfologije na dinamiko posedanja eritrocitov v suspenziji smo vrednotili s testom sedimentacije in aglutinacije. Stopnjo membranske destabilizacije eritrocitov smo poskušali oceniti s testoma hemolize. Opazili smo, da izpostavitvev eritrocitov  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Si-COOH ter CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CA (Citric Acid, ang.) nanodelcem vodi v odklon oblike eritrocitnih membran od diskoidne. Stopnja posedanja eritrocitov (ESR) je bila v primerjavi s kontrolo spremenjena v vseh vzorcih, ki so vsebovali testirane nanodelce, z izjemo vzorcev eritrocitov, inkubiranih z  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Si-NH<sub>2</sub> nanodelci. Vsi izbrani nanodelci razen nanodelcev  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Si-NH<sub>2</sub> so pri vsaj eni od testiranih koncentracij povzročili delež hemolize v vzorcu, višji od 5 %. S tem so prekoračili mejo, s katero je opredeljen kvarni učinek nanodelcev na eritrocite. Dobljeni rezultati omogočajo boljše razumevanje vpliva magnetnih nanodelcev na eritrocite ob intravenozni uporabi nanodelcev v biomedicini.

### KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2

DC

CX magnetic nanoparticles/biocompatibility/erythrocyte morphology/SEM

AU OTRIN, Lado, B. S. In Biology

AA DROBNE, Damjana (supervisor)

PP SI – 1000 Ljubljana, Večna pot 111

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology

PY 2014

TI THE EFFECT OF THE SELECTED NANOPARTICLES ON MORPHOLOGY OF ERYTHROCYTES

DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)

NO XI, 73 p., 5 tab., 18 fig., 5 ann., 143 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The purpose of this study was to systematically research the influence of the selected magnetic nanoparticles on erythrocytes. The impact of interactions of maghemite ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) and cobalt ferrite ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) nanoparticles of different particle sizes and surface properties with erythrocytes were investigated by scanning electron microscopy (SEM), sedimentation and agglutination assay, and two approaches to hemolysis assays. SEM was used to observe erythrocyte shape transformations under the influence of magnetic nanoparticles. The effect of altered morphology of erythrocytes on the dynamics of erythrocytes in suspension was assessed by sedimentation and agglutination assay. Hemolysis assays were used to determine the degree of destabilization of erythrocyte membranes. We observed that exposure of erythrocytes to  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-COOH}$  and  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  (Citric Acid) nanoparticles leads to erythrocyte shape transformations. The results indicate that the erythrocytes incubated with all of the selected nanoparticles with the exception of  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3\text{-Si-NH}_2$  underwent abnormal sedimentation. Dose dependant hemolysis was observed in every sample treated with magnetic nanoparticles. The results presented here provide a better understanding of the effect of selected magnetic nanoparticles on erythrocytes after intravenous injection of nanoparticles in various biomedical applications.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI).....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD) .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VII
KAZALO PRILOG .....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV.....	X
SLOVARČEK POJMOV .....	XI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 HIPOTEZA.....	3
1.2 NAMEN IN IZHODIŠČA.....	3
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>4</b>
2.1 ZGRADBA IN UPORABA MAGNETNIH NANODELCEV .....	4
2.2 ZGRADBA IN LASTNOSTI ERITROCITNE MEMBRANE V POVEZAVI Z OBLIKO CELICE .....	12
2.3 INTERAKCIJE NANODELCEV Z BIOLOŠKIMI SISTEMI.....	15
<b>2.3.1 Metode za preučevanje interakcij nanodelcev z biološkimi sistemi: Uporabljene metode.....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>27</b>
3.1 PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA TESTIRANIH NANODELCEV .....	27
3.2 IZOLACIJA IN PRIPRAVA ERITROCITOV .....	27
3.3 VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM).....	28
<b>3.3.1 Priprava in fiksacija vzorcev .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.2 Morfološka klasifikacija eritrocitov ter zajetje in obdelava mikrografij.....</b>	<b>29</b>
3.4 TEST SEDIMENTACIJE IN AGLUTINACIJE.....	30
<b>3.4.1 Nastavitev testa .....</b>	<b>30</b>

<b>3.4.2 Zajem in analiza slik</b> .....	30
<b>3.5. TEST HEMOLITIČNEGA POTENCIALA NANODELCEV</b> .....	31
<b>3.5.1. Metoda določanja prostega hemoglobina</b> .....	31
<b>3.5.2. Metoda padca absorbance eritrocitne suspenzije</b> .....	32
<b>3.5.3. Dodatna validacija uporabljenih metod</b> .....	32
<b>4 REZULTATI</b> .....	34
<b>4.1 MORFOLOŠKE SPREMEMBE ERITROCITOV PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM OPAŽENE S SEM</b> .....	34
<b>4.1.1 Vpliv <math>\text{CoFe}_2\text{O}_4</math> ter <math>\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}</math> magnetnih nanodelcev na morfologijo eritrocitov</b> 34	
<b>4.1.2 Vpliv nanodelcev MD-Si, MD-Si-COOH ter MD-Si-NH<sub>2</sub> na morfologijo eritrocitov</b> .....	37
<b>4.1.3 EDXS analiza</b> .....	40
<b>4.2 SEDIMENTACIJA IN AGLUTINACIJA</b> .....	42
<b>4.2.1 Vpliv nanodelcev <math>\text{CoFe}_2\text{O}_4</math> IN <math>\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}</math> na dinamiko posedanja eritrocitov</b> .....	42
<b>4.2.2 Vpliv nanodelcev MD-Si, MD-Si-COOH in MD-Si-NH<sub>2</sub> na dinamiko posedanja eritrocitov</b> .....	43
<b>4.3 HEMOLITIČNOST NANODELCEV</b> .....	44
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	47
<b>5.1.2. Vpliv nanodelcev <math>\text{CoFe}_2\text{O}_4</math> ter <math>\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}</math> na morfologijo eritrocitov</b> .....	50
<b>5.1.3. Vpliv nanodelcev MD-Si, MD-Si-NH<sub>2</sub> ter MD-Si-COOH na morfologijo eritrocitov</b> .....	54
<b>5.2 SKLEPI</b> .....	58
<b>6 POVZETEK</b> .....	59
<b>7 VIRI</b> .....	61

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Rezultati EDXS analiz skupkov, opaženih na površini eritrocitnih membran	40
Preglednica 2: Deleži posameznih elementov, izmerjenih na mestu 1 (Slika 14/1A) .....	40
Preglednica 3: Deleži posameznih elementov, izmerjenih na mestu 2 (Slika 14/2C).....	40
Preglednica 4: Izmerjene vrednosti deleža hemolize v vzorcu po metodi meritve padca absorbance .....	44
Preglednica 5: Izmerjene vrednosti deleža hemolize v vzorcu po metodi meritve prostega hemoglobina v supernatantu.....	45



## KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba in lastnosti magnetnih nanodelcev (Bucak, 2012: 172).....	4
Slika 2: Povzetek možnosti uporabe nanodelcev po področjih (Tsuzuki, 2009: 569).....	8
Slika 3: Primeri površinskih modifikacij magnetnega jedra nanodelcev (Bucak, 2012: 182).....	9
Slika 4: Citotoksičnost, povzročena z interakcijami nanodelcev s celičnimi komponentami (Singh in sod., 2010: 2) ...	18
Slika 5: Povzetek interakcij magnetnih nanodelcev s supermagnetnim železo oksidnim jedrom (SPION) in celico (Singh in sod., 2010: 11).....	23
Slika 6: Mikrografija naključnega predela vzorca eritrocitov, inkubiranih s PBS pri povečavi 1000X .....	34
Slika 7: Reprezentativna mikrografija naključnega predela vzorca eritrocitov, inkubiranih z nanodelci $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ pri 500X povečavi .....	35
Slika 8: Mikrografija eritrocitov, inkubiranih z nanodelci $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ , zajeta na naključnem delu vzorca .....	35
Slika 9: Delež eritrocitov s spremenjeno morfologijo kot posledico izpostavitve nanodelcem $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ (CF) ter $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (CA).....	36
Slika 10: Reprezentativna mikrografija za kontrolo ter za vzorce eritrocitov, inkubirane z nanodelci MD-Si-NH <sub>2</sub> .....	37
Slika 11: Mikrografija eritrocitov, inkubiranih z nanodelci MD-Si.....	38
Slika 12: Izbrana mikrografija vzorca eritrocitov, inkubiranih z nanodelci MD-Si-COOH .....	38
Slika 13: Delež nediskoidnih eritrocitov v vzorcih krvi po inkubaciji z različno funkcionaliziranimi nanodelci $\text{Fe}_2\text{O}_3$ .....	39
Slika 14: Analiza EDXS aglomerata nanodelcev, opaženega na površini eritrocitne membrane v vzorcu, inkubiranem z nanodelci $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ (1A, 1B) ter nanodelci $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ (2C, 2D).....	41
Slika 15: Sedimentacija eritrocitov pod vplivom nanodelcev $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ in $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ .....	42
Slika 16: Sedimentacija eritrocitov pod vplivom nanodelcev MD-Si.....	43
Slika 17: Sedimentacija eritrocitov pod vplivom nanodelcev MD-Si-COOH in MD-Si-NH <sub>2</sub> .....	44
Slika 18: Delež hemolize v eritrocitnih suspenzijah kot posledice delovanja nanodelcev $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ , MD-Si, MD-Si-NH <sub>2</sub> ter MD-Si-COOH.....	46

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Mnenje Komisije Republike slovenije za medicinsko etiko o izvajanju poskusov s humanimi eritrociti.

Priloga B: Sintezni postopek in karakterizacija maghemitnih magnetnih nanodelcev s silika ovojem.

Priloga C: Sintezni postopek kobalt feritnih magnetnih nanodelcev s silika ovojem.

Priloga D: Karakterizacija uporabljenih magnetnih nanodelcev.

Priloga E: Slikovno gradivo za pomoč pri razločevanju posameznih transformacij eritrocitne oblike.

## SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

3T3 – celična linija fibroblastov

$\Delta A_0$  – oznaka za razliko v površini zunanjega in notranjega lipidnega sloja lipidne membrane v sproščenem stanju

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  – maghemitno magnetno jedro, v delu označeno kot MD

AE1 – anionski izmenjevalec 1 (Anionic Exchanger 1, ang.)

Band 3 – glej AE1

BETA2 – transkripcijski faktor, ki uravnava izražanje gena za inzulin

CDK – od ciklinov odvisna kinaza (Cyclin Dependent Kinase, ang.)

CMDx – karboksimetil dekstran

COS-2 – fibroblastom podobna celična linija

CPR – klorpromazin

DMSA – dimerkaptosukcinilna kislina

EDXS – analiza energije rentgenskih žarkov, ki nastanejo kot posledica neelastičnega sipanja primarnih elektronov na atomih (Energy-dispersive X-ray spectroscopy, ang.)

ESR – stopnja posedanja eritrocitov (Erythrocyte Sedimentation Rate, ang.)

GSH – glutation

Hb – hemoglobin

HMDS – heksametildisilazan

HNE – 4-hidroksi-2-nonenal

KSLD – koncept sklopljenega lipidnega dvosloja

MD – glej  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$

MDA – malondialdehid

MR(I) – slikanje z magnetno resonanco (Magnetic Resonance Imaging, ang.)

NP(s) – nanodelec/nanodelci (Nanoparticle[s])

PEG – polietilen glikol

PEO – polietilen oksid

pRb – hiperfosforiliran retinoblastomski tumor supresorski protein

PVA – polivinilalkohol

PVLA – polivinilbenzil-O-B-D-galaktopiranozil-D-glukoamid

PVP – polivinilpirolidon

RAW – celična linija makrofagov

ROS – reaktivne kisikove spojine

TfR1 – transferinski receptor 1

TP – transmembranski potencial

## SLOVARČEK POJMOV

Aglutinacija	Zlepljanje delcev (celic, nanodelcev, proteinov ipd.) z drugimi bližnjimi delci zaradi medsebojnega privlaka. Produkt procesa je zlepek ali aglutinat.
Akantocita ( <i>glej Prilogo 3</i> )	Eritrocit nepravilne oblike ter neenakomerne površinske nagubanosti z neenakomerno površinsko porazdeljenimi večjimi ali manjšimi izrastki. Pojav akantocit v vzorcu označujemo z izrazom akantocitoza, transformacijo, ki vodi v to končno obliko, pa z izrazom akantoidna transformacija.
Anemija	Je pojav, ko organizem nima dovolj eritrocitov ali hemoglobina.
Anizocitoza	Pojav, pri katerem v krvnem razmazu opazimo izrazite razlike v velikosti eritrocitov.
Curie temperatura	Je kritična točka ali temperatura, pri kateri intrinzični magnetni momenti gradnikov snovi spremenijo svojo usmeritev; pride do preskoka stalni magnetizem-inducirani ali obratno.
Ehinocit ( <i>glej Prilogo 3</i> )	Eritrocit pravilne oblike ter pravilne površinske nagubanosti z značilnimi, površinsko enakomerno razporejenimi izrastki – spikulami ali bodicami. Pojav ehinocit v vzorcu opišemo z izrazom ehinocitoza, transformacijo pa z izrazom ehinoidna.
Efekt kvantnega tuneliranja	Pojav, pri katerem lahko delec zaradi lastnosti, ki izvirajo iz njegove majhnosti, najdemo na nepričakovanih mestih v snovi (npr. elektron v jedru atoma namesto v atomski ovojnici).
Efekt kvantne velikosti	Pojav, pri katerem snovi pridobijo nove, nenavadne ter za material neobičajne lastnosti, ki izvirajo iz lokalizacije večjega števila elektronov snovi na zelo majhnem prostoru v ekstremno majhnih kristalih snovi.
Eritrocitni roloji	Značilni skladi eritrocitov; pri agregaciji eritrocitov pride do vzporednih stabilizacij večjih površin krvničk, pri čemer nastanejo nizi ali skladi eritrocitov – roloji.
Koercitivnost materiala	Intenziteta zunanega magnetnega polja, ki je potrebna, da izničimo magnetizacijo danega materiala pri njegovi magnetni nasičenosti.
Photobleaching	Proces fotokemičnega razpada barvila ali fluorofora.
Poikilocitoza	Splošen izraz za eritrocite nenormalnih oblik. Izraz opisuje neobičajno velik delež (več kot 10 %) spremenjenih rdečih krvničk v celotni krvi.
Policitemija	Stanje povečanega deleža rdečih krvničk v krvi.
Sferocit ( <i>glej Prilogo 3</i> )	Eritrocit kroglaste (sferične) oblike. Iz osnovnega imena izpeljemo transformirane oblike – npr. ehinosferocit, v kolikor je površina sferocita enakomerno posejana s spikulami.
Spikula	Površinski koničast izvihek membrane oz. membranska tvorba; bodica. Bodičavost je značilna lastnost ehinocit.
Stomatocit ( <i>glej Prilogo 3</i> )	Eritrocit z odebeljenim oz. nabrekli obodom, ki mu daje značilno obliko ust ali stome.

## 1 UVOD

V zadnjem desetletju je nanotehnologija z raziskavami in izdelavo vedno večjega števila novih nanomaterialov in nanodelcev postala nepogrešljiv del tako našega vsakdanjega življenja kot tudi kozmetične in farmacevtske industrije ter medicinske stroke. Za slednji so zanimivi predvsem nanodelci s kovinskimi komponentami (kot npr. železo oksidni nanodelci), ki jim dajejo specifične magnetne lastnosti, ključne pri uporabi v diagnostične in terapevtske namene.

Načinov uporabe magnetnih nanodelcev v medicini in farmaciji je vedno več – uporabljajo se za razstrupljanje bioloških tekočin, popravila tkiv, hipotermično terapijo na malignih celicah, mestno specifične dostavne sisteme za vnos najrazličnejših učinkovin, pri imunoloških testih ter kot kontrastni agens pri magnetni resonanci (Gupta in Gupta, 2005; Neuberger in sod., 2005; Ito in sod., 2005; Mirkovic in sod., 2010).

Intenzivno se jih preučuje zaradi edinstvenih elektrokemijskih in fizikalnih lastnosti (Pankhurst in sod., 2003; Lascialfari A. in Sangregorio C., 2011) – mehanske trdnosti, odlične kemične stabilnosti, visoke magnetne anizotropije kubičnih kristalov, majhnosti (Baldi in sod., 2007) ter sposobnosti ustvarjanja toplote ter s tem segrevanja specifičnega mesta v tkivu (De Jong in sod., 2008; Kita in sod., 2011).

V fazi priprav pa so še številne druge metode, ki vključujejo uporabo omenjenih nanodelcev – magnetni nanodelci naj bi se tako uporabljali tudi kot označevalci ("markerji") za vezavo na DNA, specifične proteine, protitelesa in druge biološke molekule (Ichiyanagi in sod., 2007) ter na primer za odkrivanje in nadzor malignih celic (Tartaj in sod., 2007).

Vsi zgoraj omenjeni načini uporabe predvidevajo interakcijo nanodelcev z zelo specifično tarčno molekulo ali celico; ključno vlogo pri tem igrajo funkcionalne skupine nanodelcev, ki le-tem omogočajo specifičnost interakcij *in vivo* (Kuchelhaus in sod., 2004). Problem pa nastane pri nespecifičnih interakcijah nanodelcev s komponentami telesa, ki pa jih je pogosto težko predvideti. Zato je še toliko bolj pomembno, da se pred uporabo novega tipa nanodelca v biomedicinske namene izčrpno testira njegovo biokompatibilnost.

Intravenozni vnos nanodelcev je, poleg direktnega vnosa v tarčni predel tkiva, med najpogosteje uporabljanimi načini za vnos magnetnih nanodelcev v telo (Berry in Curtis, 2003). Krvni obtok uporabljamo kot sredstvo za transport, ki nanodelce privede do želene lokacije, pri tem pa so netarčne interakcije s komponentami krvi neizogibne.

V vsakem trenutku je v odraslem človeku približno  $2-3 \times 10^{13}$  eritrocitov, kar predstavlja kar  $\frac{1}{4}$  vseh celic v telesu. Verjetnost, da pri intravenoznem vnosu nanodelcev le-ti reagirajo z rdečimi krvnimi telesci, je tako zelo visoka. Volumenska frakcija eritrocitov je tudi veliko večja od frakcije mononuklearnih fagocitov. Nanodelci torej pridejo v kontakt z eritrociti še pred odgovorom imunskega sistema.

V kolikor do reakcije pride, je uveljavljeno prepričanje, da nanodelci ob stiku s celico najprej reagirajo z njeno membrano (Leroueil in sod., 2008). Biokompatibilnost izbranih magnetnih nanodelcev smo se odločili testirati na eritrocitih; njihova membrana je zelo odzivna na spremembe okolja – sprememba pH, temperature, osmolarnosti itd. (Rudenko, 2010), kontakt nanodelcev z eritrociti ob intravenoznem vnosu pa je neizogiben. Prav razumevanje interakcije nanodelcev s celično membrano pa je ključno pri oceni biokompatibilnosti nanodelcev (Marmorato in sod., 2011).

Zanimalo nas je, ali do kontakta nanodelcev z eritrociti po vnosu nanodelcev v krvni sistem res pride, v kolikšni meri in kako se bo to odražalo na morfologiji eritrocitov. Izbrana metoda, ki naj bi na zastavljena vprašanja pomagala najti odgovore, je bila vrstična elektronska mikroskopija (SEM, Scanning Electron Microscopy, ang.).

Nadalje nas je zanimalo, kakšen vpliv bodo te spremembe oblike, v kolikor do njih pride, imele na dinamiko eritrocitov v krvi. Pri nemoteni in optimalni izmenjavi plinov igra diskoidna oblika eritrocitov ključno vlogo, prav tako pri njihovem izstopanju in vstopanju iz in v krvožilje. S testom aglutinacije smo preverili, ali vnešeni nanodelci eritrocite zlepijo, torej ali pride do nastanka aglutinotov, test sedimentacije pa je služil prikazu dinamike posedanja eritrocitov v odvisnosti od spremembe oblike celic, pri slednjem testu pa je hitro opazna tudi hemoliza, povzročena z nanodelci, če do nje pride. Dinamika posedanja nam da tudi vpogled v (i)reverzibilnost morfoloških sprememb eritrocitne membrane.

Nazadnje smo preverili, v kolikšnem odstotku pride do tako močnega vpliva nanodelcev na membrano, da pride do nepovratne izgube integritete; torej, da celica razpade. Procent hemolize v vzorcu smo testirali z dvema metodama ter rezultate primerjali. Prav hemolitičnost je namreč ena od ključnih lastnosti nanodelcev, s katerimi je opredeljena njihova biokompatibilnost, v kolikor so predvideni za intravenozni vnos v telo.

Primerjali smo magnetne nanodelce z različnimi vezanimi funkcionalnimi skupinami ter njihov vpliv na eritrocite; poudarek je bil na pomenu naboja omenjenih skupin (-Si, -Si-COOH, -Si-NH<sub>2</sub>, -CA) pri nespecifični reaktivnosti ter moči vpliva nanodelcev na netarčne celice.

Ni še povsem jasno, kako nanodelci reagirajo z lipidnimi membranami. Najverjetneje gre za več tipov interakcij, med katere sodijo strukturne spremembe in rekonstrukcija lipidnega

dvosloja, mehanske poškodbe lipidnega dvosloja, spremembe v razmerju med površino in volumnom, vpliv na membranske proteine, interakcije s kanalčki in drugo (Lipowsky in Dobereiner, 1998; Kralj-Iglič in sod., 2002; Leroueil in sod., 2008; Wang in sod., 2008; Dawson in sod., 2009). Glede na dobljene rezultate vseh testov, izvedenih na eritrocitih, smo za konec predlagali modele interakcije za vsak tip testiranih nanodelcev posebej.

## 1.1 HIPOTEZA

Naše hipoteze so:

- magnetni nanodelci reagirajo z eritrocitnimi membranami, povzročijo strukturne spremembe in jih destabilizirajo, kar se odraža v spremenjeni morfologiji rdečih krvničk;
- nanodelci z enako kemijsko sestavo jedra in različno površino različno reagirajo z eritrociti;
- mehanizmi vpliva magnetnih nanodelcev na celice se razlikujejo, kar se odraža v različnih morfoloških transformacijah celic.

## 1.2 NAMEN IN IZHODIŠČA

Nameni naše naloge so:

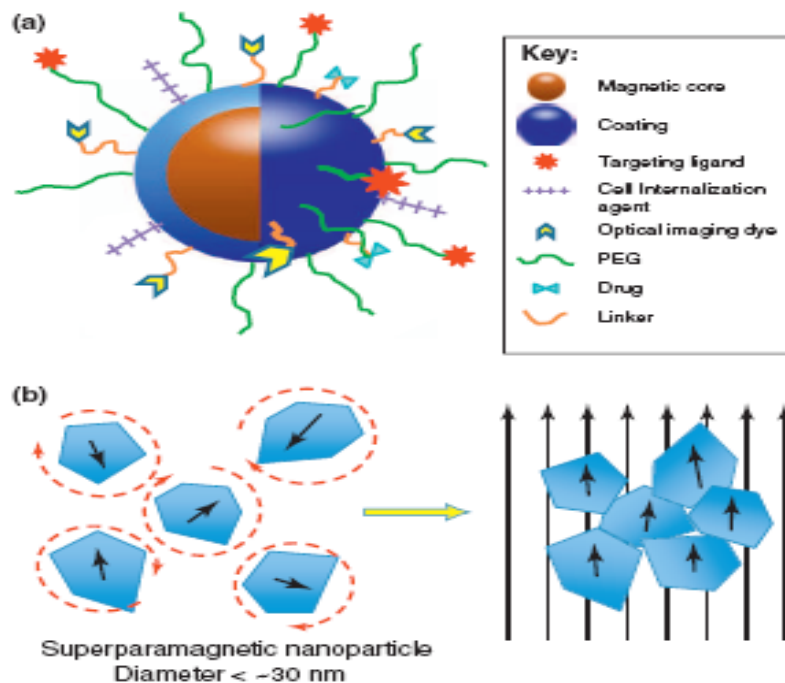
- preveriti vpliv različnih površinskih modifikacij maghemitnih in kobaltovo-feritnih nanodelcev na rdeča krvna telesa;
- testirati in oceniti biokompatibilnost izbranih magnetnih nanodelcev z eritrociti v suspenziji;
- ovrednotiti primernost metod za testiranje vpliva nanodelcev na eritrocite;
- optimizirati test hemolitičnosti nanodelcev;
- predlagati mehanizme delovanja posameznih tipov nanodelcev, ki so vodili v opažene morfološke spremembe eritrocitov.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ZGRADBA IN UPORABA MAGNETNIH NANODELCEV

Magnetni nanodelci (Slika 1) so material nanometrskih velikosti, ki vsebuje magnetne elemente (kot na primer nikelj, železo, kobalt, gadolinij, mangan ...) ter njihove feromagnetne, paramagnetne in supermagnetne zlitine, okside in kationske komplekse. Fizikalne in kemijske lastnosti magnetnih nanodelcev so večinoma odvisne od kemijske sestave nanodelcev, kristalne strukture, velikosti in oblike ter včasih od načina njihove sinteze (Wu in sod., 2010).

Poleg štirih osnovnih značilnosti nanomaterialov (efekt kvantne velikosti oz. "quantum size effect", površinski efekt, efekt majhnosti ter efekt kvantnega tuneliranja oz. "quantum tunneling effect") lahko magnetnim nanodelcem pripišemo še druge lastnosti, kot so supermagnetizem (Chen in sod., 2004), visoka koercitivnost (Vazquez in sod., 2004), nizka Curieva temperatura ter visoka magnetna susceptibilnost (Battle in Labarta, 2002).



**Slika 1: Zgradba in lastnosti magnetnih nanodelcev (Bucak, 2012: 172)**

(a) Shematski prikaz strukture magnetnega nanodelca; magnetna sredica oz. jedro je prevlečena z biokompatibilnim ovojem, nanj pa so vezane funkcionalne skupine, ki posredujejo specifičnost reakcij nanodelcev s tarčnim sistemom. (b) Ilustracija odziva superparamagnetnih nanodelcev po izpostavitvi le-teh zunanjemu magnetnemu polju. Ob odsotnosti magnetnega polja so magnetne orientacije nanodelcev naključno usmerjene (levo), po izpostavitvi nanodelcev magnetnemu polju pa se nanodelci orientirajo v skladu s smerjo le-tega. Reorientacija kristalov zviša opaženo magnetno dovzetnost ter vodi v visoko nasičeno magnetizacijo nanodelcev v materialu.



Magnetni nanodelci so zaradi svojih lastnosti pogosto uporabljani pri raznih katalizah, v mineralogiji in rudarski industriji (selekcija in čiščenje mineralov), v informatiki (mikročipi, shranjevanje podatkov), v ekologiji in pri zaščiti okolja (vezava ter odstranjevanje polutantov) ter v biomedicini (Takafuji in sod., 2004; Jeong J. in sod., 2006; Xu in sod., 2006).

V zadnjem desetletju je področje nanotehnologije napredovalo do te mere, da je mogoče zasnovati, karakterizirati ter funkcionalizirati nanodelce za širok spekter uporabe (slika 2); vedno pogosteje so nanodelci v uporabi v kozmetičnih izdelkih – kot prenašalci nanje vezanih učinkovin, posredniki liposomskih suspenzij, vlažilci ter agensi za obarvanje izdelkov (predvsem titanov dioksid) – nanodelce dodajajo kremam, šamponom, detergentom, premazom ipd. (Gwinn in Vallyathan, 2006). Za industrijo materialov so zanimivi predvsem nanodelci iz kovinskih in keramičnih oksidov ter nanodelci iz ogljika in kremenca – ti služijo izdelavi najrazličnejših sestavljenih materialov, fotokemičnih aktivnih površin, površinskih prevlek in premazov, polprevodnikov, delov v elektroniki in podobno (Veranth in sod., 2007). Zelo zanimiv primer (specifičnosti) uporabe magnetnih nanodelcev v ekologiji pa je odstranjevanje težkih kovin iz okolja. Onesnaženje s strupenimi kovinskimi ioni ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  ...) postaja v zadnjem času resen zdravstveni in okoljski problem (Singh, 2011) – za razliko od organskih onesnaževalcev težke kovine niso biorazgradljive, zato se v okolju kopičijo in povzročajo zastrupitve (Ge, 2012). Da bi se z rastočim problemom okoljske onesnaženosti uspešneje soočali, so v izdelavi nove metode čiščenja, ki temeljijo na uporabi posebej v ta namen zasnovanih nanodelcev. Yantasee in sod. (2007), Li in sod. (2011) ter Liu in sod. (2008) se ukvarjajo s sintezo nanodelcev z magnetitnim jedrom ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) za odstranjevanje ionov  $\text{Pb}^{2+}$  iz vodnih suspenzij, medtem ko se Hakami in sod. (2012), Dong in sod. (2008), Girginova in sod. (2010) ter Parham in sod. (2012) ukvarjajo z uporabo omenjenih nanodelcev pri odstranjevanju  $\text{Hg}^{2+}$  iz vode. Pozornost pa je usmerjena tudi k kobalt feritnim nanodelcem ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) za namen odstranjevanja različnih ionov težkih kovin, kot so  $\text{Au}^{3+}$  in  $\text{Ag}^+$  (Jainae in sod., 2010),  $\text{As}^{3+}$  in  $\text{As}^{5+}$  (Zhang, 2010) ter  $\text{Hg}^{2+}$  ionov (Song, 2011).

Največ denarja pa se vlaga v razvoj nanodelcev za potrebo biomedicine (Tartaj in sod., 2007) – za uporabo magnetnih nanodelcev v biomedicini so zanimive predvsem tri lastnosti nanodelcev:

- 1.) Velikost. Magnetni nanodelci so razpona velikosti od nekaj nanometrov pa do nekaj deset nanometrov, kar je manjše ali primerljivo z velikostjo celic (10–100  $\mu\text{m}$ ), virusov (20–450 nm), proteinov (5–50 nm) ter dvojne vijačnice DNA (2 nm širine). Zaradi svoje majhnosti magnetni nanodelci lažje dostopajo do tkiv ter posameznih telesnih entitet, z njimi pa tudi lažje interagirajo.

- 2.) Magnetizem. Magnetni nanodelci se podrejajo Coulombovemu zakonu magnetizma in z njimi z lahkoto manipuliramo pod vplivom zunanega magnetnega polja (Slika 1 b). Ta možnost interakcije na daljavo v kombinaciji s prodornostjo magnetnega polja omogoča razvoj novih metod, ki vključujejo transport in lokalno imobilizacijo z magnetnimi nanodelci označenih bioentitet v tkivih (kot npr. dostava protitumorskih učinkovin v tarčno tkivo).
- 3.) Produkcija toplote. Ob zunanji ekscitaciji magnetnih nanodelcev z magnetnim poljem so nanodelci sposobni prevzema ekscitacijske energije ter njenega oddajanja na tarčnem mestu v obliki toplote. To lastnost s pridom izkoriščamo npr. pri uporabi magnetnih nanodelcev kot komplement kemo- ter radioterapiji; s segrevanjem lahko tarčno tkivo, gmoto malignih rakastih celic, uničimo (Tartaj in sod., 2007).

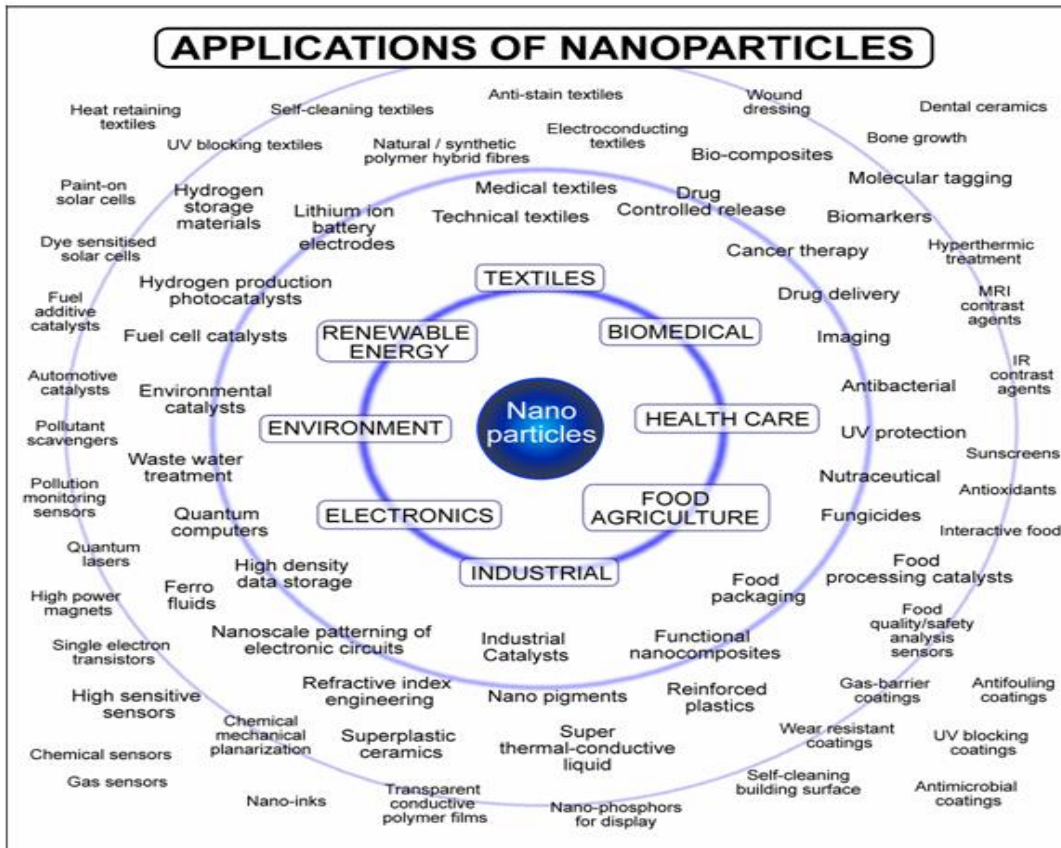
Zgoraj naštete lastnosti magnetnih nanodelcev omogočajo širok spekter njihove uporabe v biomedicini, na primer pri:

- a.) Celični terapiji; magnetni nanodelci se npr. uporabljajo za označevanje, ločevanje in čiščenje populacij celic (Arbab in sod., 2003).
- b.) Popravilu tkiv; z vezavo na magnetne nanodelce lahko v tkiva vnašamo encime, rekombinantno DNA, zdravilne učinkovine, možna pa je tudi vezava in vnos celic, kot npr. zarodnih celic v poškodovana tkiva ali pa elementov ekstracelularnega matriksa ter veziva pri znižani tkivni integriteti (Park in sod., 2002).
- c.) Tarčnih dostavnih sistemih za vnos učinkovin; učinkovitost nanodelcev je v tem primeru odvisna in pogojena s površinskimi modifikacijami, naštetimi v nadaljevanju, funkcionalizacijo nanodelcev ter z vezanimi konjugati (Ramchand in sod., 2001).
- d.) Magnetni resonanci kot kontrastno sredstvo; zaradi akumulacije nanodelcev v tarčnih tkivih je te lažje opaziti pri magnetni resonanci, na nanodelce pa lahko vežemo tudi barvila, označevalce ter npr. stabilizatorje kontrasta (Roger in sod., 1999; Na in sod., 2009).
- e.) Magnetni hipertermiji; izkoriščamo sposobnost nanodelcev, da ob vzbujanju z zunanjim magnetnim poljem le-ti prejeto energijo v okolje sproščajo v obliki toplote (glej točko 3 pri lastnostih nanodelcev, zanimivih za uporabo v biomedicini) (Yan in sod., 2005).
- f.) Magnetofekciji; gre za vnašanje DNA, RNA ali posameznih nukleotidov na tarčno mesto. Pri tem je potrebno želeno vnašano molekulo predhodno konjugirati na površino nanodelca oz. zajeti v liposom ali jedro nanodelca v primeru vnosa v lipidni ovojnjini ter nanodelcev z biorazgradljivim ovojem (Reimer in sod., 1996; Pankhurst in sod., 2003).

g.) Kot biosenzorji; nanodelci so specifično označeni ali imajo vezan biokonjugat, ki posreduje specifično reakcijo na tarčnem mestu s tarčno komponento ali molekulo (Baselt in sod., 1998).

Park in sod. (2002) so razvili sistem z oligonukleotidi označenih nanodelcev. Po prepoznavi tarčnega DNA zaporedja (običajno gre za sekvenco, povezano z nekim patološkim stanjem) pride do agregacije omenjenih nanodelcev, s tem pa do spremembe barve suspenzije. Opisana metoda omogoča prepoznavo tarčne DNA brez uporabe PCR (Polymerase chain Reaction, ang.) – metode, ki je trenutno ključna pri iskanju okvarjenih sekvenc genov.

Za področje bioslikanja ("bioimaging") sta pomembna dva tipa nanodelcev: kvantne pike pri optičnem slikanju ter magnetni nanodelci, v uporabi pri slikanju z magnetno resonanco (MRI). Značilna karakteristika kvantnih pik, z razvojem katerih se ukvarja Wang s sodelavci (2007), je stabilna emisija fluorescence v ozkem območju; za razliko od nanodelcev pri organskih barvilih prihaja do postopnega fotokemičnega uničenja barvila oz. fluorofora (efekt poznan kot "photobleaching"). Kirsch in sod. (1991) pa so zasnovali magnetne nanodelce, ki po vnosu v tarčno tkivo služijo kot kontrastni agens v primeru slabega kontrasta tkiva, opazovanega z MRI.



Slika 2: Povzetek možnosti uporabe nanodelcev po področjih (Tsuzuki, 2009: 569)

Nanotehnologija je omogočila tudi napredek pri razvoju tarčnih dostavnih sistemov za najrazličnejše učinkovine. Raziskovalci izkoriščajo polimerne površinske plasti nanodelcev za enkapsulacijo zelenih učinkovin, ki bi se v sistemu sprostile pri točno določenih pogojih. Hong s sodelavci (2004) je na primer pripravil kationske zlate nanodelce, vezane na hidrofobno učinkovino. Kationska površina nanodelcem omogoča penetracijo v celico, visoka znotrajcelična koncentracija glutationa (GSH) pa v celici sproži sprostitvev učinkovine iz nosilca.

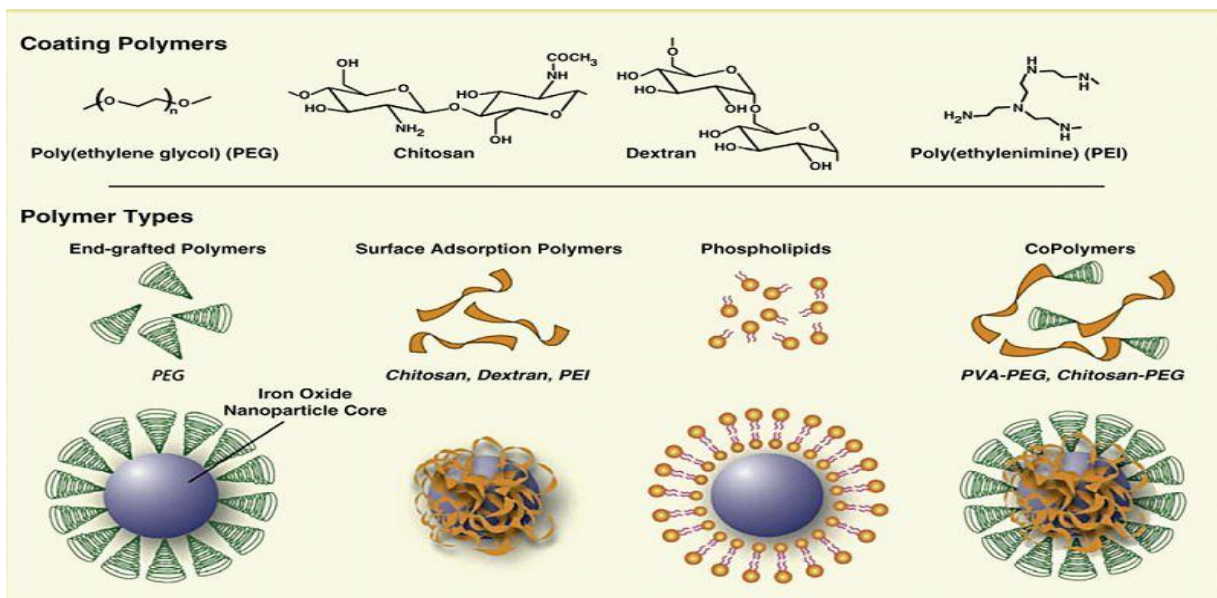
Nanodelci, uporabljeni pri zgoraj naštetih terapevtskih aplikacijah, morajo biti biokompatibilni, površina nanodelcev mora biti ustrezno funkcionalizirana glede na želeno interakcijo (interaktivna funkcionalizacija), morajo pa biti tudi visoko magnetno nasičeni.

Preden lahko površino omenjenih nanodelcev primerno funkcionaliziramo z različnimi bioaktivnimi molekulami, moramo nanodelce modificirati z nekaj atomskimi plastmi organskega polimera, s kovinami (npr. z zlatom) ali s plastmi oksidov (npr. silikatni ovoj) (Berry in Curtis, 2002).

Površinski ovoj nanodelcev lahko povsem spremeni njihove lastnosti; vpliva lahko na razpolovni čas nanodelcev pred odstranitvijo iz sistema, specifičnost interakcij nanodelcev s sistemom, ovoj pa lahko diktira tudi hitrost ter obseg privzema (internalizacije) nanodelcev v celice (de Haen in sod., 2001).

Glede na predviden način uporabe tipa nanodelcev jih lahko površinsko modificiramo (Slika 3). Med tipe površinskih modifikacij magnetnih nanodelcev uvrščamo npr. imobilizacijo organskih polimerov, nepolimerov, anorganskih molekul ter imobilizacijo ligandov tarčnih molekul. Pogosto uporabljeni agensi pri modifikacijah površine nanodelcev so polietilen glikol (PEG) (Zhang Y. in Zhang J., 2007), glukozan, polivinilpirolidon (PVP), karboksimetil dekstran (CMDx) (Clement in sod., 2005), alifatske kisline, polivinilalkoholi (PVA) (Kim in sod., 2006), peptidi, hitozan, metilsilani ter lipidi npr. liposomi ipd. Preko površinskih modifikacij pa lahko na nanodelce vežemo različne biokonjugate, kot na primer encime, protitelesa, celice, DNA in RNA (Phanapavudhikul in sod., 2008).

Naštete površinske modifikacije izboljšujejo biokompatibilnost magnetnih nanodelcev, zmanjšujejo agregacijo, preprečujejo absorpcijo proteinov na nanodelce, podaljšujejo retenzijski čas nanodelcev v krvožilju, znižujejo toksičnost nanodelcev ter izboljšujejo specifičnost interakcij nanodelcev z okoljem. Posledično je razširjenost uporabe magnetnih nanodelcev v biologiji in medicini zelo visoka.



**Slika 3: Primeri površinskih modifikacij magnetnega jedra nanodelcev (Bucak, 2012: 182)**

Slika prikazuje različne načine nanosa izbranih molekul na površino nanodelca – kovalentno vezavo polietilen glikola, površinsko adsorpcijo hitozan, dekstran, PEI in podobnih molekul ter stabilizacijo fosfolipidnega sloja na magnetno jedro nanodelca (sivo-vijolično), ovoj pa je lahko tudi kombiniran.

Magnetne lastnosti nanodelcev same po sebi niso dovolj, da bi bili nanodelci primerni za uporabo v biomedicini; preden to postanejo, je potrebno rešiti vprašanje koloidne stabilnosti, citotoksičnosti in specifičnosti za tarčne vezave (Villanueva in sod., 2009; Gupta in Gupta, 2005). Omenjene zahteve motivirajo številne znanstvenike pri iskanju novih ovojev, ki bi omogočali koloidno stabilnost nanodelcev na podlagi steričnih in/ali elektrostatskih odbojnih interakcij med nanodelci.

Predn nanodelci postanejo primerni za uporabo v biomedicini, morajo izražati koloidno stabilnost v bioloških medijih. Z izrazom koloidna stabilnost označujemo sposobnost suspenzije nanodelcev upiranja aglomeraciji in posledično percipitaciji. Koloidni sistemi nanodelcev, predvideni za uporabo v biomedicini morajo biti netoksični, dolgo obstojni pri shranjevanju, pomembno pa je tudi, da take koloide lahko steriliziramo (npr. z avtoklaviranjem) brez vplivov na njihovo funkcionalnost (De Jong in Borm, 2008).

"Goli" nanodelci oz. nanodelci v svoji izvorni obliki so pri fizioloških pogojih praviloma nestabilni, zato jih je potrebno prevleči z biokompatibilnimi polimeri, ki zvišujejo stabilnost nanodelcev. Stabilnost koloida je odvisna od ravnotežja privlačnih in odbojnih sil, do katerih prihaja med nanodelci v ferofluidu; v nadaljevanju sledi krajši povzetek dinamike koloidov, saj je ta tudi ozadje agregacije naših testiranih nanodelcev in posledično, razlik v citotoksičnosti.

Zaradi delovanja van der Waalsovih sil, njihov vpliv je še posebej močan pri kratkih razdaljah, prihaja do medsebojnega privlaka nanodelcev v suspenziji, poleg tega pa je za magnetne nanodelce značilna še magnetna interakcija, ki pa je učinkovita tudi na daljše razdalje. Privlačnost med nanodelci je ne nazadnje lahko tudi posledica prisotnosti drugih topljencev v mediju, npr. molekul z visoko molekulsko maso – pojavu pravimo deplecijska flokulacija. Nanodelci so v fizioloških suspenzijah obkroženi z molekulami topila ter ostalih topljencev, ki v nanodelce ne morejo penetrirati. Ko sta površini nanodelcev oddaljeni za približno premer manjšega, se pojavi privlačna interakcija, ko pa se nanodelca dotikata s površinama, začnejo v njiju trkati molekule topila ter topljencev, kar nanodelca občutita kot privlačno silo. Prav tako bližina nanodelcev ustvari več razpoložljivega prostora – zmanjša se prosta energija sistema, entropija pa se poveča (Witten, 2004).

Privlačnim silam med nanodelci v suspenziji nasprotujejo odbojne; med enako nabitimi površinami nanodelcev prihaja do elektrostatskih odbojev, med površinami nanodelcev, prekritimi z ovoji polimerov, pa prihaja tudi do steričnih in osmotskih odbojev.

V kolikor prevladajo privlačne sile med nanodelci v suspenziji, je njihovo površino potrebno prilagoditi s plaščem primerne odbojnosti, ki bo nasprotovala agregaciji. Stabilnost suspenzije sama po sebi še ni dovolj. V bioloških sistemih morajo nanodelci ostati koloidno stabilni tudi pri različnih ionskih jakostih ter pri širokem razponu pH, v krvožilju pa se morajo upirati še

absorbiciji na proteine. Pri na primer aplikaciji nanodelcev v dostavnih sistemih z oralno vstopno točko, mora suspenzija nanodelcev, preden dospe na tarčno mesto, zdržati kislost želodca, vezano učinkovino pa mora biti sposobna sprostiti pri bolj nevtralnem pH črevesa, kjer je učinkovina absorbirana v krvožilje (Peppas in sod., 2000).

Za lažje razumevanje pomena površinskih modifikacij v tehnologiji nanodelcev si bomo v nadaljevanju pogledali primere različnih ovojev nanodelcev ("coatings") ter novo pridobljene lastnosti nanodelcev, posedovane z ovojem.

Ovoji nanodelcev morajo ferofluidom (koloidi feromagnetnih delcev in nosilne tekočine) zagotavljati stabilnost, hkrati pa morajo biti za sistem tudi nestrupeni; na področju testiranja potencialne strupenosti ovoja nanodelcev je bilo narejenih kar nekaj študij. Goodman in sod. (2004) so v svoji študiji dokazali zmerno toksičnost kationskih nanodelcev, medtem ko so se anionski nanodelci izkazali za netoksične. Izsledki njihove študije so pokazali, da so nanodelci, funkcionalizirani s kvartarnim amonijakom, rahlo toksični za fibroblastom podobno celično linijo (COS-2) ter za rdeče krvničke, medtem ko toksičnosti ni bilo opaziti pri nanodelcih, funkcionaliziranih s karboksilnim ovojem. Nadalje, Pisanic s sodelavci (2007) je pri nanodelcih, prevlečenih z dimerkaptosukcinilno kislino (DMSA), opazil od doze odvisno toksičnost za nevrone, po drugi strani pa so Wilhelm in sod. (2003) dokazali netoksičnost nanodelcev z DMSA ovojem za HeLa (rak matrnicega vratu) celične linije ter za RAW makrofage (z Abelson levkemija virusom transformirana celična linija). Našteti primeri služijo kot ilustracija pomena ter kompleksnosti izbire primerne površinskega ovoja pred uporabo nanodelcev v biomedicinskih aplikacijah.

Primerov, ki pričajo o pomenu skrbne izbire ovoja nanodelcev glede na namen uporabe, pa je še kar nekaj. Bhattari s sodelavci (2008) je površino nanodelcev modificiral z N-heksanoil hitozanom, kar je omogočilo privzem le-teh v makrofage RAW ter s tem testiranim nanodelcem dalo nov potencial za uporabo pri MR ter pri označevanju celic. Yoo in sod. (2007) so si zadali ustvariti primeren ovoj, ki bi omogočal tarčno internalizacijo nanodelcev v podganje hepatocite *in vivo*. Nanodelce so prevlekli s polivinilbenzil-O-B-D-galaktopiranosil-D-glukoamidi (PVLA). Ovoj nanodelcev vsebuje ostanke galaktoze, katere so sposobni prepoznati asialoglikoproteinski receptorji, prisotni na membranah hepatocit – internalizacija je bila uspešna.

Pri pripravi suspenzij nanodelcev pa moramo biti pozorni tudi pri izbiri medija, v katerem bomo nanodelce suspendirali – v osnovi so spremembe koloidne suspenzije, pogojene z izbiro medija naslednje:

- V mediju prihaja do absorpcije/desorpcije molekul na površino oz. iz površine nanodelcev → spremenijo se površinske lastnosti nanodelcev, kot so naboj, hidrofilnost ipd. → spremeni se koloidna stabilnost (aglomeracija).
- Z medijem pogojeno povišanje ionske jakosti zniža zeta potencial nanodelcev → poslabšanje koloidne stabilnosti.
- Delci se lahko v izbranem mediju raztapljajo oz. z njim kemijsko reagirajo.

Prednosti nanotehnologije družba s pridom izkorišča, ne smemo pa pozabiti, da so toksični učinki nanodelcev na zdravje ljudi še v veliki meri neraziskani (Drobne, 2007).

Pri naši študiji smo uporabili magnetne nanodelce z maghemitnim ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) ter nanodelce s kobalt feritnim ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) magnetnim jedrom. Zanje veljajo vse zgoraj opisane lastnosti, ki so splošno veljavne za magnetne nanodelce. Način uporabe nanodelcev je v veliki meri odvisen od funkcionalizacije nanodelcev – v zgornjem besedilu je podrobno opisan tudi njen pomen. Zaradi naštetega menimo, da vsak posamezen uporabljen tip nanodelcev ne potrebuje samostojne predstavitve, primeri uporabe pa so prav tako kot lastnosti nanodelcev podani v zgornjem besedilu.

## 2.2 ZGRADBA IN LASTNOSTI ERITROCITNE MEMBRANE V POVEZAVI Z OBLIKO CELICE

Pri fizioloških pogojih normalen eritrocit zavzame bikonkavno diskoidno obliko. Znani so dejavniki, ki omenjeno obliko lahko reverzibilno spremenijo, pri čemer pa volumen in površina celic ostajata nespremenjena (Wong, 2005; Hoffman, 2004). Tako npr. visok pH, povišanje deleža holesterola, visoka ionska jakost, bližina steklenim površinam ter pomanjkanje ATP eritrocite vodi v ehinoidne transformacije oblike z za tip transformacije značilnimi konveksnimi formacijami na površini membrane, t. i. spikulami. Nasprotno, drugi dejavniki, med drugim nizke koncentracije soli, nizek pH, nizek delež holesterola ter prisotnost kationskih amfipatov, sprožijo stomatoidne morfološke transformacije eritrocitov.

Sheetz in Singer (1974) sta zasnovala model (koncept) sklopljenega lipidnega dvosloja (v nadaljevanju KSLD), s katerim sta poskušala razložiti opažene transformacije eritrocitne oblike kot posledico razlike v velikosti površine zunanega sloja membrane napram notranjemu. Vpliv agensov na morfologijo eritrocitov pa so opisali s spremembami  $\Delta A_0$ . V sproščenem stanju razliko v površini notranjega in zunanega lipidnega sloja označimo z  $\Delta A_0$ ; v kolikor pride do povečanja površine zunanega sloja napram notranjemu, sprememba celice vodi v formacijo ehinocitnih spikul, omenjeno spremembo pa opišemo kot povišanje  $\Delta A_0$ . Nasprotno, povečanje



površine notranje membranske plasti v primerjavi z zunanjo celico vodi v formacijo vdolbin, torej stomatoidnih oblik, pojav pa lahko opišemo kot znižanje  $\Delta A_0$ .

Koncept sklopljenega lipidnega dvosloja se je izkazal za uspešnega pri razlagi diskoidne in stomatidne oblike eritrocita, ter ustreznih sprememb oblike zaradi delovanja okoljskih dejavnikov (Chi in sod., 1990; Iglič in sod., 1998; Lange in sod., 1982; Farrell in sod., 1985), ena od pomanjkljivosti tega modela pa je, da nezadovoljivo pojasni spremembe oblike membrane, povzročene s spremembo pH ter ionske jakosti medija (Gedde in sod., 1995; Gedde in sod., 1997; Gimsa in sod., 1995; Rasia in sod., 1998). Za razlago ehinocita pa je bilo potrebno model dopolniti z upoštevanjem strižne in natezne elastičnosti submembranskega citoskeleta (Iglič, 1997; Lim in sod., 2002; Mukhopadhyay in sod., 2002).

Pri zunanjih vrednostih pH pod vrednostjo pH 6.0 membranska ukrivljenost postane negativna (stomatocite), pri vrednostih nad pH 8.0 pa ukrivljenost postane pozitivna (ehinocite). Poskusi so pokazali (Gedde in sod., 1995), da sprememba znotrajceličnega pH celico vodi v spremembo oblike, medtem ko sprememba deleža vode v celici ter deleža klora morfoloških transformacij ne povzroči. Gedde in sod. (1997) je na podlagi omenjenega izpeljal sklep, da znižanje znotrajceličnega pH zniža  $\Delta A_0$  membranskega dvosloja, medtem ko zvišanje znotrajceličnega pH zviša  $\Delta A_0$ . Problem pa še vedno ostaja isti – molekulske strukture, odgovorne za razlike v  $\Delta A_0$  ostajajo večinoma nepoznane.

Še posebej zanimiva je narava morfoloških transformacij pri stalnem volumnu, ki jih predvideva model KSLD, torej reverzibilnost transformacij, hitrost, s katero do transformacij pride, neuniformnost transformacij v odvisnosti od koncentracije transformacijskega agensa (torej, višja konc. agensa ne vodi v višji delež celic s transformirano obliko membrane) ter obstoj vmesnih stanj. Znano je, da do sprememb oblike pride izjemno hitro, v nekaj sekundah, spremembe pa so ob odstranitvi agensa, ki jih je povzročil, reverzibilne; celica torej zavzame izvorno obliko (Hoffman, 1987; Ponder, 1948). Do spontane povrnitve izvorne oblike pa lahko pride tudi v primeru, ko je agens, ki je celice transformiral, še vedno prisoten (Alhanaty in sod., 1981); avtor sklepa, da je prišlo do privzetja agensa v celice ter do ravnovesne porazdelitve slednjega, s čimer se je zmanjšal učinek agensa na lipidni dvosloj. Khodadad in sod. (1989) so opazili, da se izpostavitve eritrocitov nizkim koncentracijam klorpromazina (CPR) izraža v diskoidnosti, medtem ko se izpostavitve visokim koncentracijam agensa izraža v stomatoidnosti. Zanimivo je tudi dejstvo, da lahko npr. z agensi povzročene ehinoidne transformacije "prekličemo" z uporabo agensov, ki sprožijo nativno, diskoidno transformacijo – eritrocitom, tretiranim z natrijevim salicilatom (ehinoidogeni agens) lahko ob dodatku klorpromazina povrnemo normalno morfologijo (Chabanel in sod., 1987).

Morfološke transformacije so poleg neposrednih lahko tudi posredne. Znani so primeri, pri katerih je izpostavitve eritrocitov stomatocitogenemu agensu v začetku vodila v ehinocitozo, sčasoma pa je prišlo do vzpostavitve večinske stomatocitoze; do transformacije je torej prišlo preko vmesne faze (Daleke in Huestis, 1985, 1989). Poleg vmesne faze pa lahko do končnega stanja pride z rahlim zamikom v času – za nekatere testirane stomatoidogene amfifile se je izkazalo, da celice vodijo v stomatoidne transformacije po preteku kratkega časovnega intervala, v katerem sprememb oblike ni opaziti (Isomaa in sod., 1987). Hartmann in Glaser (1991) pa sta v svojem delu navedla primer tristopenjske transformacije oblike eritrocitov; po izpostavitvi CPR zelo hitro pride do stomatocitoze, ki ji sledi preobrat oblike celic v diskoidno ali ehinocitno, nakar čez nekaj časa ponovno opazimo preskok v stomatoidnost. Na podlagi opazanj prevladuje prepričanje, da v kolikor do vzpostavitve končnega stanja pride po prehodu vsaj enega vmesnega, bomo med stanjema opazili diskoidno transformacijo. Do direktnega preskoka iz stomatoidnosti v ehinoidnost naj torej ne bi prihajalo.

Številni avtorji so v svojih delih predlagali, da aktivno, ter morda tudi glavno, vlogo pri nadzoru transformacij celične oblike igrajo membranski proteini (Gimsa in sod., 1995; Wong, 1999; Betz in sod., 2007). Wong je v svojem delu iz leta 1999 prišel do zaključka, da večina amfifilnih spojin, če ne vse, vplivajo na spremembo eritrocitne morfologije preko spremembe konformacije Band 3 proteinskega kompleksa (ali anionskega izmenjevalnega kompleksa 1, AE1). Tako je npr. znano, da so Band 3 substrati (kot so arsenat, nitrat, jodid, vanadat in oksalat) ter specifični inhibitorji Band 3 (kot so dipiridamol, DIDS in DNDS) ehinocitogeni (Bifano in sod., 1984; Hoefner in sod., 1997; Schwarz in sod., 1999). Model membranskih proteinov predvideva, da je membranski skelet s svojo visoko konformacijsko fleksibilnostjo ključen za celično morfologijo, konformacija citoskeleta pa je določena s konformacijo Band 3 membranskega proteinskega kompleksa. Opisana funkcija membranskega skeleta je v skladu s hipotezo, da imajo proteini pri zagotavljanju celične oblike bolj pomembno vlogo, kot asimetrija lipidnega dvosloja (Elgsaeter in sod., 1986; Nakao, 2002). Proteinski model predvideva tudi spremembo oblike s spremembo pH in ionske sestave, saj je konformacija Band 3 odvisna od Donnanovih ravnovesnih razmerij  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$  in  $\text{H}^+$ , na katere pa vplivata pH in ionska jakost. V literaturi zasledimo tudi alternativne razlage morfoloških sprememb, predvsem ehinocitoze, pri katerih avtorji navajajo, da citoskelet ključne vloge ne igra. Slednje naj bi imel lipidni dvosloj ter napetosti zaradi lokalnih površinskih razlik, struktura citoskeleta pa naj bi se samo prilagajala obrisu zgoraj ležečega lipidnega dvosloja (Khodadad in sod., 1996; Lange in sod., 1982).

Tudi Gimsa in Reid (1995) sta predlagala, da je morfološka transformacija eritrocitov v odvisnosti od pH posledica konformacijskih sprememb Band 3 proteina, saj do sprememb pride prehitro, da bi jih lahko pripisali oz. razložili s prerazdelitvijo fosfolipidov lipidnega dvosloja, kar pa s svojimi opaznanji potrjuje tudi Betz in sod. (2007). Omeniti velja, da noben od obeh

modelov ne nasprotuje konceptu sklopljenega lipidnega dvosloja, razlikujeta se le v pomenu za transformacijo oblike, ki ga pripisujeta posameznim membranskim komponentam – Wongov model predvideva ključno vlogo konformacije citoskeleta, medtem ko Gimsa ključno vlogo pripisuje konformacijskemu stanju membranskih proteinov. Modela pa si nasprotujeta – pri Wongovem modelu tako npr. navzven odprta konformacija AE1 vodi v stomatoidnost, medtem ko taka konformacija AE1 pri modelu Gimse vodi v ehinoidnost.

Transmembranski potencial (TP) je še eden od parametrov, za katerega se je predvidevalo, da vpliva na obliko celic (Glaser in sod., 1987; Glaser in sod., 1998), izkazal pa se je za kontraverznega, saj so drugi avtorji povezavo med spremembo TP in celično obliko v svojih študijah ovrgli (Gedde in Huestis, 1997; Tachev in sod., 2004; Rudenko, 2009), mehanizem odgovoren za spremembe, opažene v Glaserjevi študiji, pa ostaja neznan.

Za konec pa navajam še zanimiv primer rezultatov študije, ki pa jih je težko razložiti s konceptom sklopljenega lipidnega dvosloja.

Schwarz in sodelavci (1999) so dokazali, da izpostavitve eritrocitov ponavljajočim električnim pulzom ter 20-urna inkubacija celic na 37 °C po elektroporaciji povzročita močne membranske modifikacije, rezultat katerih so diskoidne celice z novopridobljeno lastnostjo – odporne so na številne dejavnike, ki sicer povzročajo transformacijo oblike. Tako npr. ligandi Band 3 proteina, bazičen pH, metabolno izčrpavanje, stik s stekleno površino, električni pulzi ter drugo ne vodijo v transformacijo oblike eritrocitov, tretiranih na zgoraj opisan način. Razlaga fenomena, ki jo predlagajo avtorji je ta, da po izpostavitvi eritrocitov električnim pulzom pride do popolne simetrizacije fosfolipidov, medtem ko so transformacije oblike povezane ravno z asimetrično naravo lipidnega dvosloja. Schwarzovi poskusi so bili izvedeni na modificiranih, naluknjanih eritrocitih (in ne na nativnih), pri katerih je morda onesposobljen kateri od sistemov, ki narekujejo obliko celice. Prav zaradi tega dejstva je še vedno v veljavi koncept sklopljenega lipidnega dvosloja, s katerim je mogoče razložiti večino membranskih transformacij nativnih eritrocitov pri fizioloških pogojih.

### 2.3 INTERAKCIJE NANODELCEV Z BIOLOŠKIMI SISTEMI

Pomembna lastnost nanodelcev, ki jim omogoča tako dobro in učinkovito porazdelitev po sistemu, je sposobnost, da prečijo biološke bariere, kot so epiteli in endoteli npr. krvnih žil, prebavnega trakta ter placent. Nadalje, nanodelci uspešno prehajajo v notranjost celic, celičnih organelov, kljubujejo encimski razgradnji, fagocitnemu požiranju, toku krvi, hidrostatskemu pritisku ter ionskim in molekulskim črpalkam, ki npr. zdravila iz celic z lahkoto odstranjujejo (Sanhai in sod., 2008).

Predpogoj za uspešnost zgoraj omenjenih bioloških aplikacij so fizikalno-kemijske lastnosti nanodelcev, ki morajo biti pri uporabi nanodelcev v biomedicinske namene posebej prilagojene želenim tarčnim interakcijam med celico in nanodelci. Na primer, pri uporabi nanodelcev pri procesu zajemanja slik tkiva ali delov tkiva ("imaging"), pri nanosenzoriki in pri uporabi nanodelcev za ločevanje oz. separacijo tkivnih komponent je nujno, da se nanodelci selektivno vežejo/interagirajo le s tarčno celico/celično komponento. Po drugi strani pa nekatere metode uporabe nanodelcev v terapevtske namene zahtevajo internalizacijo nanodelcev v tarčne celice ali celo lokalizacijo v specifične znotrajcelične predele (Bareford in Swaan, 2007).

Velika ovira, ki zavira hitrost izboljšav metod, ki vključujejo uporabo nanodelcev v biomedicini, je nepoznavanje osnovnih mehanizmov reakcije nanodelcev z biološkimi sistemi; da nanodelci pri uporabi dosežejo želeni učinek, morajo s točno določenimi komponentami sistema odreagirati na povsem specifičen način, žal pa za študij omenjenih interakcij ni dovolj zanimanja. Razumevanje interakcij nanodelcev z biološkimi sistemi zato večinoma ostaja zgolj na nivoju nepotrjenih hipotez (Latorre, 2009).

Pričakovati je, da so posrednik interakcij med nanodelci in sistemom kemofizikalne lastnosti nanodelcev, kot so velikost, oblika ter lastnosti površine nanodelcev same (tj. površinski naboj, funkcionalne skupine, hidrofilnost/hidrofobnost itd.) (Hu in sod., 2009). Potreba po podrobnih študijah, ki bi preučile, kako omenjene kemofizikalne lastnosti vplivajo na interakcije med nanodelci in celicami, je velika.

Pozornost raziskovalcev je v veliki meri usmerjena k površinski modifikaciji nanodelcev z določenimi ligandi, za katere je znano, s katero tarčno molekulo bodo reagirali in kakšen bo sprožen odziv, kljub temu, da mehanizem reakcije morda ni poznan. Pogosto so cilj modifikacij nanodelcev selektivne interakcije ligandov površine nanodelcev z membranskimi receptorji, specifičnimi za tarčne celice, kot npr. pri modifikaciji nanodelcev s protitelesi proti površinskim označevalcem/oznakam tarčnih celic ("surface markers"). Omenjena površinska modifikacija nanodelcev s sistemom usmerjenega ciljanja tarčnih celic s pomočjo protiteles omogoča natančno selekcijo interakcij, do katerih pride le pri celicah s specifičnimi antigenskiimi determinantami (Miltenyi in sod., 1990; Abts in sod., 1989).

Interakcije s protitelesi označenih nanodelcev s tarčnimi celicami so sicer visoko specifične, a do njih pride zelo redko – metoda izkazuje nizko frekvenco želenih interakcij. Poleg tega so cene protiteles previsoke, da bi omogočale njihovo širšo uporabo; posledično so v fazi raziskav nove metode, ki bi omogočale pogostejše visokospecifične interakcije nanodelcev s tarčnimi celicami ter z nižjimi stroški uporabe. Veliko zanimanja so vzbudile študije interakcij med nanodelci in celicami, pri katerih se uporablja nanodelce z nespecifično prevleko, npr. različne polimerne ali polisaharidne ovoje (Bareford in Swaan, 2007). Številni znanstveniki so pri

preučevanju omenjenega področja prišli do zaključka, da so za nanodelce z nespecifičnimi površinskimi modifikacijami značilne zelo specifične reakcije z nekaterimi tipi celic (Schwalbe in sod., 2009; Lorenz in sod., 2006; Wilhelm in sod., 2003). Mehanizem, ki nespecifično modificiranim nanodelcev omogoča tako visoko internalizacijo v nekatere celice, medtem ko internalizacija v druge tipe celic ni bila opažena, je še neznan, a ključen v kolikor želimo nadalje z modifikacijami nanodelcev regulirati specifičnost interakcij le-teh s tarčnimi celicami.

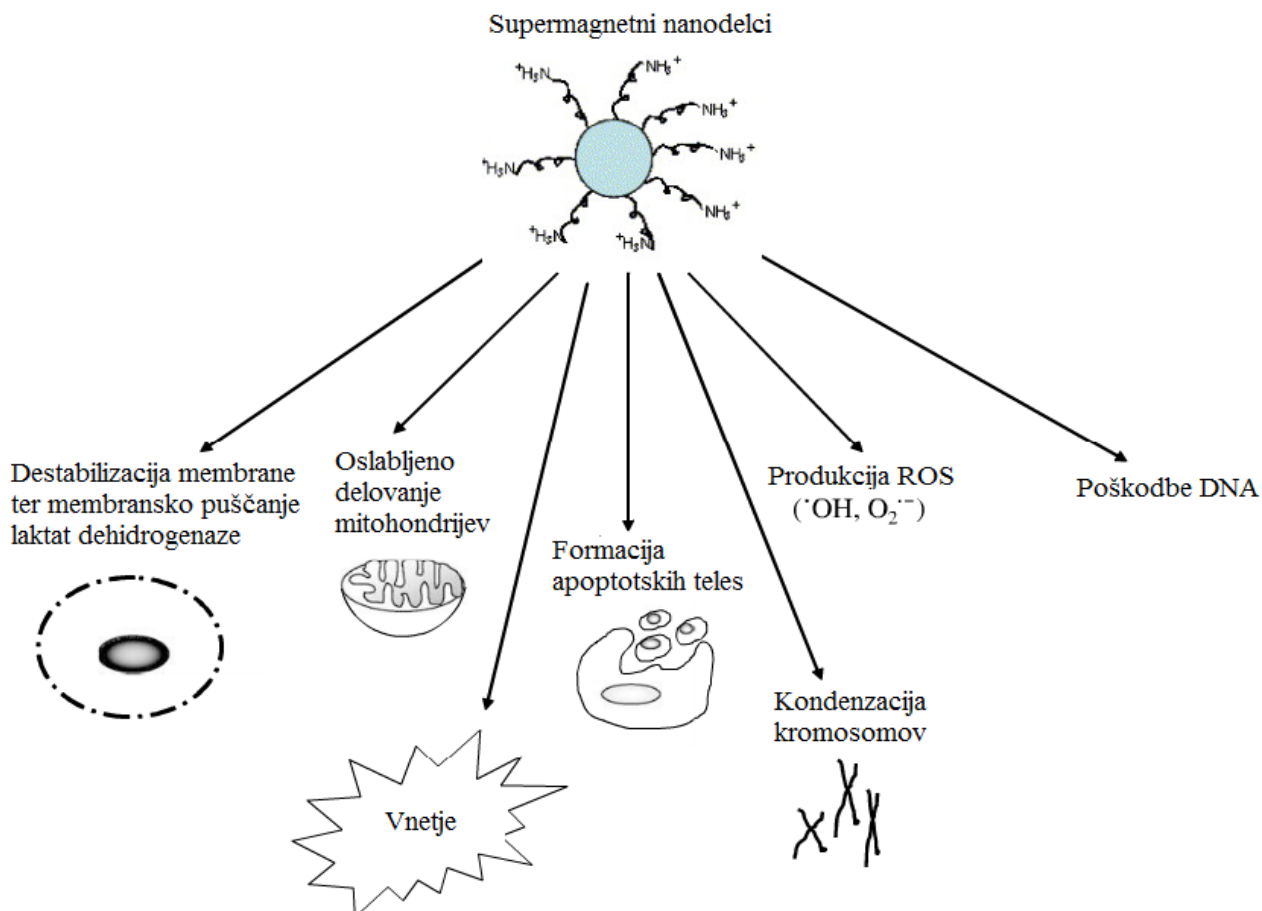
Kljub temu, da podrobnosti interakcije nanodelcev s celičnimi komponentami še niso znane, je predlaganih kar nekaj modelov, ki opisujejo ter pojasnjujejo vpliv nanodelcev na lipidni dvosloj celic (sprememba fluidnosti, izčrpavanje lipidnega sloja oz. izguba posameznih lipidov, lokalne lipidne preureditve, formacija por ob enkapsulaciji nanodelcev itd.), membranske proteine (sterično oviranje ionskih izmenjevalcev, interakcije z ankirinom ipd.), submembranski citoskelet (organizacija spektrina) ter znotrajcelično signaliziranje in celični metabolizem. Zaradi boljše preglednosti ter kohezije smo predlagane modele interakcij nanodelcev s celičnimi membranami ter membranskimi proteini vključili v razpravo, saj pri pojasnjevanju opaženih sprememb eritrocitnih membran izhajamo iz omenjenih modelnih hipotez.

Reakcij nanodelcev s komponentami bioloških sistemov morda ne znamo pojasniti, nedvomno pa lahko opazujemo in vrednotimo posledice omenjenih interakcij. Te lahko razdelimo na zelene (izhajajo iz namena uporabe nanodelca s točno določenimi modifikacijami, ki posredujejo specifičnost), netarčne, a pozitivne (opazimo npr. privzem nanodelcev v netarčne celice, kar ni zaželeno, vseeno pa ne opazimo negativnega vpliva nanodelcev na celico po internalizaciji) ter na interakcije z negativnimi posledicami za celico. Pri slednjih gre za toksične učinke nanodelcev in so za posamezne tipe nanodelcev dobro znani ter preučeni. V nadaljevanju si bomo pogledali primere lastnosti nanodelcev, iz katerih izhaja njihova toksičnost ter različne primere toksičnosti nanodelcev samih.

Izsledki številnih raziskav potrjujejo dejstvo, da je za aktivacijo toksičnih mehanizmov (slika 4) morda ključna velikost nanodelcev. Primer študije *in vivo* na podganah je pokazal, da vdihavanje nanodelcev ogljika (carbon black) sproži toksične učinke za dihala, potentnost nanodelcev pri sprožitvi negativnih posledic pa je direktno odvisna od velikosti nanodelcev (Gallagher in sod., 1994; Driscoll in sod., 1996). Podobna študija, ki je poleg ogljikovih nanodelcev vključevala še nanodelce TiO<sub>2</sub> (20 nm), je pokazala, da se z manjšanjem velikosti nanodelcev zvišuje njihova toksičnost (Ferin in sod., 1992), Gurr pa je s sodelavci dokazal, da TiO<sub>2</sub> manjših velikosti (10 in 20 nm) pri celični liniji BEAS-2B inducira nastajanje mikrojedera, medtem ko pri večjih nanodelcih TiO<sub>2</sub> (1200 nm) mikrojedera, kot posledice delovanja nanodelcev, niso opazili.

Nedavno so Papargeorgiou in sodelavci (2007) na humanih fibroblastih primerjali citotoksičnost in genotoksičnost nanodelcev ter nanodelcev velikosti mikrona zlitine kobalta in kroma. Ugotovili so, da nanodelci nanometrskih velikosti inducirajo več poškodb DNA, več aneuploidij ter so bolj citotoksični kot nanodelci mikro velikosti ob ekvivalentni volumetrični dozi.

Navkljub številnim izsledkom raziskav so mnogi avtorji skeptični do razlage toksičnih učinkov nanodelcev na celico kot posledice same velikosti nanodelcev; Teegarden in sod. (2005) na primer pojasnjujejo, da so manjši nanodelci za celico v primerjavi z večjimi nanodelci bolj toksični le zato, ker celica manjše nanodelce lažje in hitreje privzema, Baldi in sod. (2007) pa za opažene razlike v citotoksičnosti nanodelcev različnih velikosti krivijo aktivno površino nanodelcev. Slednja je večja pri manjših nanodelcih, zato naj bi ti tudi močneje reagirali s celico.



**Slika 4: Citotoksičnost, povzročena z interakcijami nanodelcev s celičnimi komponentami (Singh in sod., 2010: 2)**

Izpostavitve celic nanodelcem lahko vodi v poškodbe DNA ter mitohondrijev, znižanje integritete lipidne membrane, vnetne odzive, poškodbe celic in tkiva zaradi nastajanja reaktivnih kisikovih zvrsti idr.

Toksične učinke nanodelcev nekateri avtorji, poleg velikosti, aktivno površino ter nabojem nanodelcev, povezujejo s specifično znotrajcelično lokalizacijo nanodelcev po njihovi internalizaciji. Foley in sod. (2002), Li in sod. (2003) ter Savic in sod. (2003) so opazili tendenco nekaterih manjših nanodelcev, da se po internalizaciji kopičijo v neposredni bližini mitohondrijev, prav iz te lokalizacije pa naj bi izhajal potencial nanodelcev, da sprožijo nastajanje prostih radikalov po poteh oksidativnega stresa (Shvedova in sod., 2003; Koike in Kobayashi, 2006; Lin in sod., 2006; Magrini in sod., 2006; Pulskamp in sod., 2007), medtem ko naj bi večji nanodelci aktivirali druge molekularne poti (Manna in sod., 2005; Muller in sod., 2005; Chen in sod., 2006).

Pri nekaterih biomedicinskih aplikacijah magnetnih nanodelcev je toksičnost odvisna predvsem od doze. Za na primer ojačanje kontrasta pri magnetni resonanci, morajo v telo z nanodelci vbrizgati toliko železa, da doza predstavlja od 1.25 do 5 % celotne vsebnosti železa v telesu (Elias in sod., 2009), kar vodi v zelo visoke lokalne koncentracije železa v sistemu. Visoke lokalne akumulacije Fe ionov v izpostavljenem tkivu lahko vodijo v porušeno homeoostazo železa, ker se odraža v citotoksičnosti, poškodbah DNA, oksidativnem stresu, epigenetskih modifikacijah ter vnetnih procesih (Bulte in sod., 2001; Varanth in sod., 2007; Hafeli in sod., 2009). Tudi če citotoksičnosti ni opaziti, lahko pri izpostavitvi celic visokim lokalnim koncentracijam železa pride do prikritih motenj celičnih funkcij, kar lahko vodi v poškodbe DNA, te pa so lahko vzrok karcinogenezi ali pa bodo kvarni učinek izkazale pri naslednjih generacijah, v kolikor do popravil DNA ne pride (Singh in sod., 2009).

Železo v splošnem že dolgo povezujejo s pojavom raka in predlaganih je bilo kar nekaj mehanizmov, kako do z železom posredovane karcinogeneze pride; od produkcije ROS, ki potencirajo direkten kvaren vpliv na DNA, pa do poškodb proteinov in lipidne peroksidacije (Stevens in sod., 1988; Toyokuni in sod., 2002).

Poleg vrste površinskih modifikacij nanodelcev (razlaga pomena le-teh je skupaj s primerom vključena v poglavje Lastnosti in uporaba magnetnih nanodelcev) so lahko nosilci toksičnosti nanodelcev tudi repki ovoja nanodelcev (npr. dolžina polietilen oksida pri s PEO obdanimi nanodelci), točneje, dolžina repkov. Hafeli in sod. (2009) so opazili, da so krajši repki (dolžine 0.75 kD) ovoja testiranih magnetnih nanodelcev sprožili kondenzacijo kromatina, nestabilnost jedra ter formacijo apoptotskih teles.

Na toksičnost nanodelcev pa lahko vpliva tudi sam postopek izdelave – v nekaterih primerih se pri izdelavi nanodelcev uporablja klor. Kisle klorove ione pri izdelavi ultrafinih nanodelcev nevtralizirajo, medtem ko pri izdelavi finih nanodelcev tega koraka ni. Tako lahko toksičnost pripišemo tudi kloru samemu (Warheit in sod., 2007).

Magnetni nanodelci z železom, kot sestavino jedra, lahko (geno)toksičnost sprožijo tudi preko generacije ROS (Reactive Oxygen Species, ang. oz. reaktivne kisikove zvrsti, RKZ). Po internalizaciji nanodelcev predvidoma pride do lizosomske encimske hidrolize do železovih ionov. Ti lahko prečijo jedrno ali mitohondrijsko membrano, pri slednjem lahko pride do reakcij prostega železa (v obliki  $\text{Fe}^{2+}$ ) z vodikovim peroksidom in kisikom kot produktoma mitohondrijske aktivnosti, rezultat katerih je nastanek visoko reaktivnih hidroksilnih radikalov ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \cdot\text{OH} + \text{OH}^-$ ). Nastali hidroksilni radikali lahko poškodujejo DNA, proteine, polisaharide in lipide (Halliwell in Gutteridge, 2007). Primer kvarnega delovanja nastalih hidroksilnih radikalov kot posledica kopičenja železa po vnosu magnetnih nanodelcev je podal Kadiiska s sodelavci (1995); pri testih *in vivo* na podganah so hidroksilni radikali povzročili razpad lipidnega dvosloja ter kopičenje produktov razgradnje, med drugim malondialdehida (MDA) ter 4-hidroksi-2-nonenala (HNE) – oba produkta sta sposobna vezave na DNA (Sodum in sod., 1988) in sta mutagena (Isom in sod., 2009). Poškodbe DNA po enakem mehanizmu so potrdili tudi Sadeghiani in sod. (2005). Poskusi na miših so pokazali od časa ter od doze odvisen nastanek mikrojedrer po vnosu magnetnih nanodelcev v sistem.

Zanimiv je tudi primer genotoksičnosti samega kobalta ( $\text{Co}^{2+}$ ); Baldwin in sodelavci (2004) so opazili, da prisotnost Co(II) v celicah MCF-7 (celična linija raka dojke) stimulira s topoizomerazo Ha posredovano rezanje DNA ob prisotnosti magnezija(II), molekularni mehanizem reakcije pa še ni znan. Kobalt s spojinami je bil med drugim leta 1991 razglašen za potencialno karcinogenega. Kljub temu pa De Boeck in sod. (2003) v svoji študiji niso opazili toksičnosti, mutagenosti in karcinogenosti vseh testiranih kobaltovih spojin.

Nanodelci lahko spremenijo ali celo regulirajo izražanje genov. Študija, izvedena na celicah pankreasa, označenih z magnetnimi nanodelci s karboksidedekstranskim plaščem, ki so v komercialni uporabi kot MRI kontrastni agent, je pokazala, da je bila ekspresija inzulina v označenih celicah močno povišana (približno 2 x višja od normalne) (Kim in sod., 2009). V označenih celicah so opazili tudi povišano vsebnost BETA2 transkripcijskega faktorja, ki regulira ekspresijo gena z zapisom za inzulin (1,7-kratno povišanje), niso pa opazili razlike v sposobnosti celic, da inzulin izločajo. Rezultati študije so spodbudni – testirane nanodelce naj bi tako uporabljali predvsem pri bolnikih s sladkorno boleznijo; uporaba omenjenih nanodelcev pri MR bo tako pri slednjih stimulirala proizvodnjo inzulina, hkrati pa so nanodelci tudi dober kontrastni agens.

Študije so pokazale, da magnetni nanodelci z dekstranskim ovojem povzročajo motnje v homeostazi železa. Izkazalo se je, da po vnosu nanodelcev v jetrno celično linijo HepG2 ti inhibirajo izražanje transferin receptorja 1 (TfR1) ter hepcidina (regulira absorbcijo železa preko črevesa), medtem ko na izražanje feritina in ferroportina ne vplivajo (Barisani in sod., 2002).



Nanodelci pa lahko toksično reagirajo tudi s proteini. Soenen in sodelavci (2009) so v svoji študiji pokazali, da lahko magnetoliposomi vplivajo na arhitekturo in sposobnost formacije aktinskega citoskeleta in posredno na proliferacijo celic; posledice izpostavitve celic nanodelcem so bile opazne še 7 dni po izpostavitvi, kar namiguje na dolgoročne kvarne učinke omenjenih nanodelcev. Naslednji primer z nanodelci povzročene celičnega stresa so v svojem delu predstavili Berry in sod. (2004). Opazili so, da nanodelci po internalizaciji motijo delovanje še enega strukturnega proteina, tubulina, hkrati pa povzročajo hitro in nepravilno polimerizacijo F-aktina, kar so opazili Apopa in sodelavci (2009).

Poleg regulacije izražanja proteinov ter negativnega vpliva na njihovo delovanje, je toksičnost nanodelcev pri interakciji s proteini lahko povzročena še na tretji način, preko stimulacije imunskega sistema. Fujita in sod. (2004) ter Lemarchand in sod. (2006) so dokazali, da vezava določenih proteinov na nanodelce stimulira komplementni odziv imunskega sistema, kar vodi v burne vnetne reakcije ter posledično, za bližnje celice, toksične učinke. Močna vezava proteinov na nanodelce (npr. kininogena in kalikreina v povezavi s koagulacijskima faktorjema XI in XII) lahko sproži notranje koagulacijske kaskade (Simberg in sod., 2007).

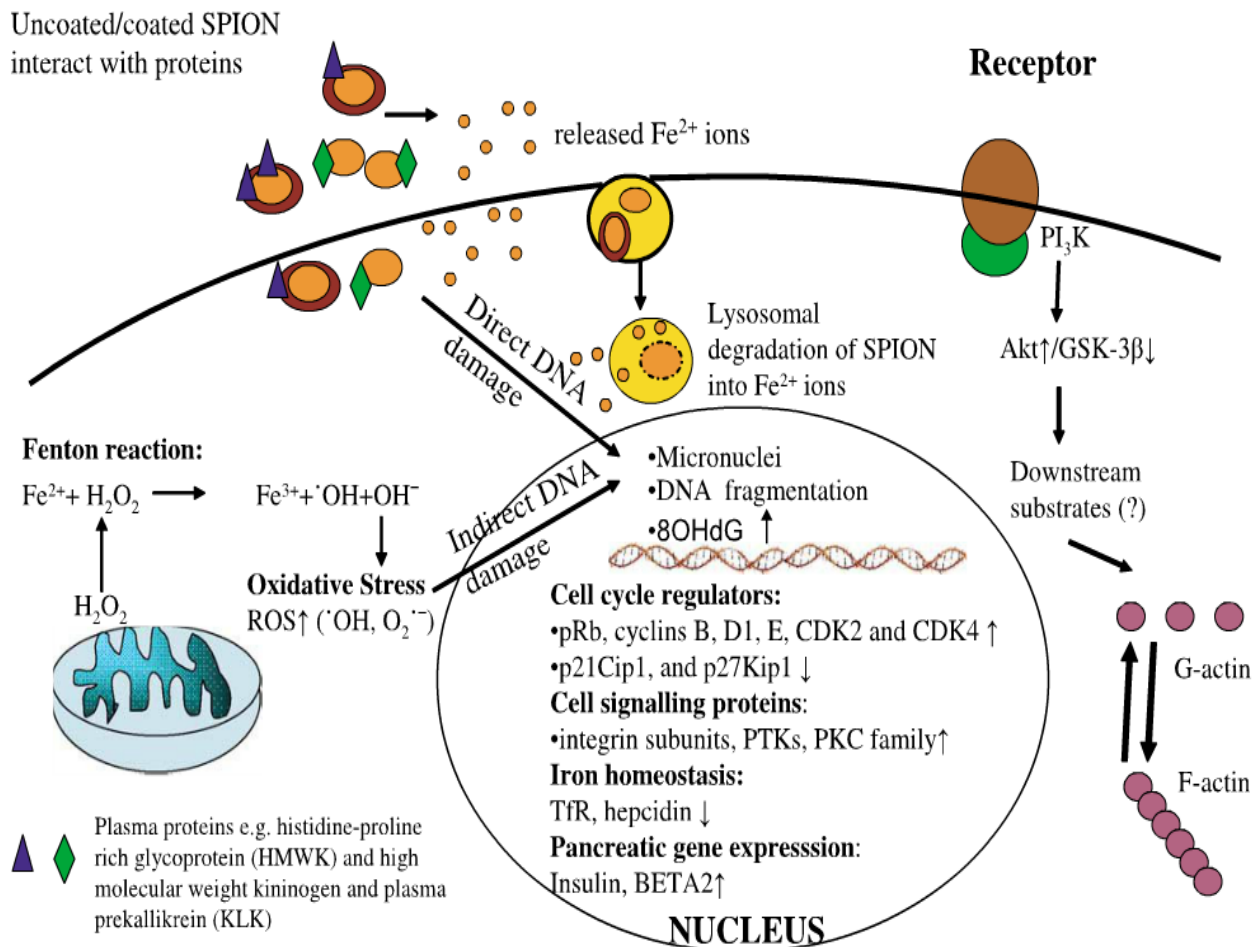
Interakcije nanodelcev s proteini pa imajo lahko tudi za sistem pozitivne učinke. Bellova in sod. (2010) so opazovali posledice uporabe nanodelcev  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  pri zdravljenju nevroloških bolezni. Nanodelci so dovolj majhni, da lahko prečijo krvno možgansko bariero, v čemer se kaže ogromen potencial za uporabo nanodelcev pri zdravljenju bolezni, kot so Parkinsonova in Alzheimerjeva. Opazili so, da nanodelci v možganih ne samo inhibirajo lizosomsko amiloidno agregacijo z blokiranjem procesa nukleacije, pač pa tudi sprožajo depolimerizacijo agregatov z vezavo nanje in porušenjem terciarne strukture agregatov (motnja povezave vzporednih ravnin). Trenutno so nanodelci  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  edina učinkovina, s katero lahko uspešno omilimo posledice z amiloidno agregacijo povezanih bolezni.

Interakcije nanodelcev z biološkim sistemom imajo lahko negativne učinke na celično proliferacijo. Soenen in sod. (2007) so opazili, da lahko rast in razvoj uporabljene celične linije po izpostavitvi nanodelcem opiše z grafom oblike zvonca. Dinamiko rasti je poskušal razložiti. Razvoj celic se začne z začetno lag fazo, v kateri se celice prilagajajo nenadnim internalizacijam nanodelcev. Sledi 6–10 h dolga vmesna log faza, v kateri celice poskušajo stabilizirati notranje aktivnosti, tej pa sledi faza znižane celične viabilnosti kot posledica toksičnosti nanodelcev. Rezultati poskusov, izvedenih v omenjeni študiji, niso samo prikazali negativnih učinkov nanodelcev na rast in razvoj celic, pač pa tudi pomen primerno zastavljenih eksperimentov – celične linije je potrebno opazovati daljše časovno obdobje, da se izognemo napačnim ocenam celične viabilnosti ter da lahko v celoti opazimo (včasih zakasnelo) delovanje nanodelcev po internalizaciji.

V splošnem velja, da po privzemu nanodelcev ter po saturaciji celic z nanodelci sčasoma pride do njihove znižane viabilnosti, v najboljšem primeru pa nanodelci na viabilnost ne vplivajo, torej ostane nespremenjena. Zato preseneča dejstvo, da lahko dodajanje nanodelcev celičnim linijam stimulira njihovo rast in razvoj, kar so pokazali Soenen in sod. (2007). Pri celični liniji 3T3 fibroblastov pride po privzemu kationskih magnetoliposomov do zvišanja celične viabilnosti v primerjavi s kontrolo. Razlaga, ki jo Soenen podaja za opis opažene spremembe, je pospešena celična rast in razvoj kot posledica stimulacije zaradi vnešenih hranil v obliki železa in fosfolipidov, sestavin vnešenih testiranih nanodelcev. Podoben učinek imajo na linijo humanih fibroblastov (hTERT-BJ1) železo oksidni nanodelci s transferinskim ovojem. Vnešeni transferin (transportni protein za železo) je zvišal celično proliferacijo pri omenjeni celični liniji, kar Berryja in kolege (2004) ne preseneča, saj je pomen transferina za celično proliferacijo že nekaj časa znan (Seligman in sod., 1992).

Podobne rezultate, a z drugačnim mehanizmom delovanja, je prikazala študija, ki je preverjala toksične učinke ferukarbotrana (nanokontrastno sredstvo) na mezenhimske zarodne celice. Te so po dodatku nanodelcev izkazovale hitrejšo rast ter hitrejše napredovanje celičnega cikla zaradi spremembe ekspresije celičnih regulatorjev cikla ter zaradi znižanja vsebnosti znotrajceličnega vodikovega peroksida (Huang in sod., 2009). Omenjena skupina je opazila povišanje ekspresije proteina pRb (hiperfosforiliran retinoblastomski tumor supresorski protein), ciklinov ter od ciklinov odvisnih kinaz, predvsem ciklinov B, D1, E ter CDK2 in CDK4. Opazili pa so tudi hkratno znižanje ekspresije p21<sup>Cip1</sup> ter p27<sup>Kip1</sup>, proteina CIP/KIP družine, ki negativno regulirata celični cikel in nadalje, testirani nanodelci so znižali ekspresijo tumor supresorskega gena, p53. Opažene spremembe pri celični liniji so nasprotno tistim, povzročenim s pomanjkanjem železa v celicah, iz česar so Huang in sodelavci sklepali, da do sprememb po dodatku nanodelcev celicam pride zaradi dodatnega prostega železa, ki je celicam tako na voljo. Najverjetneje je pri tem vpletena aktivacija P13/AKT signalne poti, za katero je znano, da celicam omogoča pobeg apoptozi z regulacijo ekspresije proteinov celičnega cikla.

Povzetek primerov interakcij nanodelcev s celičnimi komponentami ter posledic omenjenih interakcij, podanih v zgornjem besedilu, je strnjen na Sliki 5. Slika ne vključuje čisto vseh mehanizmov delovanja nanodelcev na celice, ki smo si jih ogledali, zajema pa tiste bistvene.



**Slika 5: Povzetek interakcij magnetnih nanodelcev s supermagnetnim železo oksidnim jedrom (SPION) in celico (Singh in sod., 2010: 11)**

SPION lahko povzročijo direktne poškodbe DNA ter indirektne preko produkcije prostih radikalov. Prav tako opazimo vpliv nanodelcev na citoskelet preko modulacije Akt signalne poti ter na izražanje številnih genov, vpletenih v regulacijo cel. cikla, homeostazo železa ipd.

### 2.3.1 METODE ZA PREUČEVANJE INTERAKCIJ NANODELCEV Z BIOLOŠKIMI SISTEMI: UPORABLJENE METODE

Izbira metod je v veliki meri odvisna od tipa interakcij, ki jih v študiji želimo opazovati/vrednotiti. Nas so zanimale reakcije testiranih nanodelcev z lipidnimi in proteinskimi komponentami membrane eritrocitov ter spremembe oblike celic zaradi delovanja nanodelcev, zato smo se odločili za izbiro metod, ki so nam omenjene spremembe in reakcije omogočile zaznati. Tako mikroskopija SEM kot test sedimentacije in aglutinacije ter hemolize so v splošnem dobro in dolgo znane metode, zato podrobnejši opis teoretskega ozadja metod v magistrski nalogi ni zajet.

Rdeče krvničke so sicer dovolj velike, da je spremembe njihove oblike brez težav moč opazovati s svetlobnim mikroskopom, slednji pa ne razkrije podrobnosti, kot so lokalizacija aglomeriranih nanodelcev na površini membran, ostanki hemoliziranih eritrocitov niso dovolj opazni, pa tudi površinsko nagubanost je težje vrednotiti. Razlika med akantocitami in ehinocitami (glej prilogo E) je tako pri tradicionalni pripravi krvnega razmaza včasih nečitna.

Poleg omenjenih pomanjkljivosti svetlobne mikroskopije lahko pride tudi do zapletov pri pripravi vzorcev. Znano je na primer, da bližina eritrocitov stekleni površini (v tem primeru objektumu ter krovnemu stekelcu) sproži spontano preoblikovanje lipidnega dvosloja ter ehinoidno transformacijo celic (Rudenko, 2010), nanje pa poleg tipa površine učinkujejo še povišan hidrostatični pritisk vzorca zaradi sile krovnika in suspenzije same, kapilarni vlek med stekelci ter strižne sile, ki delujejo na suspenzijo. Vsi naštetni dejavniki v neki meri vplivajo na obliko eritrocitov ter inducirajo neželene transformacije celic. Na podlagi omenjenih dejstev smo se odločili, da lahko vpliv testiranih nanodelcev na morfologijo eritrocitov z gotovostjo vrednotimo le z elektronsko mikroskopijo.

Raziskovalci se večinoma sicer odločajo za presevno elektronsko mikroskopijo (Li in sod. 2008; Zhao in sod., 2010; Avnesh in sod., 2011), ker pa v našem primeru internalizacije nanodelcev nismo opazovali, je bila izbira vrstične elektronske mikroskopije bolj smiselna, pri čemer smo morali skrbno izbrati primerne kemikalije ter preperativne in fiksativne postopke, ki niso vodili v transformacijo celične oblike.

Test sedimentacije in aglutinacije je zelo nespecifičen pokazatelj eritrocitnih aberacij (Li in sod., 2008) ter spremenjenih vrednosti vsebnosti posameznih krvnih komponent, predvsem proteinov (Reinhart in Nagy, 1995) kot npr. fibrinogena in gama globulinov v kolikor teh iz vzorca predhodno ne odstranimo. V primeru izoliranih spranih eritrocitov se vsaka sprememba eritrocitne oblike odraža v spremembi stopnje posedanja eritrocitov ali ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate, ang.). Iz dinamike posedanja eritrocitov v suspenziji lahko sklepamo na dinamiko obnašanja eritrocitov v krvožilju. Zlepki krvničk bodo s tokom krvi potovali

počasneje, možen je pojav lokalnih zastajanj zlepkov ali celo zamašitve žil, sami zlepki ali aglutinanti pa so pri omenjenem testu jasno opazni, v kolikor do aglutinacije pride. Test sedimentacije in aglutinacije je tako dober dodatek ostalim, specifičnim metodam, npr. testu hemolitičnosti ter elektronski mikroskopiji.

Zaradi same nespecifičnosti testa sedimentacije in aglutinacije povzemam dejavnike, ki vplivajo na znižanje ali povišanje vrednosti eritrocitne sedimentacije (Thue in sod., 1994; Thomas in sod., 1993; Sox in Liang, 1986; Hertzman in sod., 1993).

Povišan ESR je lahko posledica:

- **ehinoidnosti eritrocitov;**
- **akantoidnosti eritrocitov;**
- **hemolize;**
- anemije;
- vnetnih procesov;
- povišanega nivoja fibrinogena in gama globulinov;
- avtoimunih bolezni npr. makroglobulinemije, hiperfibrinogenemije, alergičnega vaskulitisa ipd.

Nižji ESR je lahko posledica:

- **sferoidnosti eritrocitov;**
- stomatoidnosti eritrocitov;
- policitemije;
- anemije srpastih celic;
- morfoloških abnormalnosti eritrocitov, ki otežujejo formacijo peleta ter eritrocitnih rolojev npr. anizocitoze, poikilocitoze, kongenitalne sferocitoze ipd.;
- hiperviskoznosti itd.

Vse poskuse smo opravili z izoliranimi ter spranimi eritrociti zdravih darovalcev. Tako lahko pri vrednotenju sprememb ESR izključimo vpliv bolezenskih stanj, vnetnih procesov in povišanja nivojev določenih proteinov ter spremembe v končni fazi pripišemo le spremembi eritrocitne oblike.

Opazovanje eritrocitov s SEM je pokazalo znake hemolize, zato smo testirali hemolitičnost nanodelcev. Literatura ne poroča o najbolj optimalnem, enotnem protokolu za izvedbo testa hemolize, različni avtorji so se izvedbe lotili na različne načine. Li in sod. (2008) so npr. spektrofotometrično določali koncentracijo hemoglobina v supernatantu po inkubaciji

eritrocitnega izolata s testiranimi nanodelci, pri čemer v izračun deleža hemolize v vzorcu niso vključili pozitivne ali negativne kontrole, prav tako pa niso upoštevali prispevka absorbance nanodelcev k izmerjenim vrednostim. Metodo so nadgradili Zhao in sod. (2010), tako da so izmerjene vrednosti absorbance supernatata primerjali s pozitivno ter negativno kontrolo, kar je pripomoglo k večji verjetnosti dobljenih rezultatov, absorbance nanodelcev pa so zanemarili tudi oni. Dobrovoljskaia in sod. (2008) so v svojem delu razpravljali o načinu izvedbe testa hemolitičnosti, ki bi omogočal pridobitev čim bolj realnih vrednosti deleža hemolize v vzorcu, kar je bilo osnova našim poskusom. Oba testa smo prilagajali do te mere, da sta v končni fazi pri izvedbi in pri izračunu vključevala oboje, absorbance samih nanodelcev ter vse ustrezne primerjave s kontrolnimi skupinami. Metoda padca OD tako izključuje vpliv absorbance nanodelcev na meritve, medtem ko je metoda meritve prostega hemoglobina kontrola prve metode (padec OD), s katero smo preverili morebitna odstopanja med (z obema metodama) izmerjenimi vrednostmi.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA TESTIRANIH NANODELCEV

Nanodelce so za nas pripravili na odseku za sintezo materialov, IJS (prof. dr. Darko Makovec, K8, Odsek za sintezo materialov, IJS). Koraki sinteznega postopka nanodelcev ter karakteristike nanodelcev so pomembni za razumevanje delovanja nanodelcev v bioloških sistemih in so opisani v prilogah (Priloga B, C in D).

Pred poskusi smo koloidne suspenzije nanodelcev primerno redčili, do zelenih končnih koncentracij, s PBS- (Phosphate-Buffered Saline, ang.) citratnim pufrom (pH 7,4). Suspenzije nanodelcev smo dobro premešali na vorteksnem mešalu ter jih sonificirali dokler nismo opazili homogenosti suspenzij (aglomeratov ter sedimentov nanodelcev s prostim očesom ni bilo opaziti).

#### 3.2 IZOLACIJA IN PRIPRAVA ERITROCITOV

S pisnim soglasjem darovalcev in z dovoljenjem Nacionalne komisije za medicinsko etiko (Priloga 1) je bila z venepunkcijo mediane kubitalne vene na dan eksperimenta odvzeta kri zdravim prostovoljcem. Kri je bila odvzeta v predhodno ogrete (37 °C) Vacutube 9NC koagulacijske epruvete, ki vsebujejo raztopino 0,109 mol/L (3,2 %) trinatrijevega citrata, ki deluje kot antikoagulant. Mešalno razmerje v epruvetah je en del raztopine citrata z devetimi deli krvi.

Kri smo centrifugirali pri 150 g (Centric 400R centrifuga, Domel d. o. o., Železniki, Slovenija) na 37 °C 10 minut, kar je ločilo komponente krvi na sediment eritrocitov (spodaj), srednji sloj levkocitov ("buffy coat") ter na krvno plazmo (zgoraj). Sloj levkocitov in plazme smo s pipeto odstranili ter odstranjen volumen nadomestili s PBS-citratnim pufrom. Vsebino epruvete smo nato previdno in počasi premešali, da je prišlo do čim bolj enakomerne porazdelitve pufra, ter vzorce centrifugirali pri 1550 g ter 37 °C 10 min. Sledilo je ponovno odstranjevanje vseh plasti, razen eritrocitnega sedimenta. Spiranje eritrocitov smo ponovili najmanj trikrat oz. dokler nismo več opazili obarvanosti pufra. Po zadnjem spiranju smo odstranili plast pufra ter pripravljene eritrocite shranili na 37 °C za nadaljnje eksperimente. Med izvedbo in pripravo poskusov eritrociti niso bili izpostavljeni sobni temperaturi za več kot eno uro.

### 3.3 VRSTIČNA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA (SEM)

#### 3.3.1 PRIPRAVA IN FIKSACIJA VZORCEV

K 150  $\mu\text{L}$  izoliranih eritrocitov smo odpipetirali 50  $\mu\text{L}$  suspenzije posameznih nanodelcev ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ , MD-Si, MD-Si-COOH, MD-Si-NH<sub>2</sub>), nežno premešali z obračanjem, da so bile celice čim bolj enakomerno izpostavljene nanodelcem ter vzorce inkubirali 1 h na sobni temperaturi. Končna koncentracija nanodelcev v vzorcu je bila 1 mg/mL za  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  in  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  nanodelce ter 0,5 mg/mL za MD-Si, MD-Si-COOH in MD-Si-NH<sub>2</sub> nanodelce. Za vsako vrsto nanodelcev smo pripravili 4 paralelne vzorce. Pri kontrolnih vzorcih smo eritrocitom dodali 50  $\mu\text{L}$  izoosmolarne PBS-citratne pufo.

Po inkubaciji smo vzorcem dodali 200  $\mu\text{L}$  fiksativa (Karnovski v fosfatnem pufru; 2,5 % glutaraldehyd, 0,4 % paraformaldehid in 1M Na-fosfatni pufer [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  in  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ]) ter jih inkubirali 2 uri na sobni temperaturi. S filtracijo čez siringe z membranskim filtrom (TSTP, Merck Millipore, 2,0  $\mu\text{m}$  pore) smo vzorce nanесли na filtre, ter jih prenesli v steklene posodice, kjer smo izvedli nadaljnje korake postfiksacije:

1. spiranje fiksativa s fosfatnim pufrom (3 x 10 min)
2. inkubacija v 1 % osmijevem tetroksidu (1 h)
3. spiranje z destilirano vodo (3 x 10 min)
4. dehidracija v alkoholni vrsti – 30, 50, 70, 80, 90 ter absolutni alkohol (1 x 10 min)
5. spiranje v mešanici absolutni alkohol : aceton (1 : 1, 1 x 10 min) \*\*\*
6. spiranje v acetonu (1 x 10 min) \*\*\*
7. spiranje v mešanici aceton : HMDS (heksametildisilazan) (1 x 10 min) \*\*\*
8. inkubacija v HMDS (2 h)
9. odstranjevanje HMDS ter sušenje v digestoriju

\*\*\* Pri prvi pripravi vzorcev smo opazili, da se membranski filtri zaradi acetona, po postfiksacijskem postopku z acetonom, zvijajo, kar otežuje mikroskopiranje ter predvsem kasnejšo obdelavo slik. Protokol smo pri naslednji pripravi vzorcev priredili, in sicer pri korakih 5, 6 in 7 smo aceton nadomestili z absolutnim alkoholom. Prirejani koraki, ki so sledili dehidraciji vzorcev v alkoholni vrsti:

5. spiranje v absolutnem alkoholu (2 x 10 min)
6. spiranje v mešanici absolutni alkohol : HMDS 1 : 1 (1 x 10 min)
7. spiranje v mešanici absolutni alkohol : HMDS 1 : 3 (1 x 10 min)

Priprava se zaključi s sušenjem vzorcev v HMDS, z odstranjevanjem le-tega in s sušenjem vzorcev v digestoriju kot pri prvem protokolu.



Membranske filtre s fiksiranimi eritrociti smo s srebrovo barvo (SPI Supplies, West Chester, PA, USA) pritrčili na aluminijaste nosilce in jih naprašili z zlitino zlata ter paladija (30 nm plast Au/Pd, Precision Etching Coating System Gatan 682, CA, USA). Vzorce smo pregledali pod elektronskim mikroskopom (SEM, JEOL JSM-6500F).

### 3.3.2 MORFOLOŠKA KLASIFIKACIJA ERITROCITOV TER ZAJETJE IN OBDELAVA MIKROGRAFIJ

Metode ter pogoji priprave in fiksacije rdečih krvničk močno favorizirajo izhodno diskoidno obliko celic (Rudenko, 2010), kar je predpogoj za presojo, ali je divergenca v morfologiji eritrocitov od izvirne res posledica njihove izpostavitve izbranim nanodelcem.

Za vrednotenje morfoloških sprememb rdečih krvnih celic smo jih glede na obliko razdelili v dve arbitrarni skupini (za podrobno morfološko razdelitev eritrocitov glej Prilogo 3):

1. **Diskocite oz. diskoidni eritrociti**; značilna bikonkavna diskoidna oblika z nevalovito, nenagubano membrano brez površinskih izrastkov.
2. **Nediskoidni eritrociti**; ta skupina vključuje unikonkavne eritrocite, stomatocite (značilna oblika ust – z nabrekli obodom), sferocite (značilna globularna oblika), ehinocite (površinske spikule), akantocite (topi izrastki) ter hemolizirane celice.

SEM mikrografije so bile zajete na naključno izbranih predelih vzorcev, in sicer skupno 42 mikrografij kontrole, 16 mikrografij vzorcev s CF-CA, 22 vzorcev s CF nanodelci, 23 vzorcev z MD-Si, 20 vzorcev z MD-Si-COOH ter 22 vzorcev z MD-Si-NH<sub>2</sub>.

Zajete mikrografije so bile obdelane v programu ImageJ v1.46r, ročno označevanje posameznih tipov eritrocitov smo izvedli z razširitvenim modulom Cell\_Counter, in sicer pri povečavi 500X ter napetosti 5,0–15,0 kV. Statistična analiza pridobljenih podatkov je bila izvedena s programom Origin 8.0 (OriginLab, Massachusetts, ZDA). Za določitev *p*-vrednosti smo uporabili Mann-Whitney U test.

Z namenom določiti njihovo kemijsko sestavo, smo na aberacijah (agregati nanodelcev, Heinzova telesca, morebitne hemolizirane celice), opaženih na eritrocitnih membranah ali kjer koli v pregledanih predelih vzorcev, izvedli EDXS (Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, ang.) analizo (EDS/WDS Oxford Instruments INCA, JEOL JSM-6500F). Na teh predelih smo zajeli še mikrografije pri večjih povečavah, ki so razkrile številne podrobnosti, pomembne za razlago opaženih abnormalnosti.

### 3.4 TEST SEDIMENTACIJE IN AGLUTINACIJE

#### 3.4.1 NASTAVITEV TESTA

Suspenzijo eritrocitov (priprava opisana v poglavju 3.2) smo redčili s PBS-citratnim pufrom (pH 7,4) do 5 % hematokrita, kar nam je omogočilo jasno določitev roba eritrocitnega sedimenta ter zaznavo morebitnih zlepkov oz. aglutinativ. 150  $\mu$ L suspenziji redčenih eritrocitov smo dodali 50  $\mu$ L posameznih nanodelcev, suspendiranih v PBS-citratnem pufu. Končni koncentraciji nanodelcev v vzorcu sta bili 0,1 ter 0,1 mg/mL pri vzorcih z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  ter 0,1 in 0,6 mg/mL pri vzorcih z dodanimi nanodelci MD-Si, MD-Si-COOH ter MD-Si-NH<sub>2</sub> (suspenzije kobalt feritnih nanodelcev so intenzivneje obarvane, zato smo dodajali nižje koncentracije le-teh, medtem ko smo ostale tipe nanodelcev lahko dodajali v višjem koncentracijskem razponu). Pri kontroli smo suspenzijo nanodelcev nadomestili s 50  $\mu$ L PBS-citratnega pufru. Vzorce smo nežno premešali, da je prišlo do enakomerne razporeditve nanodelcev po vzorcu ter jih inkubirali eno uro na sobni temperaturi (Li et al., 2008; Zhao et al., 2011).

#### 3.4.2 ZAJEM IN ANALIZA SLIK

Pred in po inkubaciji smo zajeli slike vzorcev (Nikon D90, 35 mm Nikkor leča), ki so nam služile za primerjavo vrednosti posedanja oz. sedimentacije eritrocitov – ESR (erythrocyte sedimentation rates). Razdalje (v pikslih) med zgornjim robom eritrocitnega sedimenta ter meniskom suspenzije vzorca so bile določene z merilnim modulom programa Adobe Photoshop CS3 Extended. Izmerjene razdalje so sovpadale s časom 60 minut. Rezultati so podani kot razdalja [mm] na uro.

Aglutinati so večinoma vidni s prostim očesom, v kolikor pride do njihove tvorbe, prav tako eritrocitni roloji. Po enourni inkubaciji smo vzorce pregledali tudi pod svetlobnim mikroskopom in s tem dodatno preverili, ali je prišlo do nastanka zlepkov ali drugih formacij rdečih krvničk.

Prav tako smo podrobneje pregledali supernatant po sedimentaciji (sloj suspenzije nad zgornjim robom sedimenta). Pozorni smo bili na morebitno obarvanost suspenzije (rdeča, kot posledica hemolize ali v barvi suspenzije nanodelcev, kar govori o dinamiki in stabilnosti suspenzije).

### 3.5 TEST HEMOLITIČNEGA POTENCIALA NANODELCEV

Za ocenitev procenta hemolize v vzorcu smo uporabili dve metodi – metodo določanja prostega hemoglobina ter metodo padca absorbance. Pri prvi metodi gre za spektrofotometrično določanje hemoglobina, ki se je iz eritrocitov sprostil pri njihovem razpadu oz. lizi. Metoda je zelo natančna tudi pri nizkih koncentracijah sproščenega hemoglobina, ker pa izvedba vključuje odcentrifugiranje nanodelcev pred meritvami, smo se spraševali o zanesljivosti metode. Ključno vprašanje je, ali res odstranimo vse oz. veliko večino nanodelcev, tako da ti ne bodo vplivali na meritve. Zato smo se odločili še za drugo metodo, ki pri izvedbi ter računanju stopnje hemolize vključuje tudi prispevek nanodelcev k absorbanci vzorca; tj. metoda padca absorbance.

Zaradi nestabilnosti suspenzije nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  testa ocene hemolize v vzorcu z omenjenimi nanodelci nismo izvajali; zelene koncentracije je bilo nemogoče zanesljivo pipetirati, prav tako pri eritrocitih ne pride do enakomerne izpostavitve nanodelcem. Aglomerati nanodelcev imajo tudi drugačne optične lastnosti, ki vodijo v lažne pozitivne rezultate izvedenih testov.

#### 3.5.1 METODA DOLOČANJA PROSTEGA HEMOGLOBINA

Suspenzijo eritrocitov (priprava opisana v poglavju 3.2) smo redčili s PBS-citratnim pufrom (pH 7,4) do 5 % hematokrita. 150  $\mu\text{L}$  redčini smo dodali 50  $\mu\text{L}$  suspenzije posameznih nanodelcev (CF-CA, MD-Si, MD-Si-COOH, MD-Si-NH<sub>2</sub>) različnih koncentracij – 0,0375, 0,075, 0,15, 0,3 in 0,6 mg/mL – ter vzorce inkubirali eno uro pri 4 °C. Za pozitivno ter negativno kontrolo smo suspenzijo nanodelcev nadomestili s 50  $\mu\text{L}$  Triton-X (K+, poz. kontrola) 100 ter PBS (K-, neg. kontrola). Po inkubaciji smo vzorce 15 minut centrifugirali pri 1600 rpm ter na mikročitalcu (Microplate Spectrophotometer, MRX, DYNEX Technologies Inc, Chantilly, VA, ZDA) izmerili absorbanco supernatanta pri 550 nm. Izmerjene vrednosti absorbance so sovpadale s količino sproščenega hemoglobina (Hb). Procent hemolize v vzorcu smo izračunali po formuli (Zhao et al., 2011):

$$\% \text{ Hemolize} = \frac{A_{\text{vzorca}} - A_{\text{neg.kontrola}}}{A_{\text{poz.kontrola}} - A_{\text{neg.kontrola}}} \times 100 \quad \dots \quad (1)$$

### 3.5.2 METODA PADCA ABSORBANCE ERITROCITNE SUSPENZIJE

Eritrocitno suspenzijo s 5 % hematokritom smo odpipetirali na mikrotitersko ploščo s 96 vdolbinami in ločeno suspenzije nanodelcev s koncentracijami 0,0375, 0,075, 0,15, 0,3 in 0,6 mg/mL. Pred enourno inkubacijo smo pri 550 nm spektrofotometrično pomerili absorbanco redčene eritrocitne suspenzije ( $A_{\text{erc}}$ ) ter nanodelcev ( $A_{\text{delci}}$ ). Suspenzije nanodelcev smo iz vdolbinic z znanimi vrednostmi absorbanco odpipetirali v vdolbinice z redčenimi eritrociti, prav tako znanih vrednosti, temeljito premešali ter vzorce inkubirali 1 uro na 4 °C. Po inkubaciji smo vzorce nežno premešali ter pomerili absorbanco mešanice pri 550 nm ( $A_{\text{erc+delci}}$ ).

Vzporedno z zgoraj opisanimi pripravami nanodelcev in krvničk ter meritvami smo pripravili pozitivno ter negativno kontrolo. 150 µL suspenziji eritrocitov smo dodali 50 µL detergenta Tritona-X 100 (k+) ter PBS-citratnega pufra (k-). Kontrolni smo inkubirali pri istih pogojih kot vzorce, eno uro na 4 °C, ter jima po inkubaciji izmerili vrednosti absorbanco pri 550 nm ( $A_{\text{triton}}$ ,  $A_{\text{PBS}}$ ). Variabilnost v procentu hemolize v pozitivni kontroli je bila v skladu z zahtevami za umeritvene standarde ter standarde kvalitete kontrole, tj. znotraj 15 % (DeSilva et al., 2003).

Z namenom določiti padec vrednosti absorbanco samih eritrocitov po inkubaciji z nanodelci v primerjavi z izhodišnimi vrednostmi suspenzij eritrocitov ( $A_{\text{erc}}$ ), smo izmerjene vrednosti nanodelcev ( $A_{\text{delci}}$ ) odšteli od vrednosti vzorcev ( $A_{\text{erc+delci}}$ ) (Dobrovolskaia et al., 2009). Ta padec absorbanco smo nato primerjali s padcem absorbanco eritrocitne suspenzije pod vplivom pozitivne kontrole, Tritona-X 100 ( $A_{\text{triton}}$ ); pri tem smo uporabili spodnjo formulo:

$$\% \text{ Hemolize} = \frac{A_{\text{erc}} - (A_{\text{erc+delci}} - A_{\text{delci}})}{A_{\text{erc}} - A_{\text{triton}}} \times 100 \quad \dots (2)$$

### 3.5.3 DODATNA VALIDACIJA UPORABLJENIH METOD

Različni dejavniki lahko vplivajo na rezultate spektrofotometričnih meritev, med njimi morebitna nelinearnost v koncentracijskem območju meritev (sipanje nanodelcev, dušenje ipd.), prevelika variabilnost pri kontrolah, (ne)zanesljivost meritev nad in pod določenim pragom vrednosti absorbanco (pod 0.1 ter nad 1.0) in podobno.

Za vse nanodelce smo pripravili umeritvene krivulje, s katerimi smo preverili obnašanje meritev absorbance pri določenih koncentracijah. Z zelo visokimi ter z zelo nizkimi koncentracijami  $\text{Fe}^{3+}$  smo preizkusili linearnost meritev mikročitalca ter njegovo občutljivost pri vrednostih absorbance pod 0.100 ter nad 1.000. Prav tako smo preverili variabilnost vrednosti za negativno kontrolo ter dve pozitivni kontroli, Triton-X 100 ter  $\text{dH}_2\text{O}$ .

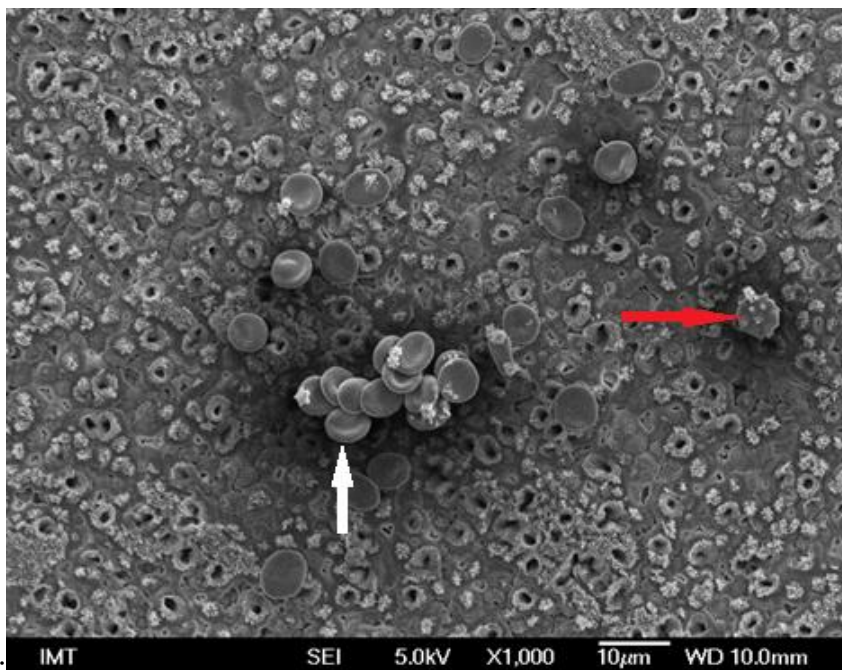
## 4 REZULTATI

### 4.1 MORFOLOŠKE SPREMEMBE ERITROCITOV PO IZPOSTAVITVI NANODELCEM, OPAŽENE S SEM

Vzorci eritrocitov, inkubiranih z izbranimi tipi nanodelcev, so bili pripravljani v dveh nizih. Pri prvem smo preučevali vpliv nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ter  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  na morfologijo eritrocitov, pri drugem pa vpliv nanodelcev MD-Si, MD-Si- $\text{NH}_2$  ter MD-Si-COOH. Niza se razlikujeta v končnih korakih postfiksacije; prvi niz vključuje korake z acetonom, medtem ko smo pri drugem nizu aceton nadomestili z absolutnim alkoholom (pojasnjeno v poglavju 3.3.1). Oba niza imata pripadajoče kontrole in dobljeni rezultati vpliva nanodelcev na eritrocitne membrane so ustrezno vrednoteni. Rezultati, pridobljeni z metodo SEM, so prikazani kot dve ločeni seriji poskusov.

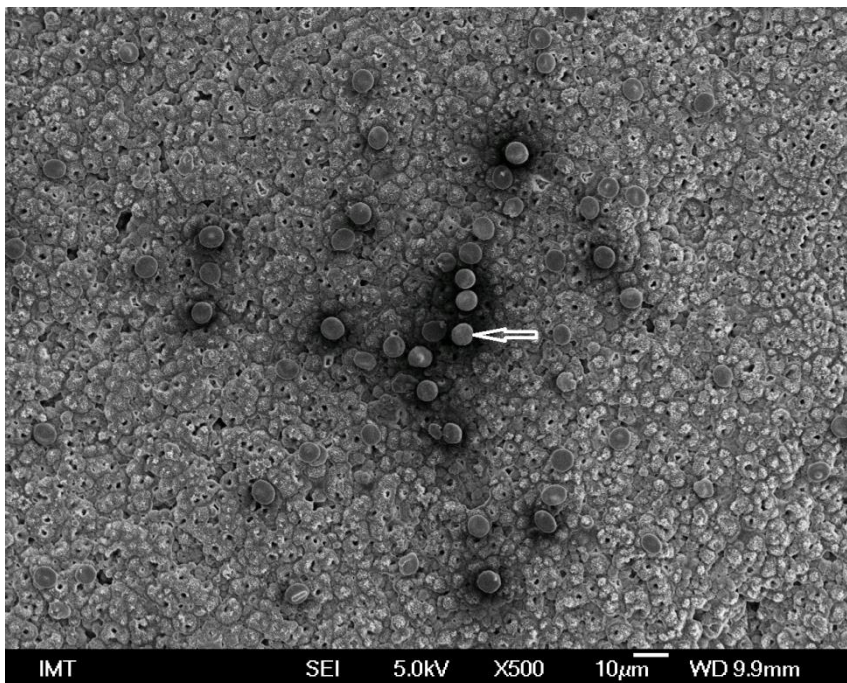
#### 4.1.1 VPLIV $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ TER $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ MAGNETNIH NANODELCEV NA MORFOLOGIJO ERITROCITOV

Z vrstičnim elektronskim mikroskopom smo opazovali spremembo oblike eritrocitov po inkubaciji z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ter  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  v primerjavi s kontrolnimi vzorci (inkubacija eritrocitov s PBS-citratnim pufrom). Reprezentativne mikrografije za kontrolo (Slika 6), vzorec z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (Slika 7) ter vzorec z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  (Slika 8):



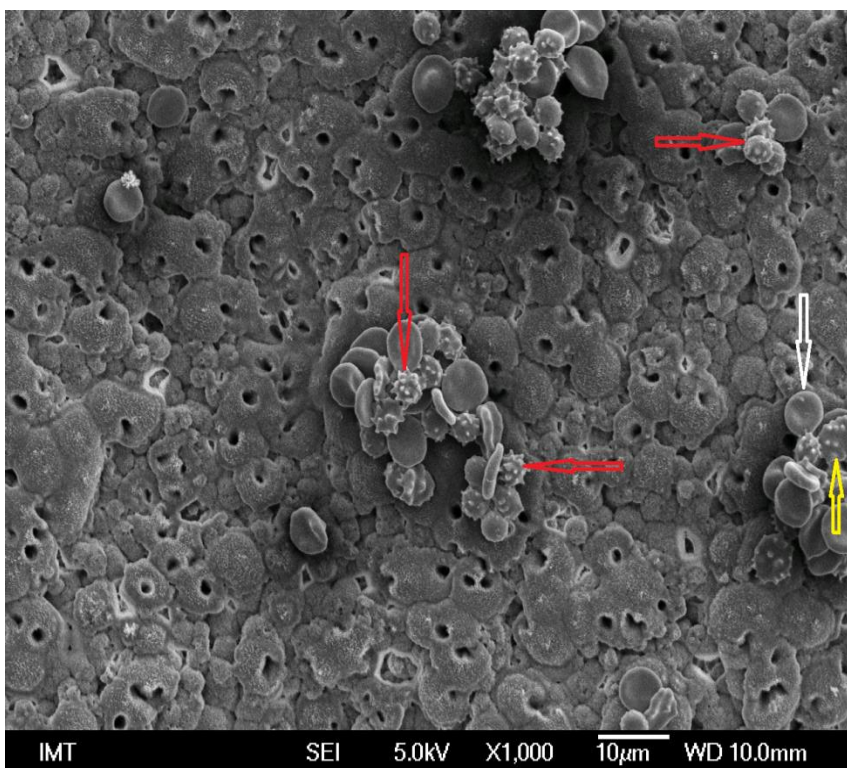
**Slika 6: Mikrografija naključnega predela vzorca eritrocitov, inkubiranih s PBS pri povečavi 1000X**

Bela puščica kaže na bikonkaven, diskoidni eritrocit, medtem ko rdeča puščica kaže na eritrocit spremenjene, nediskoidne oblike. Delež nediskoidnih eritrocitov v vzorcu je zanemarljiv, kot je razvidno s slike. Opažene ehinocitne transformacije so planarne, sferičnih ni opaziti.



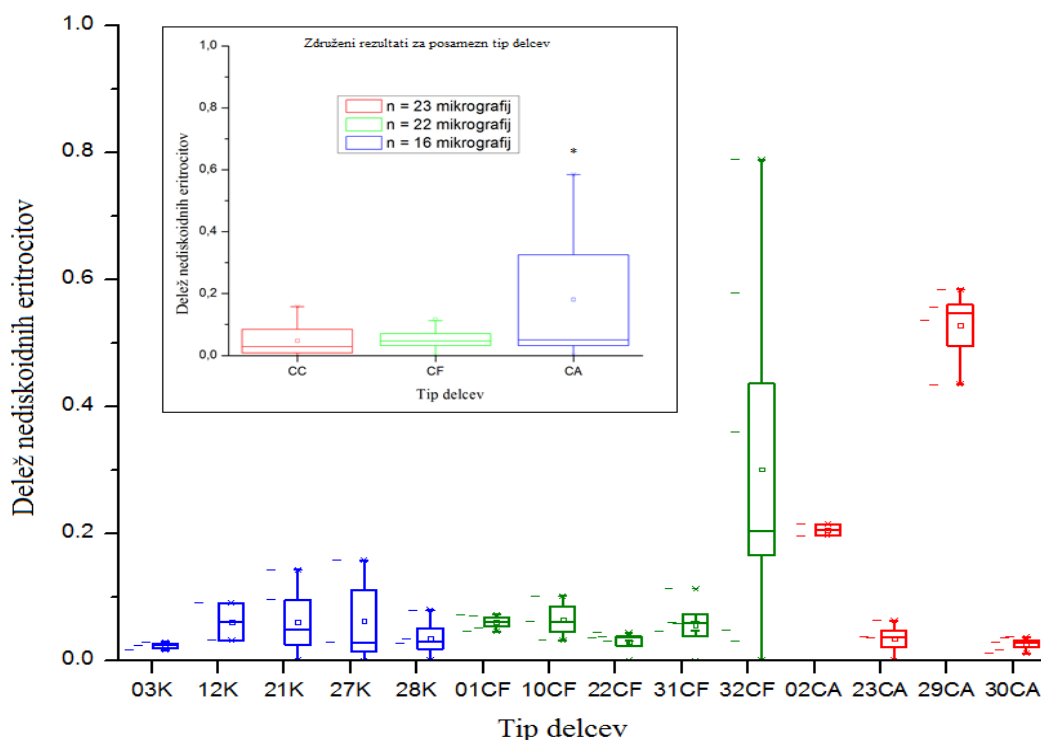
**Slika 7: Reprezentativna mikrografija naključnega predela vzorca eritrocitov, inkubiranih z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  pri 500X povečavi**

Bela puščica kaže na bikonkaven diskoidni eritrocit. Eritrocitov nediskoidnih oblik na izbrani mikrografiji ni bilo opaziti.



**Slika 8: Mikrografija eritrocitov, inkubiranih z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ -CA, zajeta na naključnem delu vzorca**

Z belo puščico je označen diskoidni eritrocit, nespremenjene oblike, rdeče puščice pa označujejo spremenjene, nediskoidne, eritrocite. Delež slednjih v vzorcu je, v primerjavi s kontrolo, občutno višji. Pri nediskoidni skupini eritrocitov je prevladujoča oblika sferična, sferocite ali sferične ehinocite (označeni z rdečimi puščicami). Z rumeno puščico je označena redko opažena nediskoidna transformacija – planaren ehinocit.



**Slika 9: Delež eritrocitov s spremenjeno morfologijo kot posledico izpostavitve nanodelcem  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (CF) ter  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ -CA (CA)**

K = kontrola. Suspenzija eritrocitov je bila z izbranimi nanodelci inkubirana 1 h na sobni temperaturi. V notranjem okvirju so podani združeni rezultati 4 paralelk, pripravljenih za vsak posamezen tip nanodelcev. Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$  \*) so opazne le pri nanodelcih  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ -CA.

Mann-Whitney U test frakcije nediskoidnih eritrocitov je pokazal statistično značilno razliko med vzorci eritrocitov, inkubiranimi z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ -CA (1 mg/mL) v primerjavi s kontrolo ( $\alpha = 0,05$ ,  $p = 0,04$  \*), medtem ko statistično značilne razlike med kontrolo in vzorci eritrocitov, inkubiranimi z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , nismo opazili ( $\alpha = 0,05$ ,  $p = 0,13$ ). Delež nediskoidnih eritrocitov se pri kontroli giblje okoli 5 % celotnega vzorca, prav tako tudi pri vzorcih eritrocitov, inkubiranih s suspenzijami nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . V vzorcih eritrocitov, inkubiranih s suspenzijami nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ -CA, je celoten delež nediskoidnih eritrocitov znatno večji, v povprečju okoli 20 % povišanje (do 15 % glede na kontrolo), v posameznem vzorcu pa je nediskoidnih celo več kot polovica eritrocitov (56 %) (Slika 9).

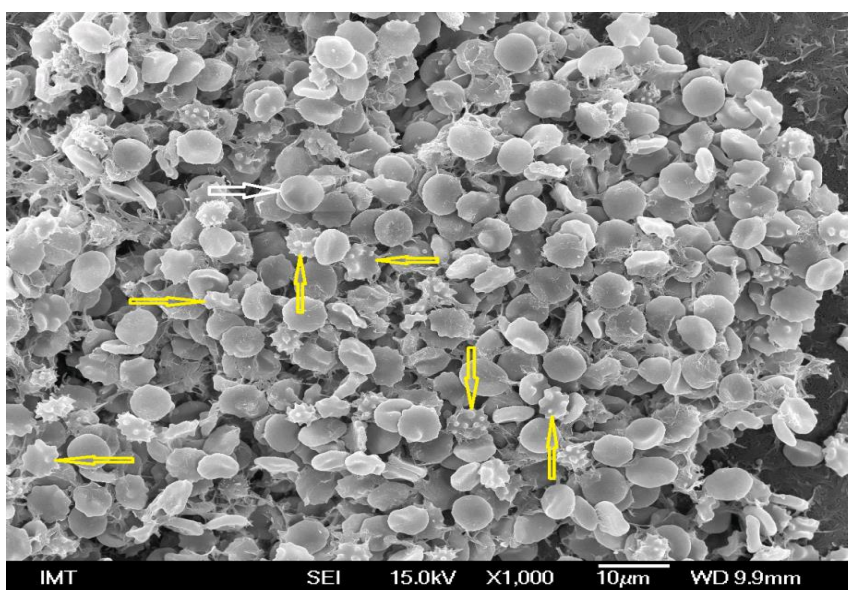
Kljub temu, da je za oceno vpliva nanodelcev na morfologijo eritrocitov pomembno predvsem to, ali pride do odklona oblike membrane od diskoidne oblike, skupina eritrocitov, klasificirana kot nediskocite, ni enotna (opisano v poglavju 3.3.2). Za opis oz. oceno mehanizma, ki vodi v



transformacijo oblike, je pomemben podatek o tipu nediskoidnih oblik, ki se v vzorcu pojavljajo. V prvi seriji poskusov smo opazili, da na transformacijo oblike celične membrane eritrocitov statistično značilno vplivajo le nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ , prevladujoča nediskoidna oblika, povzročena s strani omenjenih nanodelcev, pa je sferična (na Sliki 8 razlikujemo med planarno ter sferično transformacijo). Nastanejo sferociti in variacije sferičnih transformacij (ehinosferocite, akantosferocite). Prav tako smo opazili, da je prevladujoča vmesna transformacija med diskoidno ter sferično obliko stomatoidna; gre za nabrekanje lokalnih predelov membrane (glej prilogo E).

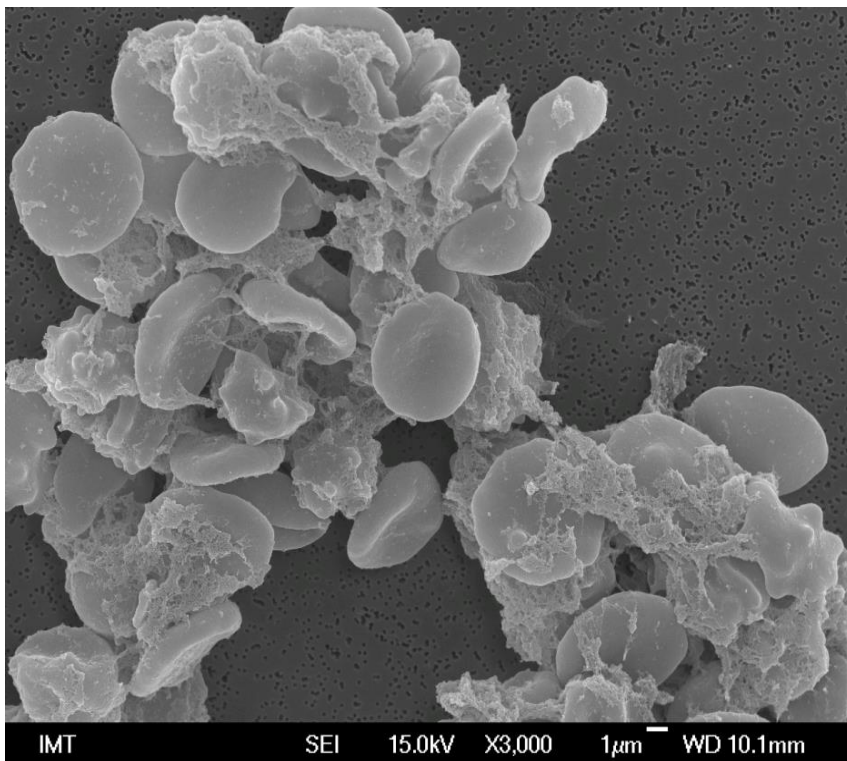
#### 4.1.2 VPLIV NANODELCEV MD-Si, MD-Si-COOH TER MD-Si-NH<sub>2</sub> NA MORFOLOGIJO ERITROCITOV

V drugi seriji testiranj vpliva izbranih magnetnih nanodelcev na morfologijo eritrocitov smo testirali nanodelce  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  s silikatnim ovojem (-Si) ter s silikatnim ovojem, funkcionaliziranim s karboksilnimi skupinami (-Si-COOH) in amino skupinami (-Si-NH<sub>2</sub>). Na Slikah 11 in 12 so podani primeri mikrografij vpliva posameznih nanodelcev. Razlik med reprezentativnimi mikrografijami kontrol ter vzorcev z nanodelci MD-Si-NH<sub>2</sub> ni bilo opaziti (Slika 10). Prav tako ni bilo opaziti statistične razlike pri transformacijah oblike membrane med kontrolo in vzorci z nanodelci MD-Si, a pri slednjih opazimo še neopažen pojav, ki je zajet na Sliki 11; eritrocitne membrane so lokalno izvihane ter povezane z izvihki sosednjih membran v neposredni bližini. Kot zadnja je podana reprezentativna mikrografija vzorcev eritrocitov, inkubiranih z nanodelci MD-Si-COOH (Slika 12):



**Slika 10: Reprezentativna mikrografija za kontrolo ter za vzorce eritrocitov, inkubirane z nanodelci MD-Si-NH<sub>2</sub>**

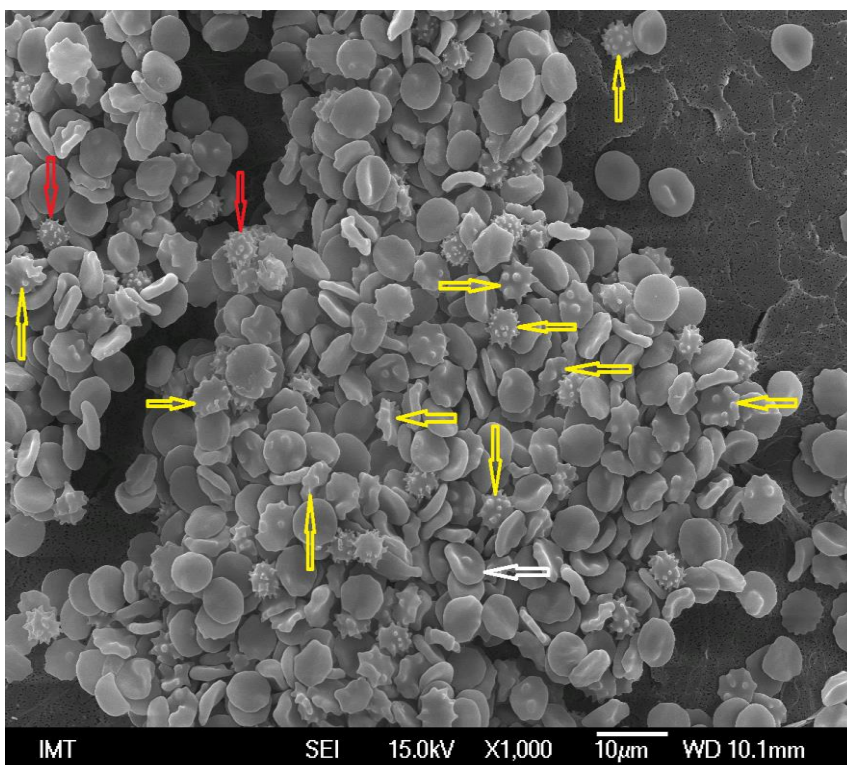
Bela puščica kaže na primer diskoidnega, netransformiranega eritrocita, rumene puščice označujejo nediskoidne eritrocite. Pri slednjih gre večinoma za planarne nediskoidne transformacije (planarne ehino-ter akantocite). Sferične transformacije so zelo redko opažene.



**Slika 11: Mikrografija eritrocitov, inkubiranih z nanodelci MD-Si**

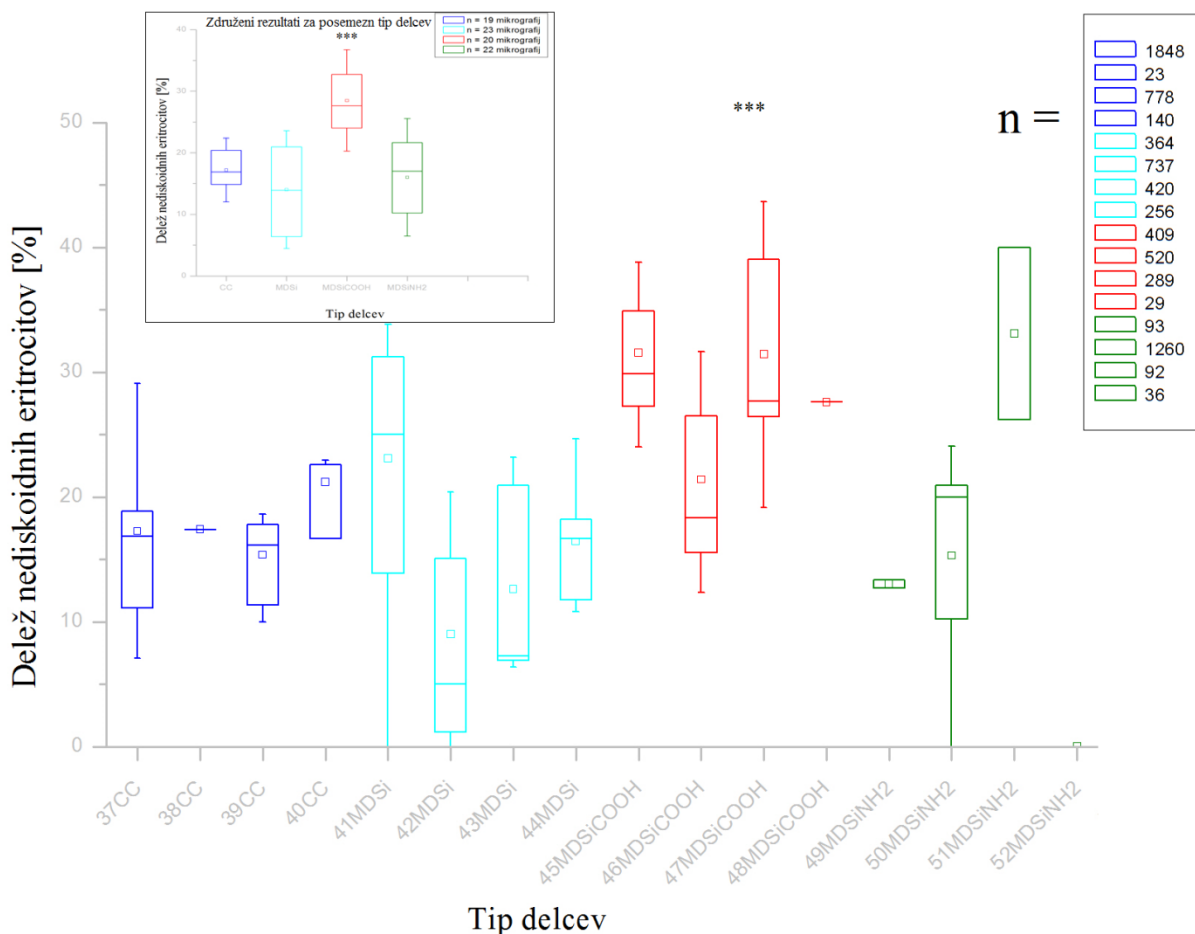
Slika prikazuje lokalno izvihane eritrocitne membrane, povezane z izvihki sosednjih membran v neposredni bližini.

Na območjih vzorcev, kjer smo opazili zlepke oz. aglutinate, smo izvedli EDXS analizo predela med sosednjimi eritrociti v aglutinatu. Izkaže se, da so v "vezivni mešanici" zastopani elementi, značilni za testirane nanodelce, ter tisti, značilni za lipidne membrane.



**Slika 12: Izbrana mikrografija vzorca eritrocitov, inkubiranih z nanodelci MD-Si-COOH**

Rumene puščice kažejo na planarne nediskoidne transformacije eritrocitov, rdeče pa na sferične transformacije; močno prevladujejo prve, slednje so redke, a bolj opazne kot pri kontroli. Tudi v predelih vzorca, kjer so eritrociti v neposredni bližini, ni opaziti zlepljanja kot pri vzorcu z MD-Si nanodelci.



**Slika 13: Delež nediskoidnih eritrocitov v vzorcih krvi po inkubaciji z različno funkcionaliziranimi nanodelci Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

Končna konc. nanodelcev MD-Si, MD-Si-COOH ter MD-Si-NH<sub>2</sub> v vzorcih je bila 0,5 mg/mL. Število klasificiranih eritrocitov v posamezni paralelki je podano v okvirju desno zgoraj, skupni rezultati 4 paralelk pa so podani na grafu v okvirju levo zgoraj. Statistično značilne razlike ( $p < 0,05$ ) so opazne le pri vzorcu eritrocitov, inkubiranem z nanodelci MD-Si-COOH.

Rezultati (slika 13) kažejo močan vpliv nanodelcev MD-Si-COOH na obliko eritrocitne membrane, pri katerih je statistično značilen delež nediskoidnih eritrocitov ( $p = 0,00007$  \*\*\*) v primerjavi s kontrolo. Nanodelci z nefunkcionaliziranim silika ovojem (-Si) ter nanodelci s silika ovojem z vezanimi amino skupinami (-Si-NH<sub>2</sub>) prav tako sprožijo transformacijo oblike eritrocitne membrane, a sprememba v primerjavi s kontrolno skupino ni statistično značilna ( $p = 0,157$  za MD-Si in  $p = 0,865$  za MD-Si-NH<sub>2</sub>).

V kolikor pride do spremembe oblike eritrocitov, gre v veliki večini za planarne nediskoidne transformacije oblike, povzročene zaradi vpliva testiranih nanodelcev druge serije poskusov; sferične oblike so redko prisotne. Pri vzorcih, inkubiranih z nanodelci MD-Si, opazimo številne

aglutinate, povezavo med omenjenimi nanodelci ter lipidnimi membranami sosednjih eritrocitov pa smo potrdili tudi z EDXS analizo.

#### 4.1.3 EDXS ANALIZA

EDXS analizo smo izvedli na skupkih, opaženih na površini eritrocitnih membran (predpostavljeno, da gre za aglomerate testiranih nanodelcev) ter opaženih eritrocitnih aberacijah v vzorcih (sum, da gre za hemolizirane eritrocite ter za Heinzova telesca). Kot primer je v Preglednici 1 podan skupen rezultat EDXS analiz v vzorcih, inkubiranih z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ter  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ , priložena pa sta še primera EDXS analize na aglomeratih, opaženih na površini eritrocitne membrane (Slika 14).

**Preglednica 1: Rezultati EDXS analiz skupkov, opaženih na površini eritrocitnih membran**

Tip testiranih nanodelcev v vzorcu	Število EDXS spektrov	Prisotnost Co in Fe
$\text{CoFe}_2\text{O}_4$	25	1
$\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$	20	4

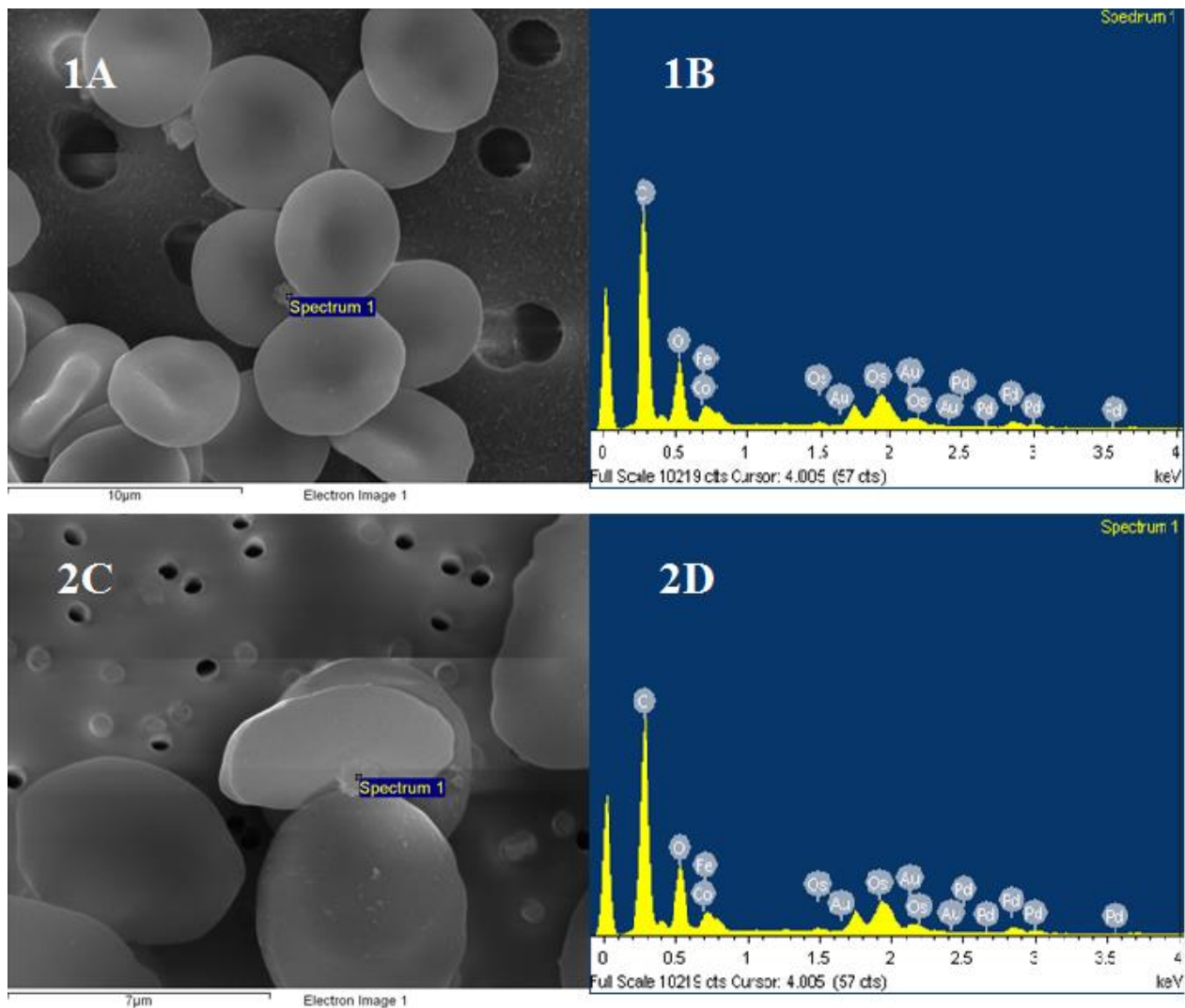
V vzorcih, inkubiranih z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , smo izvedli 25 EDXS analiz, v vzorcih z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  pa 20. 5 od 45 analiz je pokazalo, da gre za aglomerate testiranih nanodelcev.

**Preglednica 2: Deleži posameznih elementov, izmerjenih na mestu 1 (Slika 14/1A)**

Spekter	Instats.	C	O	Fe	Co	Pd	Os	Skupno
Spekter 1	Yes	46.61	24.83	7.62	4.12	2.21	14.61	100.00

**Preglednica 3: Deleži posameznih elementov, izmerjenih na mestu 2 (Slika 14/2C)**

Spekter	In stats.	C	O	Fe	Co	Pd	Os	Au	Skupno
Spekter 1	Yes	48.56	22.54	10.48	5.47	2.33	8.99	1.63	100.00



**Slika 14: Analiza EDXS aglomerata nanodelcev, opaženega na površini eritrocitne membrane v vzorcu, inkubiranem z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (1A, 1B) ter nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  (2C, 2D)**

A, C: SEM mikrografiji z označenima mestoma izvedbe EDXS analize, B, D: EDXS spekter elementov, zaznanih na testiranima predeloma na površini eritrocitne membrane. Analiza je potrdila, da gre pri testiranem skupku v prvem primeru (1A) za aglomerat nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (7.62 % Fe, 4.12 % Co), v drugem primeru (2C) pa za aglomerat nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  (10.48 % Fe, 5.47 % Co). Končna koncentracija nanodelcev v vzorcih je bila 1 mg/mL.

Z analizo EDXS ne moremo ločiti med Heinzovimi telesci (denaturiran hemoglobin) ter aglomeriranimi nanodelci. Železo je prisotno v obeh spektrih, zaradi prisotnosti nanodelcev pa prav tako tudi kobalt (pri vzorcih, inkubiranih z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ ). Razlike v deležu železa v obeh primerih so premajhne, da bi lahko z gotovostjo ločevali med njima. Na mikrografijah SEM lahko vseeno kvalitativno ločimo med njima. Površina Heinzovih telesc,

kot inkluzijskih telesc, je zaobljena, enotna, medtem ko so aglomerati nanodelcev videti kot skupki manjših podenot z nagubano, neenotno površino.

## 4.2 SEDIMENTACIJA IN AGLUTINACIJA

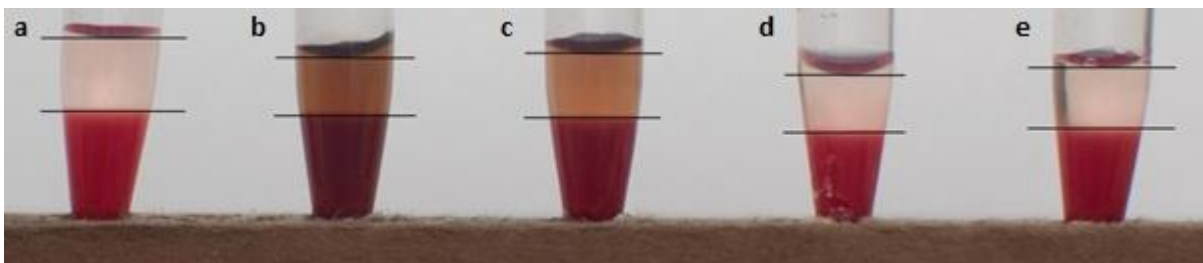
Test sedimentacije in aglutinacije smo izvedli ločeno, v dveh serijah poskusov. V prvi smo testirali vpliv nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  in  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  na dinamiko posedanja eritrocitov, v drugi pa vpliv nanodelcev MD-Si, MD-Si-COOH in MD-Si-NH<sub>2</sub>. Sedimentacijo in aglutinacijo smo pri obeh nizih opazovali v centrifugirkah različnih dimenzij, zato smo za vsako serijo pripravili ločeno kontrolo ter spremembe ESR ustrezno vrednotili.

### 4.2.1 VPLIV NANODELCEV $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ IN $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ NA DINAMIKO POSEDANJA ERITROCITOV

Eritrociti se v suspenzijah, z dodanimi nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  in nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  z adsorbirano citronsko kislino, v primerjavi s kontrolo, posedajo počasneje; ESR je torej v primerjavi s kontrolo nižji (Slika 15). Razlika v ESR med suspenzijo, z dodanimi nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (Slika 15, d in e) ter suspenzijo, z dodanimi nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  (Slika 15, b in c) ni statistično značilna. Vzorca z višjima koncentracijama nanodelcev (0,2 mg/mL, Slika 15, b in d) kažeta nižji ESR kot vzorca z nižjima koncentracijama nanodelcev (0,1 mg/mL, Slika 15, c in e).

Rdeča obarvanost supernatanta nad eritrocitnim sedimentom kot posledica hemolize v vzorcu je bila opažena pri vseh vzorcih z dodanimi nanodelci, kar nakazuje na močan vpliv nanodelcev na integriteto eritrocitne membrane.

Aglutinativ nismo opazili v nobenem od vzorcev prve serije poskusov.



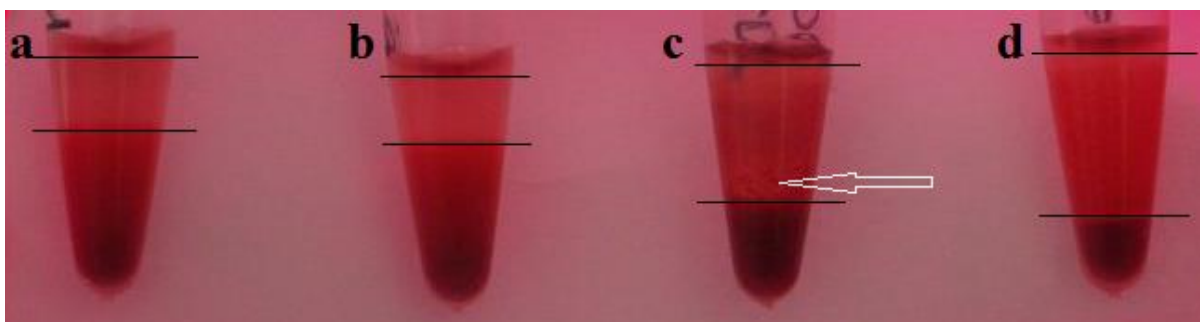
**Slika 15: Sedimentacija eritrocitov pod vplivom nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  in  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$**

Vrednosti ESR so podane v oglatih oklepajih. (a) Suspenzija eritrocitov + PBS-citratni pufer [4,7 mm/h], (b) suspenzija eritrocitov +  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  (0,2 mg/mL) [3,5 mm/h], (c) suspenzija eritrocitov +  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  (0,1 mg/mL) [3,9 mm/h], (d) suspenzija eritrocitov +  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (0,2 mg/mL) [3,3 mm/h] in (e) suspenzija eritrocitov +  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (0,1 mg/mL) [3,7 mm/h].

#### 4.2.2 VPLIV NANODELCEV MD-Si, MD-Si-COOH IN MD-Si-NH<sub>2</sub> NA DINAMIKO POSEDANJA ERITROCITOV

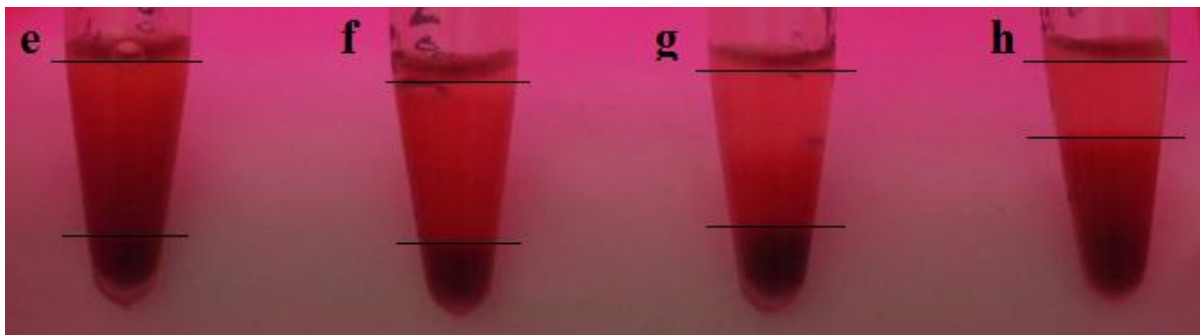
Stopnja sedimentacije eritrocitov v suspenzijah je v primerjavi s kontrolo (Slika 16, a in b) močno povišana v vseh vzorcih z dodanimi nanodelci (Slika 16, b, c in d ter Slika 17, e, f in h) z izjemo vzorca z 0,1 mg/mL dodanih nanodelcev MD-Si-NH<sub>2</sub> (Slika 17, h). Pri nanodelcih MD-Si-NH<sub>2</sub> s koncentracijo 0,1 mg/mL ESR v primerjavi s kontrolo ostane enake, koncentracija 0,6 mg/mL pa ESR suspenzije poviša (Slika 16, g). Sprememba ESR je bolj opazna pri vzorcu z dodanimi nanodelci MD-Si-COOH. Pri teh nanodelcih že 0,1 mg/mL nanodelcev ESR drastično zviša, razlike med 0,1 mg/mL in 0,6 mg/mL nanodelcev pa niso značilne. Izjema sta vzorca z dodanimi nanodelci MD-Si (Slika 16, c in d); 0,1 mg/mL dodanih nanodelcev ESR zviša primerljivo z zvišanjem ESR ob dodatku nanodelcev MD-Si-COOH ali pa 0,6 mg/mL MD-Si-NH<sub>2</sub>, 0,6 mg/mL dodanih nanodelcev MD-Si (Slika 16, c) pa povzroči rahlo nižji ESR vzorca v primerjavi z ostalimi vzorci (MD-Si-COOH/NH<sub>2</sub>) z dodanimi nanodelci. Ta vzorec je edini, v kateremu so jasno vidni aglutinati (Slika 16, označeno z belo puščico), ki so razlog za počasnejše posedanje eritrocitov.

Rdeča obarvanost supernatanta po posedanju, ki je posledica hemolize v vzorcu, je opazna pri vseh vzorcih z dodanimi nanodelci. Pri vzorcih, inkubiranih z nanodelci MD-Si-NH<sub>2</sub>, je supernatant pri obeh koncentracijah nanodelcev le rahlo in samo deloma obarvan, kar kaže na nizek odstotek hemoliziranih eritrocitov v vzorcu. V primeru nanodelcev MD-Si-COOH in MD-Si je supernatant pri obeh testiranih koncentracijah nanodelcev v vseh vzorcih v celoti ter intenzivno obarvan rdeče, kar kaže na visok odstotek hemolize v vzorcu. Izstopa vzorec z 0,6 mg/mL dodanih nanodelcev MD-Si-COOH (Slika 17, e), pri tem vzorcu je supernatant obarvan temno rdeče, kar kaže na zelo intenzivno hemolizo v vzorcu.



**Slika 16: Sedimentacija eritrocitov pod vplivom nanodelcev MD-Si**

Vrednosti ESR so podane v oglatih oklepajih. (a) Suspenzija eritrocitov + PBS-citratni pufer [5,3 mm/h], (b) suspenzija eritrocitov + PBS-citratni pufer [5,5 mm/h], (c) suspenzija eritrocitov + MD-Si (0,6 mg/mL) [9,6 mm/h] in (d) suspenzija eritrocitov + MD-Si (0,1 mg/mL) [11,4 mm/h]. Bela puščica označuje primer večjega aglutinata, opaženega v supernatantu vzorca.



**Slika 17: Sedimentacija eritrocitov pod vplivom nanodelcev MD-Si-COOH in MD-Si-NH<sub>2</sub>**

Vrednosti ESR so podane v oglatih oklepajih. (e) Suspenzija eritrocitov + MD-Si-COOH (0,6 mg/mL) [12,9 mm/h], (f) suspenzija eritrocitov + MD-Si-COOH (0,1 mg/mL) [11,9 mm/h], (g) suspenzija eritrocitov + MD-Si-NH<sub>2</sub> (0,6 mg/mL) [11,4 mm/h] in (h) suspenzija eritrocitov + MD-Si-NH<sub>2</sub> (0,1 mg/mL) [5,8 mm/h].

### 4.3 HEMOLITIČNOST NANODELCEV

V vseh suspenzijah eritrocitov z dodanimi testiranimi nanodelci smo zaznali delež hemoliziranih rdečih krvničk, podrobnejša analiza hemolitičnosti posameznega tipa nanodelcev sledi v besedilu pod preglednicama (Preglednici 4 in 5).

V Preglednici 4 ter 5 so podani rezultati meritev deleža hemolize v vzorcih po obeh uporabljenih metodah: metodi meritve padca absorbance (oz. padca OD – optical density, ang.), Preglednica 4, ter metodi meritve prostega hemoglobina v supernatantu, Preglednica 5.

**Preglednica 4: Izmerjene vrednosti deleža hemolize v vzorcu po metodi meritve padca absorbance**

Koncentracija delcev v vzorcu (µg/mL)	Delež hemolize v vzorcu (%)							
	MD-Si		MD-Si-NH <sub>2</sub>		MD-Si-COOH		CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -CA	
	replika 1	replika 2	replika 1	replika 2	replika 1	replika 2	replika 1	replika 2
37,5	1,12782	2,631579	0,75188	0,37594	6,766917	4,887218	1,503759	2,631579
75	3,007519	4,135338	1,12782	1,503759	9,022556	9,774436	1,879699	2,255639
150	6,390977	4,887218	2,631579	2,255639	19,54887	18,04511	5,639098	4,887218
300	7,518797	8,270677	4,511278	3,383459	25,18797	24,43609	7,894737	7,142857
600	8,646617	7,142857	5,263158	4,887218	37,59398	34,58647	17,29323	15,78947

Za vsak tip nanodelcev smo opravili dve ponovitvi – označeni kot replika 1 ter replika 2.



**Preglednica 5: Izmerjene vrednosti deleža hemolize v vzorcu po metodi meritve prostega hemoglobina v supernatantu**

Koncentracija delcev v vzorcu ( $\mu\text{g/mL}$ )	Delež hemolize v vzorcu (%)							
	MD-Si		MD-Si-NH <sub>2</sub>		MD-Si-COOH		CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -CA	
	replika 1	replika 2	replika 1	replika 2	replika 1	replika 2	replika 1	replika 2
37,5	1,759651	1,595962	0,668394	0,77752	5,415359	5,797299	1,432274	1,323148
75	3,669349	3,396535	1,432274	1,214023	9,507571	9,289319	1,977902	1,759651
150	5,469922	5,142545	2,468967	4,160415	15,12754	15,61861	4,924294	4,978857
300	7,816123	7,979812	3,942163	3,833038	19,76538	19,32888	6,997681	6,77943
600	9,88951	10,38058	7,052244	5,960988	46,28291	28,54999	12,94503	13,43609

Za vsak tip nanodelcev smo opravili dve ponovitvi – označeni kot replika 1 ter replika 2.

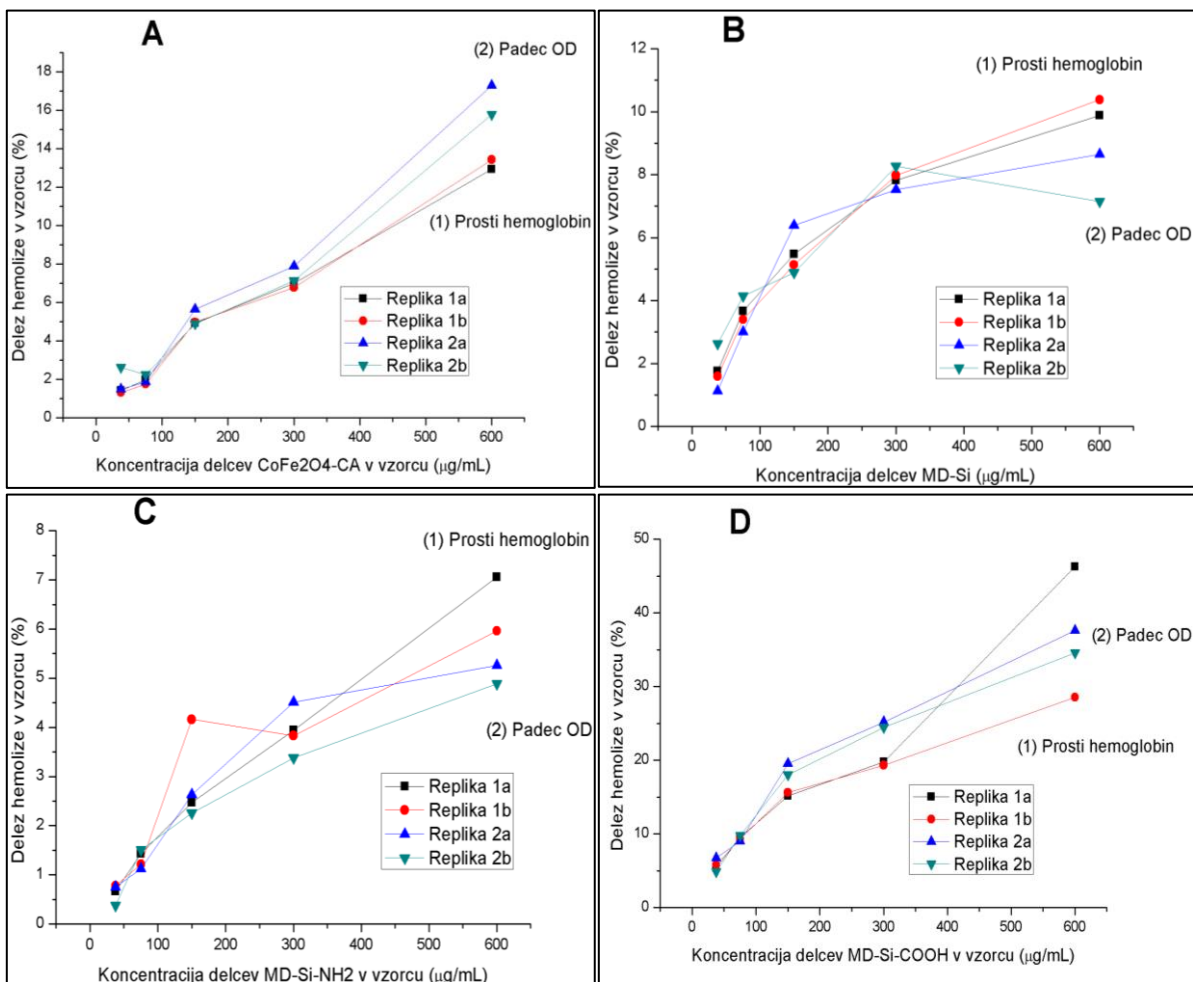
Najbolj hemolitični so bili nanodelci MD-Si-COOH (Slika 18/D). Tudi najnižja dodana koncentracija teh nanodelcev, 0,0375 mg/mL, povzroči do 7 % hemolize v vzorcih, njen odstotek pa z nadaljnjim višanjem koncentracije omenjenih nanodelcev strmo narašča. Pri najvišji testirani koncentraciji, 0,6 mg/mL, je tako delež hemolize v vzorcih v povprečju celo okoli 35 %. Pri tej koncentraciji opazimo odstopanje v izmerjenem deležu hemolize pri repliki 1a. Sklepamo, da se nanodelci pred to meritvijo niso v celoti odcentrifugirali iz vzorca in so prispevali k lažno povišani izmerjeni absorbanci supernatanta vzorca. Na podlagi meritev zaključujemo, da vrednosti deleža hemolize v vzorcu kot posledica vpliva nanodelcev MD-Si-COOH močno presegajo arbitrarno mejo za oceno biokompatibilnosti materiala *in vivo*, tj. 5 % (Choi in sod., 2011).

Kot zmerno hemolitični so se izkazali nanodelci CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CA (Slika 18/A). Delež hemolize v vzorcu zaradi destabilizacije membrane pod vplivom le-teh je tudi pri najvišji dodani koncentraciji nanodelcev (0,6 mg/mL) še vedno v povprečju pod 15 %, torej jih do te koncentracije lahko označimo za biokompatibilne. Opaziti je tudi trend strmega naraščanja % hemolize v vzorcu v odvisnosti od koncentracije nanodelcev CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CA. Omenjeni nanodelci v koncentracijah, višjih od 0,6 mg/mL, najverjetneje tako niso povsem varni za uporabo pri intravenoznem vnosu.

Hemolitičnost nanodelcev MD-Si (Slika 18/B) je primerljiva z nanodelci CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CA. Delež hemolize v vzorcu za testirane nanodelce je pri vseh koncentracijah nanodelcev pod 15 %. Kot razberemo z grafa (Slika 18), % hemolize v vzorcih ne narašča povsem sorazmerno z naraščanjem koncentracije nanodelcev MD-Si v vzorcih. Na podlagi opažanj pri SEM mikroskopiji ter pri testu aglutinacije sklepamo, da začne hemolitični potencial nanodelcev upadati po tvorbi aglutinativ. Eritrociti so v aglutinativih namreč stabilizirani, zmanjša se aktivna površina eritrocitnih membran, torej površina, ki je lahko podvržena vplivu nanodelcev, ter tudi

aktivna površina nanodelcev samih, kar se ob zviševanju koncentracije nanodelcev v suspenziji kaže kot pojav "dušene" hemolitičnosti nanodelcev MD-Si.

Za najbolj biokompatibilne so se na podlagi testov hemolitičnosti izkazali nanodelci MD-Si-NH<sub>2</sub> (Slika 18/C). Delež hemolize v vzorcih, tudi pri najvišjih testiranih koncentracijah teh nanodelcev, v povprečju ne presega 6 %.



**Slika 18: Delež hemolize v eritrocitnih suspenzijah kot posledice delovanja nanodelcev CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CA, MD-Si, MD-Si-NH<sub>2</sub> ter MD-Si-COOH**

(A) Graf za nanodelce CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CA, (B) graf za nanodelce MD-Si, (C) graf za nanodelce MD-Si-NH<sub>2</sub> ter (D) graf za nanodelce MD-Si-COOH. Repliki 1a in 1b pripadata metodi meritve prostega hemoglobina v supernatantu, medtem ko repliki 2a in 2b pripadata metodi meritve padca OD vzorca.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 MEHANIZMI VPLIVA IZBRANIH MAGNETNIH NANODELCEV NA MORFOLOGIJO ERITROCITOV

V magistrskem delu smo ugotavljali vpliv izbranih magnetnih nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ , MD-Si, MD-Si-NH<sub>2</sub> ter MD-Si-COOH na morfologijo eritrocitov. V razpravi razmišljamo, kako je prišlo do opaženih morfoloških sprememb eritrocitov zaradi delovanja izbranih nanodelcev, torej, kateri mehanizmi so v ozadju posamezne opažene spremembe v morfologiji eritrocitov, ali kombinaciji sprememb. V skladu z izbrano literaturo predlagamo nabor možnih dogodkov, ki sledijo stiku nanodelcev oz. aglomeratov nanodelcev z eritrocitno membrano:

- a) Lokalne spremembe ukrivljenosti membrane, ovijanje membrane okoli aglomeratov nanodelcev in njihovo vgrezanje v membrano, kar vodi v enkapsulacijo ter v končni fazi v internalizacijo nanodelcev. Na integriteto membrane tako vpliva celoten proces internalizacije ter znotrajcelično delovanje nanodelcev (Fosnaric in sod., 2009; Zhang SW in sod., 2012).
- b) Lokalne spremembe v ukrivljenosti membrane, ukrivljanje ter ovihanje membrane okoli aglomeratov nanodelcev, čemur sledi izčrpavanje lipidov iz dvosloja. Ta proces vodi v lokalne razlike v fluidnosti membrane, gostoti ter lipidni sestavi, v končni fazi pa tudi v znižanje membranske integritete in/ali formacijo por oz. naluknjanje membrane (Chen J. in sod., 2009; Jing in sod., 2011; Ginzburg in sod., 2007).
- c) Vezava nanodelcev oz. aglomeratov nanodelcev na membranske proteine ali sterično oviranje njihovega delovanja, lahko tudi kot posledica enega ali večih mehanizmov iz točk a in b. Ključno vlogo igra vpliv nanodelcev na ionske kanalčke (Anionski izmenjevalec 1 oz. Band 3 protein) ter posledično spremembe v ionski homeostazi eritrocitov, upoštevati pa moramo tudi manj specifične interakcije nanodelcev z membranskimi proteini, ki vodijo v preoblikovanje submembranskega citoskeleta (Soenen in sod., 2009).
- d) Lokalne stabilizacije kompleksa aglomerat nanodelcev/nanodelec-zunanji sloj lipidne membrane. Zaradi neposredne bližine sosednjih eritrocitov lahko taka stabilizacija vodi v aglutinacijo, sterična oviranja membranskih proteinskih kompleksov ter nastanka por v membrani, ni pa nujno. Do interakcije nanodelec-membrana ter aglomerat nanodelcev-membrana lahko pride tudi brez opaznih morfoloških sprememb.

Nanodelci lahko na strukturo membrane direktno ali indirektno vplivajo preko spremenjene fluidnosti in sprememb v površinskem naboju lipidnega dvosloja ter s širitvijo ali krčenjem enega sloja membrane relativno na drugega. Pomen slednjega je zajet v teoriji sklopljenega lipidnega dvosloja (Sheetz in Singer, 1974; Dobereiner in sod., 1997), ki pojasnjuje ozadje stomatocitnih in ehinocitnih transformacij. Hipoteza pravi, da se faktorji, ki vodijo v širitev (raztegnitev) zunanjšega sloja lipidne membrane relativno na notranji, kažejo kot tendenca membrane k formaciji konveksnih lokalnih struktur, kot na primer ehinocitnih spikul. Nasprotno, širitev notranjšega sloja membrane glede na zunanjšega favorizira formacijo lokalnih vdolbin, kar se globalno odraža kot nabrekliina – opazno pri stomatocitnih transformacijah.

V skladu z opisanim konceptom lahko spremembo oblike eritrocitne membrane pojasnimo kot posledico spremembe povprečnih lokalnih ukrivljenosti in raztegnjenosti membrane zaradi adsorpcije nanodelcev na lipidne komponente membrane (ali membranske proteine). Izgube fosfolipidov v zunanjem sloju membrane (izčrpavanje sloja ob prisotnosti nanodelcev ali pa kot posledica enkapsulacije nanodelcev) vodijo v relativno razširitev notranjšega sloja in posledično v globalno transformacijo oblike celice (Betz in sod., 2007; Rudenko, 2010).

Poleg lokalnih razširitev v enem od obeh membranskih slojev lahko transformacijo oblike celic pojasnimo tudi kot posledico spremembe v fluidnosti dvosloja. Wang in sod. (2008) so dokazali, da negativno nabiti nanodelci inducirajo lokalne gelacije (trdna lipidna faza) pri drugače fluidnih membranah, medtem ko pozitivno nabiti nanodelci izvirno rigidno lipidno membrano naredijo bolj fluidno. Povprečje lokalnih sprememb v fluidnosti membrane se tako odraža kot globalna transformacija oblike eritrocita, kot posledica delovanja nanodelcev.

Zmerno hemolitičnost nanodelcev si lahko razlagamo tudi kot posledico enkapsulacije nanodelcev. Bližina manjših, negativno nabitih aglomeratov nanodelcev eritrocitni membrani sproži spremembo kota lipidnih glav glede na preostali del molekul, kar vodi v enkapsulacijo (Fosnaric in sod., 2009). Do formacije por lahko pride v kateri koli fazi procesa enkapsulacije (invaginacija nanodelcev, odcep vezikla ob internalizaciji nanodelcev), v vzorcu pa se pojav kaže kot povišan delež hemoliziranih eritrocitov, ki smo ga opazili tudi v naših poskusih.

Enkapsulacija nanodelcev pa ni edini proces, ki lahko vodi v hemolizo krvne celice ob izpostavitvi nanodelcem. Lipidni dvosloj eritrocitov sestoji večinoma iz holesterola in fosfolipidov; za stabilnost dvosloja pa so pomembne razlike v sestavi obeh plasti. Zunanji sloj vsebuje večji delež glikolipidov, fosfatidilholina ter sfingomielina, medtem ko se v notranjem sloju pogosteje pojavlja fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin in fosfatidilinozitol. Porazdelitev fosfolipidov, transmembranskih proteinov in holesterola v kombinaciji s citoskeletom so ključni dejavniki za ohranjanje integritete eritrocitne membrane (Stello in sod., 2003).

Pomembno vlogo pri obliki eritrocitne membrane pa igrajo tudi membranski in submembranski proteini. Osmotski pritisk eritrocite vodi v stalno težnjo k globularizaciji in nabrekanju (sferoidne in stomatoidne transformacije). Eritrociti temu zunanjemu pritisku nasprotujejo z zagotavljanjem ionskega ravnovesja. Membranske črpalke natrijeve ione odstranjujejo iz celic, v celice pa dovajajo kalijeve ione. Proces ionske homeostaze je bil opisan kot "pasivno puščanje" (ang. "the passive leak"). Ključno vlogo v omenjenem procesu igra proteinski kompleks AE1 oz. anionski izmenjevalec 1 (poznani tudi kot Band 3 protein). Okvara AE1 vodi v dedno patološko stanje, kongenitalna stomatocitoza; "pasivno puščanje" se poveča, ionsko ravnovesje je porušeno, v eritrocitih se kopičijo soli in voda, kar vodi v njihovo nabrekanje in v končni fazi v hemolitično anemijo. Proteinski kompleks AE1 poleg ionskega ravnovesja zagotavlja tudi stabilnost lipidnega dvosloja. Okvare AE1 zato, poleg v stomatocitozo, vodijo tudi v postopno izgubo membranskih lipidov zaradi odcepljanja mikroveziklov od nestabiliziranega lipidnega dvosloja. V kolikor testirani nanodelci interagirajo s kompleksom AE1 ali predelom membrane, bogatim z omenjenim proteinom, je pričakovati, da bodo posledice podobne tistim, pogojenim z dedno okvaro proteina. Prav tako lahko pričakujemo, da v kolikor pri interakcijah nanodelec-AE1 ne gre za visokospecifične interakcije, posledice le-teh ne bodo opazne v celotnem vzorcu in v vseh paralelkah posameznega vzorca.

Pri sorodni okvari, kongenitalni sferocitozi, so poleg Band 3 proteinskega kompleksa vpleteni še drugi membranski proteini, kot npr. spektrin (alfa in beta), ankirin, protein 4.2 in drugi membranski proteini eritrocitov (Gallagher in sod., 1993; Perrotta in sod., 2003). Našteti proteini so ključni pri zagotavljanju in ohranjanju normalne oblike eritrocitov, tj. oblike bikonkavnega diska. Do patološkega stanja najpogosteje pride zaradi okvare ankirina, vloga katerega je med drugim tudi vezava in vgradnja spektrina v submembranski citoskelet – okvara se kaže v porušeni stabilnosti citoskeleta in njegovi nižji gostoti. Sprememba strukture in gostote submembranskega ogrodja se odraža v zmanjšani površini membrane, manjši prostornini celice, stalni prisotnosti abaracijske sferične oblike eritrocitov v krvi posameznika, s to dedno okvaro, ter slabi deformabilnosti eritrocitov.

Interakcija nanodelcev z membranskimi proteini se torej večinoma morfološko kaže kot težnja k sferoidnosti oz. delni sferičnosti, kot npr. pri stomatocitah. Ionski izmenjevalci so pri eritrocitih neizogibno povezani s celičnim ogrodjem, kar predstavlja še dodatno pot, preko katere lahko nanodelci vplivajo na spremembo oblike eritrocitov. Sami membranski proteini pa tudi stabilizirajo lokalno membransko regijo, kjer so prisotni, zato njihova izguba vodi v izgubo membranskih lipidov, njihovo preureditev, manjšanje površine membrane ter v ekstremnih primerih tudi v hemolizo.

### 5.1.2 VPLIV $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ TER $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ NANODELCEV NA MORFOLOGIJO ERITROCITOV

Rezultati kažejo, da nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ter  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  povzročijo strukturne spremembe eritrocitnih membran, nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  pa eritrocitne membrane tudi destabilizirajo. Inkubacija suspenzije izoliranih eritrocitov z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ter  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  je v obeh primerih vodila v preoblikovanje eritrocitnih membran, kar smo opazili s SEM.

Pri analizi mikrografij SEM smo pričakovali večji delež nediskoidnih eritrocitov v vzorcih, inkubiranih z magnetnimi nanodelci v primerjavi s kontrolo. Opažene morfološke razlike bi tako lahko pripisali preoblikovanju eritrocitnih membran zaradi delovanja nanodelcev. Analiza mikrografij je pokazala, da statistično značilno nediskoidnost opazovanih eritrocitov opazimo le po inkubaciji vzorcev z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ . Pri slednjih opazimo predvsem sferoidne eritrocitne oblike, sferocite in ehinosferocite. Pri vzorcih, inkubiranih z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , ne opazimo značilno povišane nediskoidnosti v primerjavi s kontrolo. Vendar pa tudi pri slednjih opazimo delež sferoidnih eritrocitov, medtem ko se pri kontroli v populaciji nediskoidit pojavljajo predvsem planarni ehinociti.

Zaključimo lahko, da oba tipa nanodelcev z enakim magnetnim jedrom sicer vodita eritrocite v enako preoblikovanje celične oblike, kar zaznamo kot sferocitozo. A vendar, nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  povzročijo še dodatne strukturne spremembe eritrocitnih membran, kar zaznamo kot ehinoidnost. V končni fazi nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  membrane tudi destabilizirajo do te mere, da pride do hemolize, kar smo opazili na mikrografijah SEM ter pri testu sedimentacije in aglutinacije ter izmerili pri testu hemolitičnosti nanodelcev.

Oblika eritrocitov je eden od ključnih dejavnikov, ki določajo hitrost posedanja eritrocitov v suspenziji (glej poglavje 2.3.1). Sferocitna transformacija oblike eritrocitov je med vsemi nediskoidnimi transformacijami tudi edina, ki znižuje ESR eritrocitne suspenzije pri testu sedimentacije in aglutinacije. Pričakovali smo, da bo do sprememb hitrosti posedanja eritrocitov prišlo le takrat, ko bo prišlo do odklona oblike eritrocitov od diskoidne bikonkavne. Po inkubaciji vzorcev z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ter  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  smo pri analizi mikrografij opazili sferoidne eritrocite. Na podlagi literature smo tako pričakovali počasnejše posedanje eritrocitov v suspenziji v primerjavi s kontrolo, kjer so v večinskem deležu prisotni nativni eritrociti. Rezultati testa sedimentacije in aglutinacije so pokazali, da se eritrociti, inkubirani z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ter  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ , v skladu s pričakovanji posedajo počasneje kot nativni eritrociti. Sprememba v hitrosti posedanja je sicer minimalna in ne tako izrazita kot na primer sprememba ESR pri ehinocitozi v vzorcu. Opaženo bi lahko pripisali majhnemu deležu morfološko preobraženih eritrocitov v testiranih vzorcih (kot je razvidno iz SEM mikrografij eritrocitov, inkubiranih s suspenzijami nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  in  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ ). Aglomerati obeh tipov

nanodelcev pa verjetno tudi pritiskajo na eritrocite ter pospešujejo njihovo posedanje. Hitrost posedanja rdečih krvničk tako ni toliko upočasnjena, kot bi bila zaradi same sferoidnosti eritrocitov. Pri testu sedimentacije in aglutinacije pa smo opazili tudi rdečkasto obarvanost supernatanta po posedanju, kar je nakazovalo na hemolizo v vzorcih.

S testoma hemolitičnosti nanodelcev smo želeli ugotoviti, v kolikšni meri testirani nanodelci ireverzibilno destabilizirajo eritrocitne membrane; v kolikšni meri torej pride do izgube integritete celične membrane in do razpada celice, tj. do hemolize. Hemolizo v vzorcih, inkubiranih z nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ , smo opazili že na mikrofotografijah ter pri testu sedimentacije in aglutinacije. Pričakovali smo, da bosta testa hemolize to kvantitativno potrdila. Rezultati testov hemolize so pokazali močan hemolitični potencial nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ . Ob dodatku slednjih smo pri koncentraciji 0,6 mg/mL nanodelcev izmerili do 17 % delež hemolize v vzorcih. Predvidevamo, da so mehanizmi delovanja nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ , ki so vodili v formacijo površinskih spikul eritrocitne membrane, to nadalje destabilizirali. Lipidni dvosloj s spremembo svoje oblike ni bil več sposoben kompenzirati zunanjega vpliva nanodelcev. Prišlo je do izgube integritete eritrocitne membrane ter do razpok v membrani, kar je povzročilo smrt določenega deleža rdečih krvnih celic. Tudi pri procesu internalizacije nanodelcev bi lahko prihajalo do formacije por v lipidnem dvosloju ter do hemolize krvnih celic, a ga z nobenim od izvedenih testov ne moremo potrditi.

Različnemu vplivu nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ali  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  z adsorbirano citronsko kislino na eritrocitno membrano lahko pripišemo razliki v velikosti aglomeratov obeh tipov nanodelcev ter razliki v površinskem naboju. V našem primeru smo za oba tipa nanodelcev izmerili podoben zeta potencial, zato temu nismo pripisovali večjega vpliva na transformacijo eritrocitov. Velikost aglomeratov nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  v suspenziji je variirala od 70 do 250 nm, medtem ko je bila velikost aglomeratov nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  znatno večja, nad 300 nm (večina pa je dosegala mikrometrski rang velikosti). Sklepamo, da je pri manjših aglomeratih skupno več nanodelcev v suspenziji prišlo v stik z lipidno membrano, s čimer se zviša verjetnost lokalnega vpliva nanodelcev na membrano. Pri večjih aglomeratih je več nanodelcev ujetih v notranjosti skupka in tako ne morejo aktivno vplivati na eritrocite, saj ne pride do medsebojnega stika. Manjši aglomerati nanodelcev predstavljajo večjo aktivno površino suspenzije nanodelcev. Površina nanodelcev, ki bo potencialno reagirala oz. interagirala z eritrociti, je znatno višja kot pri večjih aglomeratih, kar poveča potencialni vpliv nanodelcev na eritrocite. Zviša pa se tudi verjetnost, da bodo nanodelci vplivali na predel membrane, kjer je prisoten ionski izmenjevalni proteinski kompleks oz. na predel membrane, ki je pomemben za njeno strukturo. Negativno nabita površina nanodelcev lahko povzroča lokalne gelacije predelov membrane, ki pridejo v stik z nanodelci. Negativen naboj pa pomeni tudi pojav odbojnih sil med nanodelci in negativno nabitimi komponentami eritrocitne membrane, ter privlačnih sil med nanodelci in komponentami membrane s pozitivnim nabojem. Do

omenjenih interakcij pri nevtralnih nanodelcih ne prihaja. Vpliv teh nanodelcev na eritrocite lahko tako pojasnimo predvsem s steričnim oviranjem nanodelcev oz. aglomeratov nanodelcev ionskih kanalčkov ter s poškodbami eritrocitov pri enkapsulaciji nanodelcev oz. po njihovi internalizaciji.

Rezultati mikroskopije SEM kažejo, da eritrociti v vzorcih, z dodanimi nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  ter  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , težijo k sferoidnim ehinocitnim transformacijam oblike. Sklepamo, da gre za vsaj dva mehanizma, enega, ki vodi v sferoidnost, ter drugega, katerega posledica je pojav spikul, ehinocitoze. Aglomerate obeh tipov omenjenih nanodelcev (potrjeno z EDXS, slika 14) smo med mikroskopiranjem našli na površini eritrocitnih membran, iz česar sklepamo, da pride do stabilizacije aglomerata nanodelcev z zunanjim slojem membrane. Ker internalizacije nanodelcev z nobeno od uporabljenih metod ne moremo potrditi, vpliv nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ter  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  na eritrocitno membrano pojasnjujemo sledeče. Ehinocitičnost oz. formacija spikul je posledica interakcij nanodelcev z lipidnim dvoslojem. Negativen naboj površine nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  lahko povzroči lokalne spremembe v fluidnosti membrane, vgrezanje aglomerata v lipidni dvosloj pa lahko privede v lipidno izčrpavanje; oba mehanizma vodita v formacijo spikul. Večji aglomerati se bodo težje ugrezali in stabilizirali počasneje ter na manj mestih na membranah. Poleg različnega površinskega naboja nanodelcev je to poglavitni razlog za opažene razlike v vplivu obeh tipov nanodelcev. Opazili smo, da nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  močneje destabilizirajo membrano kot nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , kar je v nasprotju s pričakovanji. Predvidevali smo, da bodo imeli večji aglomerati nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  na eritrocitno membrano večji vpliv kot manjši aglomerati nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ .

Zaradi lokalnih stikov aglomeratov z membrano pride do steričnega oviranja kompleksov AE1, kar vodi v porušeno ionsko hemeostazo in/ali destabilizacijo citoskeleta. Obe poti vodita v sferoidne membranske transformacije, bodisi v obliki lokalnih nabrekanj (stomatocitoza), bodisi kot globalna transformacija membrane (sferocitoza). Prišlo bi lahko tudi do specifične vezave nanodelcev na sam proteinski kompleks, ob čemer se porajajo dvomi; v kolikor bi bila vezava za dani proteinski kompleks specifična, bi bile razlike med paralelkami vzorca istega tipa nanodelcev manjše oz. do razlik ne bi prišlo. Ampak opazimo nasprotno, razlike v deležu nediskoidnih eritrocitnih transformacij med paralelkami so očitne. Čeprav nanodelci  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ne kažejo statistično značilnega vpliva ( $p < 0,05$ ) na morfologijo eritrocitov, lahko pri posameznih paralelkah zasledimo večji delež transformiranih krvničk. Omenjeno dejstvo govori v prid naključni interakciji v nasprotju s specifično. Do sferocitoze pride le takrat, ko pride aglomerat nanodelcev v stik s predelom eritrocitne membrane, ki je bogat z ionskimi izmenjevalci, kar privede do vpliva nanodelcev na ionsko ravnovesje ter v končni fazi v spremembo oblike celice.



Na podlagi rezultatov smo potrdili domnevo, da nanodelci z enako kemijsko sestavo magnetnega jedra ter različno površino različno reagirajo z eritrociti. Pri nanodelcih  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ -CA je prišlo do stabilizacije na površini eritrocitov, kar je vodilo do razširitve zunanega lipidnega dvosloja napram notranjemu in posledično do formacije spikul. Omenjeni stabilizirani nanodelci so nato izčrpavali lipidni dovsoj, kar je skupaj s procesom enkapsulacije ob internalizaciji vodilo v nastanek vrzeli v eritrocitni membrani ter v hemolizo eritrocitov. Zaradi negativnega naboja  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ -CA nanodelcev je prihajalo tudi do lokalnih gelacij predelov eritrocitne membrane, slabše fluidni lipidni dvosloj pa je težje odreagiralo na nastale vrzeli v membrani. Oba tipa nanodelcev sta s svojimi aglomerati ovirala delovanje ionskih izmenjevalcev, kar je bilo bolj očitno v primeru, ko je prišlo do stabilizacije aglomerata nanodelcev na z omenjenimi izmenjevalci bogatem predelu eritrocitne membrane. Posledica oviranja je bila porušena ionska homeoostaza ter povečanje volumna eritrocitov (oz. zmanjšanje površine, v kolikor ne bi šlo za interakcijo nanodelcev z membranskimi proteini), kar je vodilo v opaženo sferocitozo.

Pomembna lastnost nanodelcev, ki so posebej zasnovani za uporabo v biomedicini, je biokompatibilnost. Nanodelci naj tako ne bi smeli imeti kvarnih učinkov na tkiva, s katerimi pridejo v stik. V primeru krvnega tkiva delež hemolize v vzorcu, povzročen zaradi delovanja nanodelcev, ne sme presegati petih odstotkov (Choi in sod., 2011). V kolikor je omenjena meja presežena, se povišan delež hemoliziranih eritrocitov obravnava kot kvarni učinek nanodelcev in ti tako ne veljajo za povsem hemokompatibilne oz. biokompatibilne s krvjo. Nekateri avtorji navajajo (Dobrovolskaia in sod., 2008) 15 % delež hemolize v vzorcih, povzročene z nanodelci, kot zgornjo mejo biokompatibilnosti. V kolikor je meja presežena, je intravenozen vnos nanodelcev odsvetovan, vprašljiva pa je tudi nadaljnja uporaba v biomedicini.

Sprememba ESR sama po sebi ni eden od kriterijev biokompatibilnosti. Vseeno pa se je potrebno vprašati, ali bi spremenjena dinamika eritrocitov lahko imela nepredvidene kvarne učinke za tkivo oz. organizem. Sprememba eritrocitne oblike, ki narekuje počasnejše potovanje eritrocitov pod vplivom gravitacije, bi lahko pomenila tudi počasnejše potovanje rdečih krvničk po krvožilju. Prav tako povečan volumen eritrocitov v primeru sferoidnosti pomeni njihovo težje dostopanje v tkiva, v katerih so potrebni v velikih količinah.

Ne nazadnje pa je pomembna tudi sama oblika eritrocitov. Diskoidna bikonkavna nativna oblika je optimalna za nemoteno izmenjavo plinov ter za uspešno prečenje epitelov. Prav za slednje je ključna deformabilnost krvnih celic, ki pa je v veliki meri pogojena z njihovo morfologijo. Sferoidne celice so slabo deformabilne, v kolikšni meri pa omenjena lastnost eritrocitom otežuje prehajanje epitelov, pa bi bilo potrebno podrobneje raziskati.

Zaključimo lahko, da kakršen koli odklon eritrocitne morfologije od nativne lahko vodi v za organizem nepredvidljive zaplete. Pri kratkotrajni uporabi nanodelcev se po koncu izpostavitve vzpostavi prvotno stanje, morfološke spremembe so reverzibilne. Posebej problematično je dejstvo, da v kolikor nanodelcev iz krvi ne odstranimo, do vzpostavitve prvotnega stanja eritrocitne oblike dalj časa ne bo prišlo. Pri dolgotrajni uporabi nanodelcev v terapevtske namene so morfološke spremembe eritrocitov za čas uporabe nanodelcev torej ireverzibilne. Ocena hemokompatibilnosti posameznega tipa nanodelcev je zato še toliko bolj pomembna in potrebna.

### 5.1.3 VPLIV NANODELCEV MD-Si, MD-Si-NH<sub>2</sub> TER MD-Si-COOH NA MORFOLOGIJO ERITROCITOV

Po analizi rezultatov testov vpliva nanodelcev MD-Si ter MD-Si-COOH na eritrocite lahko potrdimo vse tri hipoteze. Oba tipa nanodelcev sta povzročila spremembo eritrocitne morfologije, kar smo opazili s SEM. Povzročeno morfološko stanje je vplivalo na dinamiko posedanja eritrocitov, kar je bilo razvidno iz testa sedimentacije in aglutinacije. Vplivi omenjenih nanodelcev na eritrocitno membrano oz. na njeno integriteto pa so bili dobro vidni iz rezultatov testov hemolitičnosti nanodelcev. Opazimo, da so nanodelci z različno nabitostjo površino a z enako kemijsko sestavo jedra različno reagirali z eritrociti. V obeh primerih opazimo, da je prišlo do transformacije eritrocitne oblike zaradi delovanja omenjenih nanodelcev, a je bila ta bolj očitna pri bolj negativno nabitih nanodelcih v primerjavi z rahlo negativno nabitimi. Da pa se omenjena tipa nanodelcev razlikujeta tudi v mehanizmi delovanja, preko katerih vplivata na morfološke spremembe eritrocitov, je očitno že iz visoke stopnje hemolitičnosti nanodelcev MD-Si-COOH v primerjavi z nanodelci MD-Si.

Nanodelci MD-Si-NH<sub>2</sub> so se izkazali za izjemo. Morfoloških sprememb eritrocitne membrane zaradi delovanja omenjenih nanodelcev s SEM ter testom sedimentacije in aglutinacije nismo opazili. Tudi testa hemolitičnosti nanodelcev le-te nista potrdila. Statistično signifikantnega vpliva nanodelcev MD-Si-NH<sub>2</sub> na eritrocite torej nismo dokazali pri nobenem od izvedenih testov. Vse tri hipoteze so tako za nanodelce MD-Si-NH<sub>2</sub> neveljavne.

Dobljeni rezultati v naši študiji niso v skladu z rezultati Duc Mai in sodelavcev (2013), ki poročajo o interakcijah kationskih (amino-funkcionaliziranih) nanodelcev z magnetnim jedrom s površino eritrocitov in o odsotnosti interakcij med anionskimi nanodelci in rdečimi krvnimi celicami. Trdijo, da negativno nabita površina eritrocitov (*N*-acetilneuraminska kislina) preprečuje vsakršne interakcije karboksilnih skupin s površino celic. Razlike v rezultatih lahko razložimo na osnovi različnih medijev, v katerih so delci suspendirani. V naši študiji smo delce suspendirali v PBS-citratnem pufu, v študiji Duc mai in sod. pa v MOPS-saharoznem pufu. Medij, v katerem so nanodelci suspendirani, lahko bistveno vpliva na njihove sekundarne

značilnosti v suspenziji. Prav tako so bili aglomerati naših nanodelcev MD-Si-NH<sub>2</sub> kot tudi sami nanodelci MD-Si-NH<sub>2</sub> večji v primerjavi z nanodelci, uporabljenimi v študiji Duc Mai in sodelavcev, zato rezultatov ni smiselno neposredno primerjati.

Rezultati SEM kažejo, da so prav vsi nanodelci drugega sklopa (MD-Si-NH<sub>2</sub>, MD-Si-COOH, MD-Si) povzročili neko spremembo morfologije eritrocitnih membran. Ta je bila statistično signifikantna le pri MD-Si-COOH nanodelcih, pri ostalih pa so bile spremembe primerljive s kontrolo. Najpogosteje opažena transformacija eritrocitne oblike je bila planarna ehinocitoza, opazili smo tudi delež stomatoehinocit, vendar je bil ta v primerjavi s stopnjo ehinocitoze v vzorcih, inkubiranih z nanodelci CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, zelo nizek.

Za najbolj hemolitične so se izkazali nanodelci, pri katerih smo tudi pri SEM opazili statistično značilen vpliv na morfologijo eritrocitov, nanodelci MD-Si-COOH. Gre za površinsko močno negativno nabite nanodelce, ki ob stiku z membrano le-to tako zelo destabilizirajo, da je hemoliza v vzorcu opazna že pri najnižjih preizkušenih koncentracijah nanodelcev v vzorcu. SEM je pokazal močno ehinoidno transformacijo eritrocitne suspenzije pod vplivom nanodelcev MD-Si-COOH, stomatocit in sferocit skoraj ni bilo opaziti. Podatek o hemolitičnosti omenjenega tipa nanodelcev v kombinaciji s podatkom o vrsti transformacije oblike eritrocitov kaže na mehanizem delovanja nanodelcev. Sklepamo, da gre skoraj izključno za destabilizacijo lipidnega dvosloja. Verjetno prihaja do lokalnih enkapsulacij nanodelcev, ki vodijo v izčrpavanje lipidnega sloja, močan negativni naboj pa vodi tudi v gelacijo predelov membrane, ki so v neposredni bližini nanodelcev. Predvidevamo tudi, da nanodelci MD-Si-COOH reagirajo s pozitivno nabito trimetilamonij (-N(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub><sup>+</sup>) skupino fosfolipidnih glav, kar sproži kaskado lipidnih preureditev, končen produkt pa je ehinocitoza in v skrajnih primerih hemoliza.

Aglutinacije v vzorcih pod vplivom nanodelcev MD-Si-COOH nismo opazili, na podlagi česar sklepamo, da pri omenjenem tipu nanodelcev ne gre le za stabilizacijo nanodelcev na površini membrane. Gre tudi za močan vpliv nanodelcev na lipidni dvosloj, zaradi česar je povsem porušena njegova stabilnost, kar se odraža v visokem deležu hemolize v vzorcih. Znakov interakcij z membranskimi proteini, v smislu sferičnih transformacij eritrocitne oblike, pri SEM nismo opazili.

Vpliv močno negativno nabite površine nanodelcev MD-Si-COOH povsem zadošča za razlago opaženih morfoloških sprememb eritrocitov po inkubaciji z omenjenimi nanodelci. Izredno visokega deleža hemolize, povzročene z interakcijami omenjenih nanodelcev z rdečimi krvničkami, pa ne moremo pojasniti izključno kot posledico naboja površine nanodelcev. Delež hemolize je v vzorcih z dodanimi nanodelci MD-Si-COOH tako visok, da najverjetneje ni le posledica tvorbe membranskih vrzeli ob stabilizaciji nanodelcev na površini eritrocitnih

membran ter pri enkapsulaciji nanodelcev, s čimer smo razložili hemolitičnost nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ . Sklepamo, da po internalizaciji nanodelcev MD-Si-COOH prihaja do ireverzibilnih poškodb eritrocitov, ki vodijo v celično smrt.

Za manj hemolitične so se izkazali nanodelci MD-Si. SEM je pokazal, da ti nanodelci v primerjavi s kontrolo ne vplivajo bistveno na morfologijo eritrocitov. Delež nediskoidnih eritrocitov je bil manjši ali primerljiv s kontrolo, v veliki večini smo opazili diskoidne ehinocite. Že na mikrografijah SEM smo opazili znake aglutinacije, ki smo jih kasneje potrdili s testom sedimentacije in aglutinacije. Zhao in sod. (2010) so pri poskusih s silikatnimi ( $\text{SiO}_2$ ) nanodelci oz. nanodelci s silika ovojem prišli do podobnih rezultatov. Opazili so, da pride do stabilizacije omenjenih nanodelcev na površini membrane, s TEM pa so potrdili tudi enkapsulacijo ter internalizacijo nanodelcev. Zaključujejo, da do stabilizacije silika nanodelcev z membranskim dvoslojem pride v primeru, ko je sproščena energija po tvorbi kompleksa nanodelec-membrana večja kot energija, potrebna za ukrivitev lokalnega predela membrane ob nanodelcu. V primeru nanodelcev MD-Si se je ta stabilizacija odražala tudi v aglutinaciji. Prišlo je do stabilizacije nanodelca ali skupka nanodelcev s sosednjimi eritrociti v suspenziji, kar smo pri testu sedimentacije in aglutinacije opazili kot zlepke eritrocitov v supernatantu. Aglutinati spremenijo dinamiko posedanja eritrocitov, kar se je odražalo v nižjem ESR eritrocitov v aglutiniranih vzorcih v primerjavi z vzorci z nižjimi koncentracijami enakih nanodelcev, pri katerih do aglutinacije ni prišlo, ESR pa je bil posledično višji. Nezanemarljiv, a vseeno nizek delež hemolize v vzorcih, inkubiranih z nanodelci MD-Si, razlagamo s formacijo por pri procesu enkapsulacije. V kolikor bi bila hemolitičnost nanodelcev posledica enega od drugih naštetih načinov destabilizacije membrane, bi pričakovali znatno višji delež hemolize, kot smo ga npr. opazili pri nanodelcih MD-Si-COOH. Nanodelci MD-Si pa niso izrazito hemolitični kljub temu, da so rahlo negativno nabiti, prav negativen naboj pa je imel pri nanodelcih  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$  ter MD-Si-COOH ključno vlogo pri destabilizaciji membrane. Opazimo, da je vpliv nanodelcev MD-Si na eritrocite primerljiv z vplivom nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  in ne z ostalimi negativno nabitimi nanodelci ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-CA}$ , MD-Si-COOH), kot smo pričakovali. Opazimo pa tudi, da površinska modifikacija maghemitnega magnetnega jedra s silika ovojem ustvari bolj stabilno suspenzijo nanodelcev in do formacij večjih aglomeratov ne prihaja, kot smo to npr. opazili pri površinsko nemodificiranih nanodelcih  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ .

Kljub temu, da so nanodelci MD-Si samo rahlo hemolitični in da prisotnost nanodelcev v krvi ne vodi v signifikantne morfološke spremembe eritrocitov, pojav aglutinacije vzbuja pomisleke o biokompatibilnosti omenjenih nanodelcev. Pri daljši uporabi nanodelcev MD-Si v terapevtske namene v biomedicini bi aglutinirani eritrociti po intravenoznem vnosu MD-Si nanodelcev za organizem lahko predstavljali resno grožnjo celotno terapevtsko obdobje. Slabša prehodnost žil, večja gostota krvnega tkiva ter slabše prečenje žilnih epitelov so samo nekatere od

morebitnih posledic, ki bi kvarno vplivale na organizem z vnešenimi omenjenimi nanodelci, v kolikor do odprave stanja (aglutinacije) ne bi prišlo.

Nanodelci MD-Si-NH<sub>2</sub> so se po vseh kriterijih izkazali za biokompatibilne. Tudi pri visokih koncentracijah nanodelcev (0,6 mg/mL) je bil delež hemolize v vzorcih pod 5 %, to pa je tudi meja, s katero je definiran kvarni učinek testiranega materiala na kri (Choi in sod., 2011). Test hemolitičnosti je torej pokazal, da nanodelci MD-Si-NH<sub>2</sub> pri nobeni od testiranih koncentracij ne delujejo kvarno na eritrocite. Statistično značilnega vpliva nanodelcev MD-Si-NH<sub>2</sub> na morfologijo eritrocitov pa nista pokazala niti SEM niti test sedimentacije in aglutinacije. Pri slednjem nismo opazili sprememb ESR pri nižji od obeh testiranih koncentracij, pri višji pa je ESR povišan, a SEM pokaže, da je delež nediskocit v vzorcu, ki so sicer razlog za povišan ESR, primerljiv s kontrolo. Pri eni od paralelk, pripravljeni za omenjene nanodelce, na mikrografijah opazimo višji delež nediskocit v vzorcu, kar nakazuje na prikrit potencial nanodelcev MD-Si-NH<sub>2</sub> za vpliv na transformacijo oblike eritrocitne membrane. Znano je, da pozitivno površinsko nabiti nanodelci zvišujejo fluidnost membrane, kar je eden od dejavnikov, ki lahko vodijo v globalne spremembe morfologije. Sprememb morfologije eritrocitov, povzročenih s strani nanodelcev MD-Si-NH<sub>2</sub>, nismo opazili pri večji populaciji eritrocitov. Predvidevamo, da v vzorcu eritrocitov nastajajo pogoste lokalne spremembe v fluidnosti membrane celic, območja spremenjene fluidnosti dvosloja pa morajo biti tudi v neposredni bližini, da se spremembe lahko odrazijo na globalnem nivoju. Večja fluidnost membrane kot posledica delovanja nanodelcev MD-Si-NH<sub>2</sub> pa je lahko tudi razlog za nizek opažen delež hemolize v vzorcih, inkubiranih z omenjenimi nanodelci. V kolikor v lipidnem dvosloju po interakciji z nanodelci nastajajo vrzeli, fluidna membrana lažje ter hitreje odreagira na novo stanje znižane membranske integritete. Pridobljena fluidnost omogoča hitrejše zaprtje novonastalih vrzeli, v nasprotju s pridobljeno rigidnostjo, ki jo npr. opazimo po delovanju nanodelcev z negativnim površinskim nabojem. V kolikor vpliv nanodelcev MD-Si-NH<sub>2</sub> sploh opazimo, je ta zanemarljiv v primerjavi z ostalimi testiranimi nanodelci v sklopu magistrskega dela. Nanodelce MD-Si-NH<sub>2</sub> lahko edine označimo kot biokompatibilne z rdečimi krvnimi celicami oz. za hemokompatibilne.

Različne površinske funkcionalizacije magnetnega jedra nanodelcev Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> so dober primer, ki nakazuje pomen naboja površine nanodelcev kot tudi pomen funkcionalizacije same pri zagotavljanju biokompatibilnosti nanodelcev.

## 5.2 SKLEPI

1. Vsi testirani magnetni nanodelci, z izjemo nanodelcev MD-Si-NH<sub>2</sub>, nespecifično interagirajo z lipidnimi ali proteinskimi komponentami eritrocitne membrane, kar se odraža v spremembi njene oblike.
2. Predlagamo vsaj štiri možne mehanizme, ki pojasnjujejo, kako magnetni nanodelci destabilizirajo eritrocitno membrano: (a) lokalne destabilizacije membrane zaradi sprememb v fluidnosti lipidnega dvosloja, ekspanzije enega od slojev napram drugemu ali zaradi enkapsulacije, ki lahko vodi tudi v formacijo por; (b) lokalne destabilizacije kot posledica enkapsulacije ter internalizacije nanodelcev. Proces enkapsulacije vodi v izčrpavanje lipidnega dvosloja, internalizacija nanodelcev pa destabilizira citoskelet ter posledično celično membrano; (c) motenje delovanja membranskih proteinov, predvsem anionskih izmenjevalcev, kar vodi v porušeno ionsko ravnovesje, mikrovezikulacijo, spremembo gostote citoskeleta ter izgubo lipidov; (d) lokalne stabilizacije nanodelcev ali njihovih aglomeratov z lipidnim dvoslojem, kar lahko vodi v aglutinacijo, sterično oviranje delovanja membranskih proteinov ter, v primeru večjih aglomeratov, spremembo globalne ukrivljenosti eritrocitne membrane.
3. Iz opaženih sprememb morfologije eritrocitov pri mikroskopiji SEM lahko sklepamo o hemolitičnem potencialu nanodelcev. Večji kot je vpliv nanodelcev na morfologijo eritrocitov, večja je verjetnost, da pod vplivom teh nanodelcev pride do skrajne destabilizacije lipidnega dvosloja in posledično hemolize.
4. Do adhezije manjših aglomeratov nanodelcev na površino membrane prihaja pogosteje, kot do adhezije večjih aglomeratov. Prav tako lahko manjši aglomerati pri posameznem eritrocitu povzročijo več lokalnih destabilizacij lipidnega dvosloja, kar večja verjetnost globalne destabilizacije eritrocitne membrane, v primerjavi z večjimi aglomerati, pri katerih je vpliv na spremembo eritrocitne morfologije bolj subtilen.
5. Nanodelci CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CA, ki so tvorili manjše agregate, so se izkazali za bolj bionekompatibilne v primerjavi z večjimi agregati nanodelcev CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> kljub temu, da naj bi funkcionalizacija nanodelcev CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> s citronsko kislino naredila le-te bolj inertne za nespecifične interakcije s tkivi, suspenzijo nanodelcev pa tudi bolj stabilno.
6. Nanodelci z negativno nabito površino eritrocitno membrano močnejše in lažje destabilizirajo v primerjavi z rahlo negativno ter pozitivno površinsko nabitimi nanodelci.
7. Kot najbolj inertna za nespecifične interakcije s tkivi se je izkazala -Si-NH<sub>2</sub> funkcionalizacija jedra Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Sam silika ovoj eritrocite zleplja, -Si-COOH modifikacija jedra pa se je izkazala za izjemno hemolitično.

## 6 POVZETEK

Predpostavili smo, da igra naboj površine nanodelcev, kot posledica funkcionalizacije  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ter  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  magnetnih jeder z različno nabitimi funkcionalnimi skupinami, ključno vlogo pri destabilizaciji eritrocitnih membran, kar se odraža v spremenjeni morfologiji eritrocitov. Testirali smo potencialni vpliv površinsko pozitivno nabitih nanodelcev (MD-Si- $\text{NH}_2$ ), nevtralnih ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ), rahlo negativno nabitih (MD-Si) ter negativno nabitih nanodelcev ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ -CA, MD-Si-COOH).

V primeru nanodelcev  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  smo predvidevali, da bo modifikacija nanodelcev s citronsko kislino (ki naredi suspenzijo nanodelcev bolj stabilno ter prepreči tvorbo večjih agregatov) povečala njihovo biokompatibilnost. Predpostavljali smo, da bodo večji aglomerati nanodelcev lažje globalno ter tudi lokalno porušili integriteto lipidnega dvosloja.

Neposreden vpliv nanodelcev na morfologijo eritrocitov smo ocenili in ovrednotili s pomočjo vrstične elektronske mikroskopije (SEM). Pri slednji pa smo opazili tudi kar nekaj pojavov, ki so nam kasneje bili v pomoč pri razlagi delovanja posameznega tipa nanodelcev, ki je vodilo v opažene spremembe eritrocitne oblike. Opazili smo eritrocitne aglutinate po inkubaciji suspenzije rdečih krvničk z nanodelci MD-Si, aglomerate nanodelcev na površini eritrocitnih membran ter hemolizirane eritrocite v vzorcih.

S testom sedimentacije in aglutinacije smo preverili pomen s SEM opaženih sprememb za dinamiko eritrocitov v suspenziji. Razlike v ESR v primerjavi s kontrolo niso samo potrdile opaženih sprememb oblike eritrocitnih membran, ampak so nam dale tudi vpogled v pomen morfologije celic za pravilno in nemoteno delovanje rdečih krvničk v tkivu. Omenjen test pa je razkril tudi sposobnost nanodelcev, da zlepijo eritrocite ter ne nazadnje tudi hemolitični potencial nanodelcev.

Testirali smo tudi hemolitični potencial izbranih magnetnih nanodelcev, torej, v kolikšni meri pride ob morfoloških spremembah eritrocitov do tako ekstremnih destabilizacij membrane, da je porušena njena integriteta, kar vodi v razpad celice in celično smrt.

Na rezultate vseh treh testov lahko gledamo kot na samostojne kriterije za določitev biokompatibilnosti testiranih nanodelcev s komponentami krvi, v našem primeru, z eritrociti. Šele kombinacija rezultatov vseh treh testov nam v celoti razkrije potencial posameznega tipa nanodelcev, da v tkivu neselektivno povzroči kvarne spremembe. Največjo težo smo pripisali testu hemolize v vzorcih, saj je testiran pojav definitiven kriterij za oceno biokompatibilnosti testiranega materiala.

Rezultati so pokazali, da lahko za biokompatibilne, izmed vseh testiranih nanodelcev, označimo le nanodelce MD-Si-NH<sub>2</sub>. Pri slednjih ni bilo opaziti signifikantnega vpliva na morfologijo eritrocitov ter na njihovo dinamiko v suspenziji, prav tako pa nanodelci niso kazali hemolitičnega potenciala. Preostali modifikaciji Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> jedra, silika ovoj ter funkcionalizacija s -Si-COOH sta se izkazali za bionekompatibilni po vsaj dveh (nanodelci MD-Si), če ne po vseh zastavljenih kriterijih (nanodelci MD-Si-COOH).

Nasprotno od pričakovanega so pokazali rezultati testov z nanodelci CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ter CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CA. Pokazali so večji kvaren vpliv manjših aglomeratov nanodelcev (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CA) v primerjavi z večjimi aglomerati (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). Statistično značilen vpliv na morfologijo eritrocitov smo sicer dokazali samo pri nanodelcih CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CA, a bi na podlagi sprememb dinamike eritrocitov v suspenziji ter hemolitičnega potenciala obeh tipov nanodelcev omenjene nanodelce težko označili za povsem biokompatibilne. Ocenjujemo, da nanodelci CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> ter CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>-CA za intravenozno aplikacijo pri višjih koncentracijah nanodelcev niso primerni (višje od 0,6 mg/mL).

V skladu s pričakovanji smo potrdil povezavo med nabojem površine nanodelcev z njihovim potencialnim vplivom na morfologijo eritrocitov. Največji vpliv suspenzije nanodelcev na eritrocitne membrane smo opazili pri negativno nabitih nanodelcih, vpliv pa se postopno manjša pri rahlo negativno nabitih nanodelcih, preko nevtralnih pa vse do pozitivno nabitih. Pri slednjih kvarnega vpliva na eritrocite skoraj ni bilo opaziti tudi pri višjih koncentracijah nanodelcev.

Na podlagi dobljenih rezultatov smo predlagali mehanizme, s katerimi smo poskušali pojasniti zelo specifične opažene spremembe morfologije eritrocitov za vsak posamezen tip nanodelcev, ter razlike med njimi.

Vsaka posamezna uporabljena metoda se je izkazala kot primerna za oceno vpliva nanodelcev na rdeče krvne celice, najbolj uspešna pri oceni biokompatibilnosti pa je kombinacija vseh treh. V prihodnosti si ometamo nabor metod razširiti s TEM (potrdili bi internalizacijo nanodelcev ter enkapsulacijo), s testom deformabilnosti (nadgradnja testa sedimentacije za oceno spremembe dinamike krvi po intravenozni aplikaciji suspenzij nanodelcev) ter z različnimi označevanji membranskih proteinov (preverjanje specifičnosti interakcij nanodelcev z membranskimi proteini, vrednotenje pojava mikrovezikulacije itd.). Vsaka dodatna metoda bo korak bližje k uvidu celotne slike delovanja (magnetnih) nanodelcev ob intravenozni uporabi.



## 7 VIRI

- Abts H., Emmerich M., Miltenyi S. 1989. CD20 positive human B lymphocytes separated with the magnetic cell sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. *Journal of Immunological Methods*, 125: 19–28
- Alhanaty E., Sheetz M. P. 1981. Control of the erythrocyte membrane shape: recovery from the effect of crenating agents. *Journal of Cell Biology*, 91: 884–888
- Apopa P. L., Qian Y., Shao R., Guo N. L., Schwegler-Berry D., Pacurari M. 2009. Iron oxide nanoparticles induce human microvascular endothelial cell permeability through reactive oxygen species production and microtubule remodeling. *Particle and Fibre Toxicology*, 6: 1
- Arbab A. S., Bashaw L. A., Miller B. R., Jordan E. K., Lewis B. K., Kalish H., Frank J. A. 2003. Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging. *Radiology*, 229, 3: 838–846
- Bareford L. M., Swaan P. W. 2007. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 748–758
- Barisani D., Conte D. 2002. Transferrin receptor 1 (TfR1) and putative stimulator of Fe transport (SFT) expression in iron deficiency and overload: an overview. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 29: 498–505
- Baselt D. R., Lee G. U., Natesan M., Metzger S. W., Sheehan P. E., Colton R. J. 1998. A biosensor based on magnetoresistance technology. *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 731–739
- Battle X., Labarta A. 2002. Finite-size effects in finite particles: magnetic and transport properties. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 35: R15
- Bellova A., Bystrenova E., Koneracka M., Kopcansky P., Valle F., Tomasovicova N. 2010. Effect of Fe(3)O(4) magnetic nanoparticles on lysozyme amyloid aggregation. *Nanotechnology*, 21: 065103
- Berry C. C., Charles S., Wells S., Dalby M. J., Curtis A. S. 2004. The influence of transferrin stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture. *International Journal of Pharmaceutics*, 269: 211–225

- Berry C. C., Curtis A. S. G. 2003. Functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36: R198–206
- Betz T., Bakowsky U., Muller M. R., Lehr C. M., Bernhardt I. 2007. Conformational change of membrane proteins leads to shape changes of red blood cells. *Bioelectrochemistry*, 70: 122–126
- Bhattarai S. R., Kc R. B., Kim S. Y. 2008. N-hexanoyl chitosan stabilized magnetic nanoparticles: Implication for cellular labeling and magnetic resonance imaging. *Journal of Nanobiotechnology*, 6: 1–9
- Bifano E. M., Novak T. S., Freedman J. C. 1984. Relationship between the shape and the membrane potential of human red blood cells. *Journal of Membrane Biology*, 82: 1–13
- Bucak S., Yavuztürk B., Sezer A. D. 2012. Magnetic nanoparticles: Synthesis, Surface Modifications and Application in Drug Delivery. V: *Recent advances in Novel Drug Carrier Systems*. Ali Demir Sazer (ed.). New York, InTech: 165–201
- Bulte J. W., Douglas T., Witwer B., Zhang S. C., Strable E., Lewis B. K. 2001. Magnetodendrimers allow endosomal magnetic labeling and in vivo tracking of stem cells. *Nanotechnology*, 19: 1141–1147
- Čampelj S., Makovec D., Bele M., Drogenik M., Jamnik J. 2007. Sinteza magnetnih nanodelcev, funkcionaliziranih s tanko plastjo silike. *Materiali in tehnologije*, 41, 2: 103–107
- Chabanel A., Reinhart W., Chien S. 1987. Increased resistance to membrane deformation of shape-transformed human red blood cells. *Blood*, 69: 739–743
- Chatterjee J., Haik Y., Chen C-J. 2003. Size dependent magnetic properties of iron oxide nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 257, 1:113–118
- Chen J. M., Hessler J. A., Putschakayala K., Panama B. K., Khan D. P., Hong S. 2009. Cationic Nanoparticles Induce Nanoscale Disruption in Living Cell Plasma Membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, 113: 11179–11185
- Chi L. M., Wu W. G. 1990. Effective bilayer expansion and erythrocyte shape change induced by monopalmitoyl phosphatidylcholine. Quantitative light microscopy and nuclear magnetic resonance spectroscopy measurements. *Biophysical Journal*, 57: 1225–1232

- Clement J. H., Schwalbe M., Buske N. 2006. Differential interaction of magnetic nanoparticles with tumor cells and peripheral blood cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 132: 287–292
- Daleke D. L., Huestis W. H. 1985. Incorporation and translocation of aminophospholipids in human erythrocytes. *Biochemistry*, 24: 5406–5416
- Daleke D. L., Huestis W. H. 1989. Erythrocyte morphology reflects the transbilayer distribution of incorporated phospholipids. *Journal of Cell Biology*, 108: 1375–1385
- De Jong W., Borm P. 2008. Drug Delivery and Nanoparticles: Applications and Hazards. *International Journal of Nanomedicine*, 3: 133–149
- DeSilva B., Smith W., Weiner R., Kelley M., Smolec J., Lee B., Khan M., Tacey R., Hill H., Celniker A. 2003. Recommendations for the bioanalytical method validation of ligand-binding assays to support pharmacokinetic assessments of macromolecules. *Pharmaceutical Research*, 20, 11: 1885–1900
- Dobereiner H. G., Evans E., Kraus M., Seifert U., Wortis M. 1997. Mapping vesicle shapes into the phase diagram: A comparison of experiment and theory. *Physical Review E*, 55: 4458–4474
- Dong J., Xu Z., Wang F. 2008. Engineering and characterization of mesoporous silica-coated magnetic particles for mercury removal from industrial effluents. *Applied Surface Science*, 254: 3522–3530
- Elgsaeter A., Stokke B. T., Mikkelsen A., Branton D. 1986. The molecular basis of erythrocyte shape. *Science*, 234: 1217–1223
- Elias A., Tsourkas A. 2009. Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles. *American Society of Hematology Education Program. Hematology*, 12: 720–726
- El-Ok M. M., Salem M. A., Salim M. S., El-Okr R. M., Ashoush M., Talaat H. M. 2011. Synthesis of cobalt ferrite nano-particles and their magnetic characterization. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 323: 920–926
- Ferrell J. E. J., Lee K. J., Huestis W. H. 1985. Membrane bilayer balance and erythrocyte shape: a quantitative assessment. *Biochemistry*, 24: 2849–2857

- Fosnarić M., Igljic A., Kroll D. M., May S. 2009. Monte Carlo simulations of complex formation between a mixed fluid vesicle and a charged colloid. *Journal of Chemical Physics*, 131: 105103–105109
- Fujita T., Matsushita M., Endo Y. 2004. The lectin-complement pathway – its role in innate immunity and evolution. *Immunological Reviews*, 198: 185–202
- Gallagher P. G., Forget B. G. 1993. Spectrin genes in health and disease. *Seminars in Hematology*, 30, 1: 4–20
- Gallagher P. G., Tse W. T., Coetzer T. 1992. A common type of the spectrin alpha I 46-50a-kD peptide abnormality in hereditary elliptocytosis and pyropoikilocytosis is associated with a mutation distant from the proteolytic cleavage site. Evidence for the functional importance of the triple helical model of spectrin. *Journal of Clinical Investigation*, 89, 3: 892–898
- Gallagher P. G., Tse W. T., Marchesi S. L. 1993. A defect in alpha-spectrin mRNA accumulation in hereditary pyropoikilocytosis. *Transaction of the Association of American Physicians*, 104: 32–39
- Ge F., Li M. M., Ye H., Zhao B. X. 2012. Effective removal of heavy metal ions Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> from aqueous solution by polymer-modified magnetic nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 211-212: 366–372
- Gedde M. M., Davis D. K., Huestis W. H. 1997. Cytoplasmic pH and human erythrocyte Shape. *Biophysical Journal*, 72: 1234–1246
- Gedde M. M., Huestis W. H. 1997. Membrane potential and human erythrocyte shape. *Biophysical Journal*, 72: 1220–1233
- Gedde M. M., Yang E., Huestis W. H. 1995. Shape response of human erythrocytes to altered cell pH. *Blood*, 86: 1595–1599
- Gimsa J., Ried C. 1995. Do band 3 protein conformational changes mediate shape changes of human erythrocytes? *Molecular Membrane Biology*, 12: 247–254
- Ginzburg V. V., Balijepailli S. 2007. Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes. *Nano Letters*, 7: 3716–3722
- Girginova P. I., Daniel-da-Silva A. L., Lopes C. B., Figueira P., Otero M., Amaral V. S., Pereira E., Trindade T. 2010. Silica coated magnetite particles for magnetic removal of Hg<sup>2+</sup> from water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 345: 234–240

- Glaser R. 1998. Does the transmembrane potential ( $\Delta\psi$ ) or the intracellular pH ( $\text{pHi}$ ) control the shape of human erythrocytes? *Biophysical Journal*, 75: 569–570
- Glaser R., Fujii T., Muller P., Tamura E., Herrmann A. 1987. Erythrocyte shape dynamics: Influence of electrolyte conditions and membrane potential. *Biomedica et Biochimica Acta*, 46: S327–S333
- Goodman C. M., McCusker C. D., Yilmaz T. 2004. Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry*, 15: 897–900
- Gupta A. K., Gupta M. 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26: 3995–4021
- Haen C. 2001. Conception of the first magnetic resonance imaging contrast agents: a brief history. *Topics in Magnetic Resonance Imaging*, 12: 221–230
- Hafeli U. O., Riffle J. S., Harris-Shekhawat L., Carmichael-Baranauskas A., Mark F., Dailey J. P. 2009. Cell uptake and in vitro toxicity of magnetic nanoparticles suitable for drug delivery. *Molecular Pharmacology*, 6: 1417–1428
- Hakami O., Zhang Y., Banks C. J. 2012. Thiol-functionalised mesoporous silicacoated magnetite nanoparticles for high efficiency removal and recovery of Hg from water. *Water research*, 46: 3913–3922
- Halliwell B., Gutteridge J. M. C. 2007. *Free radicals in biology and medicine*. New York: Oxford University Press: 266 str.
- Hartmann J., Glaser R. 1991. The influence of chlorpromazine on the potential-induced shape change of human erythrocyte. *Bioscience Reports*, 11: 213–221
- Hertzman A. 1993. Effects of blood storage on the erythrocyte. *Journal of Rheumatology*, 20: 2178–2179
- Hoefner D. M., Blank M. E., Diedrich D. F. 1997. The anion transporter and a 28 kDa protein are selectively photolabeled by p-azidobenzylphlorizin under conditions that alter RBC morphology, flexibility, and volume. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1327: 231–241
- Hoffman J. F. 1987. On the mechanism and measurement of shape transformations of constant volume of human red blood cells. *Blood Cells*, 12: 565–588
- Hoffman. 2004. Some red blood cell phenomena for the curious. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 32: 335–340

- Hong R., Fischer N., Goodman C. 2004. Control of Protein Structure and Function through Surface Recognition by Tailored Nanoparticle Scaffolds. *Journal of the American Chemical Society*, 126: 739–743
- Hu L., Mao Z., Gao C. 2009. Colloidal particles for cellular uptake and delivery. *Journal of Material Chemistry*, 19: 3108–3115
- Huang D. M., Hsiao J. K., Chen Y. C., Chien L. Y., Yao M., Chen Y. K. 2009. The promotion of human mesenchymal stem cell proliferation by superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 30: 3645–3651
- Iglic A., Kralj-Iglic V., Hagerstrand H. 1998. Amphiphile induced echinocyte–spherocytocyte transformation of red blood cell shape. *European Biophysics Journal*, 27: 335–339
- Iolascon A., Perrotta S., Stewart G. W. 2003. Red blood cell membrane defects. *Reviews in Clinical and Experimental Hematology*, 7, 1: 22–56
- Isom H. C., McDevitt E. I., Moon M. S. 2009. Elevated hepatic iron: a confounding factor in chronic hepatitis C. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1790: 650–662
- Isomaa B., Hagerstrand H., Paatero G. 1987. Shape transformations induced by amphiphiles in erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 899: 93–103
- Jainae K., Sanuwong K., Nuangjamnong J., Sukpirom N., Unob F. 2010. Extraction and recovery of precious metal ions in wastewater by polystyrene-coated magnetic particles functionalized with 2-(3-(2-aminoethylthiol)propylthio)ethanamine. *Chemical Engineering Journal*, 160: 586–593
- Jeong J., Ha T. H., Chung B. H. 2006. Enhanced reusability of hexa-arginine-tagged esterase immobilized on gold-coated magnetic nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 569: 203
- Jing B. X., Zhu Y. X. 2011. Disruption of Supported Lipid Bilayers by Semihydrophobic Nanoparticles. *Journal of American Chemical Society*, 133: 10983–10989
- Jordan A., Scholz R., Maier-Hauff K., Johannsen M., Wust P., Nadobny J., Schirra H., Schmidt H., Deger S., Loening S., Lanksch W., Felix R. 2001. Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 225: 118–126

- Kadiiska M. B., Burkitt M. J., Xiang Q. H., Mason R. P. 1995. Iron supplementation generates hydroxyl radical in vivo. An ESR spin-trapping investigation. *Journal of Clinical Investigation*, 96: 1653–1657
- Khodadad J. K., Waugh R. E., Podolski J. L., Josephs R., Steck T. L. 1996. Remodeling the shape of the skeleton in the intact red cell. *Biophysical Journal*, 70: 1036–1044
- Khodadad J. K., Weinstein R. S., Marsh L. W., Steck T. L. 1989. Shape determinants of McLeod acanthocytes. *Journal of Membrane Biology*, 107: 213–218
- Kim H. S., Choi Y., Song I. C., Moon W. K. 2009. Magnetic resonance imaging and biological properties of pancreatic islets labeled with iron oxide nanoparticles. *NMR in Biomedicine*, 22: 852–856
- Kim J. S., Yoon T. J., Yu K. N. 2006. Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells. *Journal of Veterinary Science*, 7: 321–326
- Kirsch J. E. 1991. Basic principles of magnetic resonance contrast agents. *Top Magnetic Resonance Imaging*, 3: 1–18
- Lange Y., Gough A., Steck T. L. 1982. Role of the bilayer in the shape of the isolated erythrocyte membrane. *Journal of Membrane Biology*, 69: 113–123
- Lange Y., Slayton J. M. 1982. Interaction of cholesterol and lysophosphatidylcholine in determining red cell shape. *Journal of Lipid Research*, 23: 1121–1127
- Lemarchand C., Gref R., Passirani C., Garcion E., Petri B., Muller R. 2006. Influence of polysaccharide coating on the interactions of nanoparticles with biological systems. *Biomaterials*, 27: 108–118
- Li G., Zhao Z., Liu J., Jiang G. 2011. Effective heavy metal removal from aqueous systems by thiol functionalized magnetic mesoporous silica, *Journal of Hazardous Materials*, 192: 277–283
- Lim H. W. G., Wortis M., Mukhopadhyay M. 2002. Stomatocyte–discocyte–echinocyte sequence of the human red blood cell: evidence for the bilayer-couple hypothesis from membrane mechanics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 16766–16769
- Liu X., Hu Q., Fang Z., Zhang X., Zhang B. 2009. Magnetic Chitosan Nanocomposites: A useful recyclable tool for heavy metal ion removal. *Langmuir*, 25: 3–8

- Lorenz M. R., Holzapfel V., Musyanovych A. 2006. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. *Biomaterials*, 27: 2820–2828
- Mai T. D., d'Orlye F., Menager C., Varenne A., Siaugue J. M. 2013. Red blood cells decorated with functionalized core-shell magnetic nanoparticles: elucidation of the adsorption mechanism. *Chemical communications*, 49, 47: 5393–5395
- Michel R., Gradzielski M. 2012. Experimental Aspects of Colloidal Interactions in Mixed Systems of Liposome and Inorganic Nanoparticle and Their Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 11610–11642
- Miltenyi S., Muller W., Weichel W. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11: 231–238
- Moghimi S. M., Hunter A. C. H., Murray J. C. 2001. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacological Reviews*, 53: 283–318
- Mukhopadhyay R., Lim H. W. G., Wortis M. 2002. Echinocyte shapes: bending, stretching, and shear determine spicule shape and spacing. *Biophysical Journal*, 82: 1756–1772
- Na H. B., Song I. C., Hyeon T. 2009. Inorganic nanoparticles for MRI contrast agents. *Advanced Materials*, 21: 2133–2148
- Nakao M. 2002. New insights into regulation of erythrocyte shape. *Current Opinion in Hematology*, 9: 127–132
- Pankhurst Q. A., Connolly J., Jones S. K., Dobson J. 2003. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36: 167–181
- Parham H., Zargar B., Shiralipour R. 2012. Fast and efficient removal of mercury from water samples using magnetic iron oxide nanoparticles modified with 2- mercaptobenzothiazole. *Journal of Hazardous Materials*, 205–206: 94–100
- Park S. J., Taton T. A., Mirkin C. A. 2002. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes. *Science*, 295: 1503–1506
- Peppas N., Huang Y., Torres-Lugo M. 2000. Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 2: 9–30
- Phanapavudhikul P., Shen S., Ng W. K. 2008. Formulation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/acrylate co-polymer nanocomposites as potential drug carriers. *Drug Delivery*, 15: 177–183



- Pisanic T. R. 2nd, Blackwell J. D., Shubayev V.I. 2007. Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons. *Biomaterials*, 28: 2572–2581
- Ponder E. 1948. *Hemolysis and Related Phenomena*. Grune and Stratton, New York: 400 str.
- Ramchand C. N., Pande P., Kopcansky P. 2001. Application of magnetic fluids in medicine and biotechnology. *Indian Journal of Pure and Applied Physics*, 39: 683–686
- Rasia M., Bollini A. 1998. Red blood cell shape as a function of medium's ionic strength and pH. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1372: 198–204
- Reimer P., Weissleder R. 1996. Development and experimental application of receptor-specific MR contrast media. *Radiology*, 36:153–163
- Reinhart W. H., Nagy C. 1995. Albumin affects erythrocyte aggregation and sedimentation. *European Journal of Clinical Investigation*, 25: 523–528
- Roger J., Pons J., Massart R. 1999. Some biomedical applications of ferrofluids. *European Physical Journal - Applied Physics*, 5: 321–325
- Rudenko S. V. 2009. Characterization of morphological response of red blood cells in sucrose solution. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 42: 252–261
- Rudenko S. V. 2010. Erythrocyte morphological states, phases, transitions and trajectories. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1798: 1767–1778
- Sadeghiani N., Barbosa L. S., Silva L. P., Azevedo R. B., Morais P. C., Lacava Z. G. M. 2005. Genotoxicity and inflammatory investigation in mice treated with magnetite nanoparticles surface coated with polyaspartic acid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 289: 466–468
- Sanhai W. R., Sakamoto J. H., Canady R. 2008. Seven challenges for nanomedicine. *Nature Nanotechnology*, 3: 242–244
- Schwalbe M., Jörkeu C., Buske N. 2005. Selective reduction of the interaction of magnetic nanoparticles with leukocytes and tumor cells by human plasma. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293: 433–437
- Schwarz S., Deuticke B., Haest C. W. 1999. Passive transmembrane redistributions of phospholipids as a determinant of erythrocyte shape change. *Studies on electroporated cells. Molecular Membrane Biology*, 16: 247–255

- Schwarz S., Haest C. W., Deuticke B. 1999. Extensive electroporation abolishes experimentally induced shape transformations of erythrocytes: a consequence of phospholipid symmetrization? *Biochimica Biophysica Acta*, 1421: 361–379
- Seligman P. A., Kovar J., Gelfand E. W. 1992. Lymphocyte proliferation is controlled by both iron availability and regulation of iron uptake pathways. *Pathobiology*, 60: 19–26
- Sheetz M. P., Painter R. G., Singer S. J. 1976. Biological membranes as bilayer couples. III. Compensatory shape changes induced in membranes, *Journal of Cell Biology*, 70: 193–203
- Sheetz M. P., Singer S. J. 1974. Biological membranes as bilayer couples. A mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 71: 4457–4461
- Sheetz M. P., Singer S. J. 1976. Equilibrium and kinetic effects of drugs on the shapes of human erythrocytes. *Journal of Cell Biology*, 70: 247–251
- Sheetz M.P., Singer S.J. 1974. Biological membranes as bilayer couples. A molecular mechanism of drug-erythrocyte interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71: 4457–4461
- Simberg D., Duza T., Park J. H., Essler M., Pilch J., Zhang L. 2007. Biomimetic amplification of nanoparticle homing to tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 932–936
- Singh N. 2009. Conference scene – nanotoxicology: health and environmental impacts. *Nanomedicine (Lond)*, 4: 385–390
- Singh S., Barick K. C., Bahadur D. 2011. Surface engineered magnetic nanoparticles for removal of toxic metal ions and bacterial pathogens. *Journal of Hazardous Materials*, 192: 1539–1547
- Sodum R. S., Chung F. L. 1988. 1,N<sub>2</sub>-ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Research*, 48: 320–323
- Soenen S. J., Baert J., De Cuyper M. 2007. Optimal conditions for labelling of 3T3 fibroblasts with magnetoliposomes without affecting cellular viability. *Chembiochem (A European Journal of Chemical Biology)*, 8: 2067–2077

- Soenen S. J., Illyes E., Vercauteren D., Braeckmans K., Majer Z., De Smedt S. C. 2009. The role of nanoparticle concentration-dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes. *Biomaterials*, 30: 6803–6813
- Song B. Y., Eom Y., Lee T. G. 2011. Removal and recovery of mercury from aqueous solution using magnetic silica nanocomposites. *Applied Surface Science*, 257: 4754–4759
- Sox H. C., Liang M. H. 1986. The erythrocyte sedimentation rate: Guidelines for Rational Use. *Annals of Internal Medicine*, 4: 515–523
- Stevens R. G., Jones D. Y., Micozzi M. S., Taylor P. R. 1988. Body iron stores and the risk of cancer. *New England Journal of Medicine*, 319: 1047–1052
- Tachev K. D., Danov K. D., Kralchevsky P. A. 2004. On the mechanism of stomatocyteechinocyte transformations of red blood cells: experiment and theoretical model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34: 123–140
- Takuya T. 2009. Commercial scale production of inorganic nanoparticles. *International Journal of Nanotechnology*, 6: 567
- Tartaj P., Morales M. P., Veintemillas-Verdaguer S., Gonzalez-Carreno T., Serna C. J. 2003. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36: 182–197
- Thomas R. D., Westengard J. C., Hay K. L. 1993. Calibration and validation for erythrocyte sedimentation tests. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 117: 719–723
- Thue G., Sandberg S., Fugelli P. 1994. The erythrocyte sedimentation rate in general practice: clinical assessment based on case histories. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 54: 291–300
- Toyokuni S. 2002. Iron and carcinogenesis: from Fenton reaction to target genes. *Redox Report*, 7: 189–197
- Vazquez M., Luna C., Morales M. P., Sanz R., Serna C. J., Mijangos C. 2004. Magnetic nanoparticles: synthesis, ordering and properties. *Physics B: Condensed Matter*, 354: 71
- Veranth J. M., Kaser E. G., Veranth M. M., Koch M., Yost G. S. 2007. Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Particle and Fibre Toxicology*, 4: 2

- Villanueva A., Canete M., Roca A., Calero M., Veintemillas-Verdaguer S., Serna C. J., Morales Mdel P., Miranda R. 2009. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells. *Nanotechnology*, 20: 1–9
- Wang B., Zhang L. F., Bae S. C., Granick S. 2008. Nanoparticle-induced surface reconstruction of phospholipid membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 105: 18171–18175
- Wang S., Jarrett B. R., Kauzlarich S. M. 2007. Core/shell quantum dots with high relaxivity and photoluminescence for multimodality imaging. *Journal of American Chemical Society*, 129: 3848–3856
- Wilhelm C., Billotey C., Roger J. 2003. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials*, 24: 1001–1011
- Witten T. A. 2004. *Structured fluids*. Oxford University Press, Oxford: 216 str.
- Wong P. 1999. A basis of echinocytosis and stomatocytosis in the disc-sphere transformations of the erythrocyte. *Journal of Theoretical Biology*, 196: 343–361
- Wong P. 2005. A hypothesis of the disc-sphere transformation of the erythrocytes between glass surfaces and of related observations. *Journal of Theoretical Biology*, 233: 127–135
- Xu Z. P., Zeng Q. H., Lu G. Q., Yu A. B. 2006. Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science*, 61: 1027
- Yan S., Zhang D., Gu N., Zheng J., Ding A., Wang Z., Xing B., Ma M., Zhang Y. 2005. Therapeutic effect of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles combined with magnetic fluid hyperthermia on cultured liver cancer cells and xenograft liver cancers. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5: 1185–1192
- Yantasee W., Warner C. L., Sangvanich T., Addleman R. S., Carter T. G., Wiacek R. J., Fryxell G. E., Timchalk C., Warner M. G. 2007. Removal of heavy metals from aqueous systems with thiol functionalized superparamagnetic nanoparticles. *Environmental Science and Technology*, 41: 5114–5119
- Yoo M. K., Kim I. Y., Kim E. M. 2007. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with galactose-carrying polymer for hepatocyte targeting. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2007: 94740–94748

Zhang S. W., Nelson A., Beales P. A. 2012. Freezing or Wrapping: The Role of Particle Size in the Mechanism of Nanoparticle-Biomembrane Interaction. *Langmuir*, 28: 12831–12837

Zhang S., Niu H., Cai Y., Zhao X., Shi Y. 2010. Arsenite and arsenate adsorption on coprecipitated bimetal oxide magnetic nanomaterials: MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> and CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. *Chemical Engineering Journal*, 158: 599–607

Zhang Y., Zhang J. 2005. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283: 352–357

### Priloga A:

## Dovoljenje KME, na katerega smo se sklicevali pri poskusih s krvjo



### KOMISIJA REPUBLIKE SLOVENIJE ZA MEDICINSKO ETIKO

---

Prof. dr. Veronika Kralj-Iglič, dr. med.  
Laboratorij za klinično biofiziko  
Inštitut za biofiziko, Medicinska fakulteta v Ljubljani  
Lipičeva 2, 1000 Ljubljana

Štev.: 117/02/10  
Datum: 23. 3. 2010

Spoštovana gospa prof. dr. Kralj-Iglič,

Komisiji za medicinsko etiko (KME) ste 11. 2. 2010<sup>1</sup> poslali vašo prošnjo za mnenje o etični primernosti raziskave z naslovom:

*"Mikrovezikli v telesnih tekočinah domačih živali in človeka."*

KME je na seji 23. 2. 2010 ocenila, da raziskava ni v nasprotju z etičnimi standardi, in Vam s tem izdaja svoje soglasje.

S spoštovanjem in lepimi pozdravi,

prof. dr. Jože Trontelj  
predsednik Komisije za medicinsko etiko

## Priloga B:

Sintezni postopek maghemitnih nanodelcev (povzeto po Čampelj in sod., 2007)

Maghemitne nanodelce so sintetizirali s koprecipitacijo  $\text{Fe}^{2+}$  (0,027 mol/L) in  $\text{Fe}^{3+}$  (0,023 mol/L) s koncentriranim amoniakom (25 %) pri sobni temperaturi. Postopek je potekal v dveh stopnjah. V prvi so dvignili pH-vrednost raztopine železovih ionov na  $\text{pH} = 3$  in vzdrževali konstantno pH-vrednost 30 min. V tej stopnji se obori  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ . V drugi stopnji so dodali koncentriran amonijak, da so dosegli  $\text{pH} = 11,6$ . V tej stopnji se železov hidroksid oksidira z zračnim kisikom in nastane spinelni produkt. Tako sintetizirane so nato magnetno ločili in jih trikrat sprali z amoniakalno raztopino s  $\text{pH} > 10,5$ . Pri tej pH-vrednosti imajo nanodelci na površini visok negativni naboj, kar se kaže kot visok  $\zeta$ -potencial, ki preprečuje njihovo močno agregiranje.  $\zeta$ -potencial sintetiziranih nanodelcev kot tudi nanodelcev, prevlečenih s citronsko kislino in s siliko, smo določili z elektrokinetičnimi meritvami mobilnosti nanodelcev. Meritve so bile opravljene z zetametrom (Brookhaven Instruments Corp., ZetaPALS).

Nanodelce so karakterizirali z uporabo rentgenske praškovne difrakcije (XRD) (Bruker AXS, D4 ENDEAVOR) in presevnega elektronskega mikroskopa (TEM) (JEOL 2010F). Velikost nanodelcev so določili iz TEM-posnetkov in z uporabo Scherrerjeve metode, ki temelji na širitvi rentgenskih uklonov v XRD. Pri tem so uporabljali računalniški program Diffracplus Topas™.

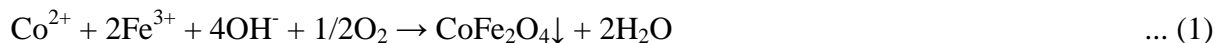
Pred prekritjem nanodelcev s hidrolizo tetraetoksilikana (TEOS) so jih dispergirali v vodi, da so omogočili prekritje posameznih nanodelcev in ne njihovih aglomeratov. Za dispergiranje v vodi so nanodelce prevlekli s citronsko kislino. V mešanico vode in nanodelcev so dodali različne količine citronske kisline ( $\gamma = 0,005\text{--}0,04$  g/mL) in uravnali pH-vrednost z dodatkom amonijaka (25 %). Vrednosti pH med prekrivanjem s citronsko kislino so bile med 2 in 11. Mešanico so segreli na  $80\text{ }^\circ\text{C}$  in jo intenzivno mešali 90 min. Med tem se je citronska kislina verjetno kemijsko vezala na površino nanodelcev. V naslednji stopnji procesa so mešanico šibko aglomeriranih nanodelcev ohladili in nanodelce med intenzivnim mešanjem dispergirali, navadno s hkratno spremembo pH-vrednosti. Neaglomerirani nanodelci v suspenziji so dolgoročno stabilni in se ne posedajo niti v zmernem gradientu magnetnega polja. Aglomerate so iz suspenzije izločili s centrifugiranjem na 5000 r/min, 5 min. Suspenzija po centrifugiranju je stabilna magnetna tekočina. Kot merilo za uspešnost postopka prekritja nanodelcev s citronsko kislino in njihovega dispergiranja so uporabili vsebnost nanodelcev v stabilni magnetni tekočini. Vsebnost nanodelcev je bila določena z žaroizgubo.

Magnetne nanodelce, dispergirane v vodi, so prevlekli s siliko. Magnetni tekočini so dodali etanol in TEOS ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3 : \text{TEOS} = 1 : 23$ ;  $\text{TEOS} : \text{EtOH} = 1 : 1$ , masna razmerja), segreli na  $75\text{ }^\circ\text{C}$  in pustili 24 h, da je TEOS v celoti hidroliziral. Debelino prevleke silike na nanodelcih so kontrolirali s količino TEOS-a.

### Priloga C:

Postopek sinteze kobalt feritnih nanodelcev (povzeto po El-Okr s sod, 2011)

Nanodelce kobalt ferita ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) so sintetizirali z metodo koprecipitacije v vodnih raztopinah pri povišani temperaturi, na podlagi Schikorrjeve reakcije:



Za sintezo kobalt feritnih nanodelcev so uporabili raztopine ustreznih kloridov. Stehiometrično množino kloridov, ki je ustrezala izhodni sestavi  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , so raztopili v deionizirani vodi ter raztopino obarjali z 1M vodno raztopino natrijevega hidroksida. Postopek je potekal dvostopenjsko. V prvi stopnji je prišlo do obarjanja  $\text{Co}^{2+}$  in  $\text{Fe}^{3+}$  hidroksidov v mediju s  $\text{pH} > 8$  in v naslednji stopnji do oksidacije oborjenih kovinskih hidroksidov ter nastanka spinelnega produkta. Sinteza je potekala ob intenzivnem mešanju v reaktorski posodi 2 uri pri temperaturi  $87 \pm 2$  °C. Po opravljeni sintezi so posodo ohladili, vsebino magnetno ločili in nanodelce nekajkrat sprali.

Na nanodelce so v naslednji stopnji adsorbirali citronske kisline in jih koloidno redispergirali v vodnem mediju. Citronska kislina je delovala kot surfaktant in preprečevala aglomeracijo in posledično sedimentacijo nanodelcev.



### Priloga D:

#### Karakterizacija uporabljenih magnetnih nanodelcev

Tip nanodelcev, suspendiran v PBS-citratnem pufru (pH = 7,4)	Velikost nanodelcev v suspenziji [nm] (DLS)	$\zeta$ -potencial nanodelcev [mV] (pH = 7,4)
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	/ (> 300 nm*)	-30
CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> -CA	15-25	-15
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Si	62	-20
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Si-NH <sub>2</sub>	120-260	-36
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> -Si-COOH	17-22	-23

\* Goli nanodelci CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> so močno aglomerirali ter se posedali v PBS-citratnem pufru. DLS meritev velikosti delcev v suspenziji je bila nezanesljiva. Izmerjena vrednost velikosti delcev > 300 nm je velikost manjših aglomeratov golih CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nanodelcev, ki so še ostali suspendirani, večji aglomerati pa so se pred meritvami posedli.

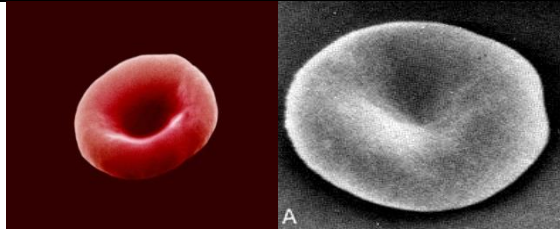
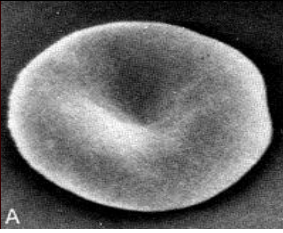
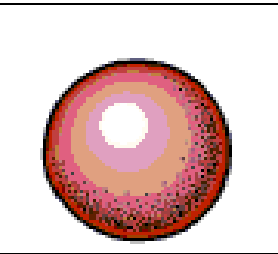


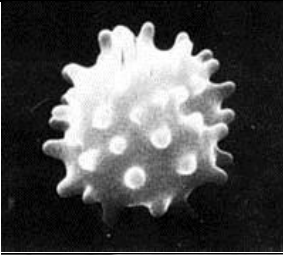
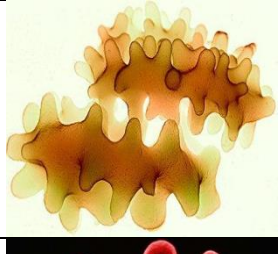
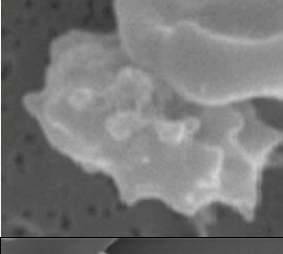
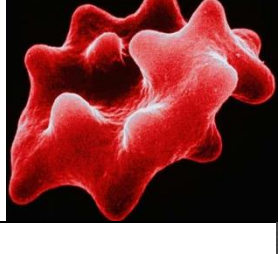
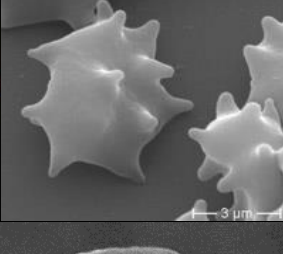
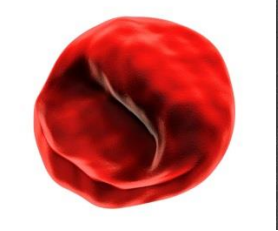
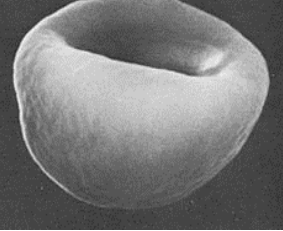
Hidrodinamična velikost nanodelcev, suspendiranih v PBS-citratnem pufru (pH = 7,4), je bila izmerjena na Fritsch Analysette 12 DynaSizer (Idar-Oberstein, Germany) z metodo dinamičnega sipanja svetlobe (Dynamic Light Scattering, DLS, ang.). Navedena je številčna porazdelitev (Size dispersion by Number, ang.) pri statistični metodi.

Zeta potencial nanodelcev, suspendiranih v PBS-citratnem pufru (pH = 7,4), je bil izmerjen z ZetaPALS, Brookhaven Instruments Corp (NY, USA).

Pri nanodelcih Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Si-NH<sub>2</sub> bi pričakovali nizke, vendar pozitivne izmerjene vrednosti zeta potencialov. Pri pH = 7,4 so nanodelci Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Si-NH<sub>2</sub> v suspenziji pozitivno nabiti, zato verjetno prihaja do interakcij nanodelcev z negativno nabitimi molekulami citrata. Te se adsorbirajo na površino nanodelcev, kar se odraža v negativnem zeta potencialu. Podoben pojav opazimo tudi pri golih nanodelcih CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

### Priloga E:

Slikovno gradivo za pomoč pri razločevanju posameznih transformacij eritrocitne oblike

		<p><b>"Normalen (nativni) eritrocit"</b> – eritrocit značilne bikonkavne diskoidne oblike z gladko površino brez opaznih površinskih tvorb.</p>
		<p><b>Sferocit</b> – eritrocit značilne kroglaste oblike. Površina je lahko gladka, lahko pa opazimo tudi površinske tvorbe.</p>
		<p><b>Ehinocit, sferični</b> – na površini opazimo enakomerno porazdeljene površinske tvorbe, spikule. Osnovna oblika je sferična.</p>
		<p><b>Ehinocit, planarni</b> – glej zgoraj. Osnovna oblika je diskoidna.</p>
		<p><b>Akantocit</b> – eritrocit nepravilne oblike; ne moremo ga označiti niti za planarnega niti za sferičnega. Površina je strukturirana, izrastki so praviloma bolj topi kot pri ehino., po površini celice pa so neenakomerno razporejeni.</p>
		<p><b>Stomatocit</b> – eritrocit z značilno nabrekli obodom; oblika spominja na usta.</p>

Otrin L. Vpliv izbranih magnetnih nanodelcev na morfologijo eritrocitov.

Mag. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Molekulska biologija, 2014

---