

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jaka KOŠAK

**KARAKTERIZACIJA SISTEMA ZA USMERJANJE
ZDRAVIL NA OSNOVI FERILIPOSOMOV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Jaka KOŠAK

**KARAKTERIZACIJA SISTEMA ZA USMERJANJE
ZDRAVIL NA OSNOVI FERILIPOSOMOV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**CHARACTERIZATION OF THE SYSTEM FOR
DRUG TARGETING BASED ON FERRILIPOSOMES**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija biotehnologije. Delo je bilo opravljeno na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bil z dne 16.2.2012 za mentorja magistrskega dela imenovan prof. dr. Boris Turk in za recenzenta prof. dr. Gregor Anderluh.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Branka JAVORNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Boris TURK

Inštitut Jožef Štefan, Biokemija, molekularna in strukturalna biologija

Član: prof. dr. Gregor ANDERLUH

Kemijski inštitut, Laboratorij za molekularno biologijo in nanobiotehnologijo

Datum zagovora: 10.10.2014

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svoje magistrske naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Jaka Košak

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du 2
DK	UDK 615:620.3:577.1(043.2)=163.6
KG	nanotehnologija/nanodelci/magnetični nanodelci/liposomi/zdravila/biokemija
AV	KOŠAK, Jaka
SA	TURK, Boris (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
LI	2014
IN	KARAKTERIZACIJA SISTEMA ZA USMERJANJE ZDRAVIL NA OSNOVI FERILIPOSOMOV
TD	Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP	IX, 57 str., 5 pregled., 36 sl., 32 ref.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V tej studiji smo preučevali vpliv akutne toksičnosti modela liposomov z enkapsuliranimi magnetnimi Fe_3O_4 nanodelci na miših seva FVB/N pri enkratni izpostavitvi. V preizkuusu smo uporabili 5 različnih testnih skupin. Pri vsaki skupini smo uporabili različne testne snovi: nanodelce v pufru, nanodelce v liposomih, nanodelce v liposomih in ciljanje z magnetom, pufer za nanodelce ter kontrolno skupino brez aplikacije snovi. Poskus je zajemal delo z mišmi v laboratoriju, biokemijske analize krvi in histološki pregled organov. Eliminacijo in možno akumulacijo nanodelcev smo ugotavljali s pomočjo barvanja po Perl's Prussian Blue, kjer se modro obarvajo železovi kompleksi. Rezultati biokemijske analize krvi so pokazali, da so izmerjene vrednosti znotraj referenčnih vrednosti. Histološki pregled organov ni pokazal patoloških sprememb organov, prav tako pa nismo opazili nobenega kopičenja nanodelcev v organih. Tako lahko na podlagi dobljenih rezultatov sklepamo, da testirani nanodelci niso toksični za miši.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 615:620.3:577.1(043.2)=163.6
CX	nanotechnology/nanoparticles/magnetic nanoparticles/liposomes/ drugs/ biochemistry
AU	KOŠAK, Jaka
AA	TURK, Boris (supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master study in Biotechnology
PY	2014
TI	CHARACTERIZATION OF THE SYSTEM FOR TARGETING PHAR- MACEUTICALS BASED ON FERRILIPOSOMES
DT	M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO	IX, 57 p., 5 tab., 36 fig., 32 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	In the present study we have examined the acute toxicity of liposome with encapsulated magnetic Fe_3O_4 nanoparticles in the FVB/N mice at a single dose. We used 5 different test groups: nanoparticles in buffer, nanoparticles in liposomes, nanoparticles in liposomes and targeting with a magnet, buffer for nanoparticles and a control group without the application of any substance. The trial included work with mice in the laboratory, biochemical blood analysis and histologic examination of their organs. Elimination and possible nanoparticle accumulation were examined with organ staining by Perl's Prussian Blue, where iron complexes stain blue. Biochemical blood analysis showed no deviations from the reference values. Furthermore, histologic examinations showed no pathological changes in organs. On the basis of the obtained results, we can conclude, that tested nanoparticles are not toxic to mice.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VI
KAZALO SLIK	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	IX
1 UVOD	1
1.1 NANODELCI	1
1.2 NANOTEHNOLOŠKE DOSTAVNE PLATFORME	2
1.3 TERANOSTIKA	2
1.3.1 Nanodelci z železovim oksidom pri teranostiki raka.....	4
1.3.2 Ogljikove nanocevke v teranostiki raka	5
1.3.3 Kvantne pike v teranostiki raka.....	5
1.3.4 Zlato v teranostiki raka.....	5
1.3.5 Silicijev dioksid v teranostiki raka.....	5
1.4 NAMEN DELA	6
1.5 HIPOTEZA	6
2 PREGLED OBJAV	7
2.1 MAGNETNI NANODELCI	7
2.1.1 Razvoj magnetne dostave zdravil.....	7
2.1.2 Novejše oblike magnetnih nanodelcev v biomedicini	8
2.1.3 Magnetno usmerjanje zdravil	9
2.2 TOKSIČNOST	11
2.2.1 Vnos, biodistribucija in čiščenje magnetnih nanodelcev	11
2.3 LIPOSOMI	14
2.3.1 Magnetni liposomi	14
2.3.2 Karakterizacija feriliposomov.....	15
3 MATERIALI IN METODE	16
3.1 MATERIALI	16
3.2 POSKUSNE ŽIVALI	17
3.3 METODE DELA	19
3.3.1 Začetek poskusov	19
3.3.2 Odvzem krvi in osamitev organov	19
3.4 MIKROSKOPIJA	24
4 REZULTATI.....	25
4.1 OPAZOVANJE MIŠI MED POSKUSOM	25
4.2 BIOKEMIJSKA ANALIZA KRVI	27
4.3 ANALIZA ORGANOV	37
5 RAZPRAVA.....	49
6 SKLEPI	53
7 POVZETEK	54
8 VIRI	55
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primeri nanoplatform ter njihovih stopenj v klinični uporabi (Lehner in sod., 2013)	2
Preglednica 2: Primerjava prednosti in slabosti različnih anorganskih nanodelcev za slikanje in terapijo raka	6
Preglednica 3: Prikaz razvrstitev miši po skupinah.....	18
Preglednica 4: Posamezni koraki priprave organov ter čas trajanja korakov v tkivnem procesorju.....	21
Preglednica 5: Referenčne vrednosti za biokemijsko analizo krvi miši (Mouse ..., 2013)	27

KAZALO SLIK

Slika 1: Shema <i>in vivo</i> uporabe nanoteranostika za zdravljenje raka (Kocbek, 2012).....	4
Slika 2: Prikaz nekaterih mejnikov v zgodovini nanodostavnih sistemov učinkovin (Kristl, 2012).....	8
Slika 3: Shema multifunkcionalne uporabe magnetnih nanodelcev za diagnozo in zdravljenje raka	10
Slika 4: Mehanizmi uporabljeni pri retikuloendoteljski sistem za prepoznavanje in odstranitev nanodelcev v krvi (Duguet in sod., 2010)	12
Slika 5: Kvalitativni diagram prikaza razvoja časa zadrževanja v krvi glede na velikost delcev (Arruebo in sod., 2007)	13
Slika 6: Prikaz štirih različnih poti vnosa nanodelcev z njihovimi prednostmi in slabostmi (Yildirimer in sod., 2011).....	14
Slika 7: Prikaz tkivnega procesorja Shandon CITADEL 1000 lociranega na IJS.....	20
Slika 8: Kasete za pripravo organov (Tissue ..., 2010).....	20
Slika 9: Prikaz mikrotoma MICROM EC 350-1/2 za obdelavo organov s parafinom (Thermo..., 2010).....	21
Slika 10: Prikaz mikrotoma MICROM HM – 315 na IJS	22
Slika 11: Prikaz mikroskopa Olympus IX81 (Olympus ..., 2012)	24
Slika 12: Prikaz povprečne teže samcev posameznih skupin glede na število dni po aplikaciji	25
Slika 13: Prikaz povprečne teže samic posameznih skupin glede na število dni po aplikaciji	26
Slika 14: Prikaz aktivnosti alkalne fosfataze v μ kat/l	27
Slika 15: Prikaz aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST) v μ kat/l	28
Slika 16: Prikaz aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT) v μ kat/l.....	29
Slika 17: Prikaz koncentracije dušika v obliki sečnine (BUN) (mmol/l).....	30
Slika 18: Prikaz koncentracije kreatinina (μ mol/l).....	31
Slika 19: Prikaz aktivnosti laktat dehidrogenaze v μ kat/l	32
Slika 20: Prikaz aktivnosti amilaze v μ kat/l	33
Slika 21: Prikaz aktivnosti lipaze v μ kat/l.....	34
Slika 22: Prikaz aktivnosti fosfokreatin kinaze (MB) v μ kat/l.....	35
Slika 23: Prikaz aktivnosti fosfokreatin kinaze (BB) v μ kat/l.....	36
Slika 24: Prikaz aktivnosti fosfokreatin kinaze (MM) v μ kat/l.....	37
Slika 25: Primerjava obarvanih jeter samcev po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E	38
Slika 26: Primerjava obarvanih jeter samic po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E	39
Slika 27: Primerjava obarvanih ledvic samcev po H&E metodi med skupinami A,B,C,D,E	40
Slika 28: Primerjava obarvanih ledvic samic po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E	41

Slika 29: Primerjava obarvane vranice samcev po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E.....	42
Slika 30: Primerjava obarvane vranice samic po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E	42
Slika 31: Primerjava obarvanih pljuč samcev po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E.....	43
Slika 32: Primerjava obarvanih pljuč samic po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E	44
Slika 33: Primerjava jeter obarvanih samcev po Perl's Prussian Blue metodi med skupinami A,B,C,D in E.....	45
Slika 34: Primerjava jeter samic obarvanih po Perl's Prussian Blue metodi med skupinami A,B,C,D in E	46
Slika 35: Primerjava ledvic samcev obarvanih po Perl's Prussian Blue metodi med skupinami A,B,C,D in E.....	47
Slika 36: Primerjava obarvanih ledvic samic po Perl's Prussian Blue metodi med skupinami A, B in E	48

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ALP	alkalna fosfataza
ALT	alanin aminotransferaza
AST	aspartat aminotransferaza
B0	konstantno, homogeno magnetno polje uporabljeno za polarizacijo spin-ov, kar ustvarja magnetizem
BUN	dušik v obliki uree
CK	kreatin kinaza
dH ₂ O	destilirana voda
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EPR	učinek večje prepustnosti in zadrževanja
FDA	ang. <i>Food and drug administration</i>
HCl	klorovodikova kislina
H&E	hematoksilin in eozin
IDMS	izotopska dilucijska masna spektrometrija
IFCC	Mednarodna federacija za klinično kemijo
LDH	laktat dehidrogenaza
MRI	magnetno resonančno slikanje
ND	nanodelci
NMR	jedrska magnetna resonanca
PEG	polietilen glikol
PBS	izotonični fosfatni pufer
RCF	relativna centrifugalna sila
RES	retikuloendoteljski sistem
siRNA	kratka interferenčna ribonukleinska kislina
SPIO	superparamagnetni železov oksid
t _s	sprostitveni čas
USPIO	ultra majhni superparamagnetni železov oksid
ZnS	cinkov sulfid
ZU	zdravilne učinkovine

1 UVOD

Trenutno eno najbolj aktivnih področij v raziskavah raka je razvoj različnih pristopov, ki bi omogočili selektivno dostavo zdravila do obolelega mesta. Velik problem pri razvoju zdravilnih učinkovin namreč predstavlja ravno njihov vnos in posledično večje doze in vpliv na zdrava tkiva ter celice. V ta namen se uporabljajo številni sistemi za dostavo zdravilnih učinkovin. Med različnimi tipi nanodelcev so magnetni nanodelci poseben razred materialov z dobrimi lastnostmi za njihovo manipulacijo in transport do želene lokacije s pomočjo magnetnega polja (Mikhaylov in Vasiljeva, 2011).

Nedavne raziskave so pokazale, da zdravljenje raka lahko izboljšamo tako, da poleg tumorja ciljamo tudi njegovo mikrookolje (imunske celice, fibroblasti), ki pomembno prispeva k razvoju tumorja. S ciljanjem stromalnih celic, ki obdajajo rakave celice lahko potem takem izboljšamo učinkovitost že obstoječih metod zdravljenja raka (Cohen in Shoushan, 2013).

1.1 NANODELCI

So delci različnih oblik in sestave velikosti 1-100 nm v premeru in se posledično uvrščajo v velikostni razred biomolekul in celičnih organelov. Med pozitivne lastnosti nanodelcev uvrščamo njihovo veliko razmerje med površino in prostornino, izboljšano fotoemisijo, visoko električno in toplotno prevodnost ter izboljšano površinsko katalitično aktivnost. Zaradi fizičnih lastnosti in strukturne robustnosti so prilagodljivi glede na velikost, obliko in kompozicijo (Azzazy in Mansour, 2009).

Nekateri nanodelci lahko nosijo različen tovor, kot so zdravila z majhno molekulske maso, kontrastna sredstva, proteini, nukleinske kisline in druge snovi. Izdelava takih nanomaterialov zahteva sposobnost kontroliranja velikosti delcev, zagotavljanja biokompatibilnosti, optimiziranja specifičnosti in doseganja kontroliranega sproščanja. Razvoj nanotehnoloških dostavnih platform je trenutno zelo aktualno področje za dostavo in izboljšanje farmakokinetičnih lastnosti različnih učinkovin. Nanodelci, ki se uporabljajo kot dostavní sistemi so liposomi, dendrimeri, polimeri, ogljikove nanocevke, kovinski nanodelci, organski nanodelci, kvantne pike, nanogeli in peptidni nanodelci (Lehner in sod., 2013).

1.2 NANOTEHNOLOŠKE DOSTAVNE PLATFORME

Preglednica 1: Primeri nanoplatform ter njihovih stopenj v klinični uporabi (Lehner in sod., 2013)

Nanoplatforma	Velikostni razred	Sestavina	Uporabnost	Tarča	Status
Liposom	<100 nm	Doxorubicin	Zdravljenje raka	Kaposijev sarkom, rak jajčnikov, rak dojk	FDA odobreno
		Daunorubicin	Zdravljenje raka		FDA odobreno
Dendrimer	1-10 nm	Methotrexate	Zdravljenje raka	Različna rakava obolejenja	<i>In vitro/ In vivo</i>
Polimer	50-200 nm	Pegaspargase	Zdravljenje raka	Akutna limfoblastna levkemija	FDA odobreno
		Doxorubicin	Zdravljenje raka	Rak na dojkah/ pljučih	Faza II
Micel	10-100 nm	Paclitaxel	Zdravljenje raka	Rak dojk	Faza IV
Ogljikove nanocevke	1-25 nm premera	Paclitaxel	Zdravljenje raka	Rak dojk	<i>In vivo</i>
Kovinski nanodelci	1-150 nm	Ferumoxid	MRI kontrastno sredstvo	Jetra	FDA odobreno
		Železov oksid	Zdravljenje raka	Glioblastom	EU odobreno
Organski nanodelci	20-400 nm		Zdravljenje raka	Rak jeter	Faza II
Kvantne pike	1-10 nm	Doxorubicin	Zdravljenje raka	Rak jajčnikov	<i>In vivo</i>

1.3 TERANOSTIKA

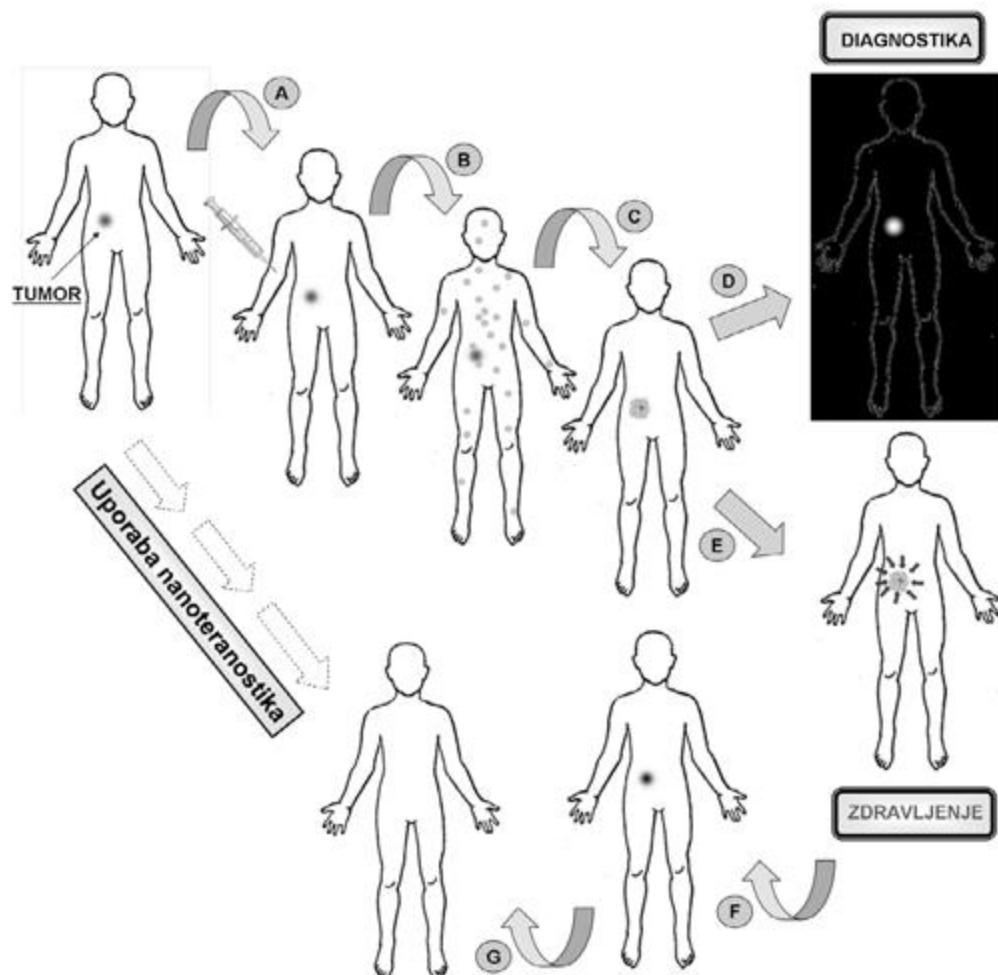
Teranostik je napreden dostavno-diagnostični sistem za uporabo v medicini. Združuje terapevtsko in diagnostično komponento in sočasno omogoča diagnostiko in zdravljenje bolezni. Nanoteranostiki predstavljajo novost na področju zdravljenja bolezni. Z njimi lahko dosežemo usmerjeno dostavo zdravilnih učinkovin specifično v tarčno populacijo celic in hkrati z neinvazivnimi metodami spremljamo lokalizacijo nanodostavnega sistema in posledično zdravila v organizmu. Slika 1 prikazuje shemo in vivo uporabe nanoteranostika za zdravljenje raka. Medsebojno se teranostiki razlikujejo po obliki, zgradbi, velikosti, spo-

sobnostih ciljanja in metodi za vizualizacijo oz. spremeljanje sistema v organizmu (Kocbek, 2012).

Razvoj teranostike je predvsem posledica zdravljenja heterogenih bolezni in delovanja zdravilnih učinkovin le pri omejeni populaciji pacientov in pri določenih stopnjah razvoja bolezni (Xie in sod., 2010). Predvideva se, da bi ta pristop lahko doprinesel k pospešitvi razvoja zdravil, izboljšani kontroli bolezni, zmanjšanemu tveganju in nižjim stroškom zdravljenja (Ahmed in sod., 2012).

Glavne sestavine vsakega teranostika so (Kocbek, 2012):

- I. **diagnostična komponenta**, ki omogoča neinvazivno spremeljanje porazdelitve nanosistema v organizmu, vrednotenje obsega lokaliziranega nalaganja na ciljanem mestu in spremeljanje sproščanja vgrajenih učinkovin; diagnostična oz. kontrastna sredstva za *in vivo* slikanje so lahko optično aktivne kovine, majhne molekule in kovinski oksidi, ultrazvočna kontrastna sredstva ali radionuklidi;
- II. **dostavni sistem** ali obloga, ki obdaja diagnostično komponento, zagotavlja stabilnost koloidne disperzije teranostika, nudi funkcionalne skupine za reakcije biokonjugacije in omogoča vgrajevanje zdravilnih učinkovin;
- III. **zdravilna učinkovina** je kovalentno ali nekovalentno vezana na dostavni sistem in se na tarčnem mestu v organizmu sprošča spontano ali pod vplivom različnih dražljajev; lahko je vezana z elektrostatskimi interakcijami na gradnike teranostika, fizikalno ujeta v ogrodje nanodostavnega sistema ali neposredno kovalentno vezana na diagnostično komponento in/ali na sam nanodostavni sistem.



Slika 1: Shema *in vivo* uporabe nanoteranostika za zdravljenje raka (Kocbek, 2012)

Legenda: (A) parenteralni vnos nanoteranostika, (B) sistemski porazdelitev nanoteranostika takoj po vnosu, (C) lokalno nalaganje in zadrževanje na območju tumorja (EPR učinek in aktivno ciljanje), (D) *in vivo* slikanje, (E) lokalno sproščanje vgrajene učinkovine, (F) uničenje tumorskih celic, (G) ozdravitev.

1.3.1 Nanodelci z železovim oksidom pri teranostiki raka

So nanokristali narejeni iz magnetita ali hematita. Železo v prisotnosti oksidanta postane železov oksid, ki ima nizko stopnjo toksičnosti in je lahko razgrajeno preko biološkega sistema tako, da postane del zaloga železa v telesu. Poznamo več oblik železovih oksidov, med katere vključujemo Hematit (α -Fe₂O₃), Magnetit (Fe₃O₄), Magemit (γ -Fe₂O₃), β -Fe₂O₃, ϵ -Fe₂O₃ in Wustit (FeO). V raziskavah se največkrat uporabljajo nanodelci z magnetitom. Med železove nanodelce sodijo tudi superparamagnetni delci, ki so manjši od 20 nm in kažejo ničelnim magnetizem ob odsotnosti zunanjega magnetnega polja, medtem ko v prisotnosti magnetnega polja postanejo magnetni. Zaradi visokega magnetnega momenta so učinkoviti pri zniževanju T₂ relaksacijskega časa (Chen in sod., 2013; Suh in sod., 2009; Xie in sod., 2010).

Dobre lastnosti železovih nanodelcev so: uporabnost kot kontrastna sredstva, superparamagnetne aktivnosti, visoko razmerje površina-prostornina, nizka toksičnost, učinkovite površinske modifikacije magnetnih kompozitov, biokompatibilnost, njihovi zelo nizki stroški priprave pa omogočajo uporabnost tudi v raziskovalne namene (Ahmed in sod., 2012; Dias in sod. 2011).

1.3.2 Ogljikove nanocevke v teranostiki raka

So eno ali več-slojne cilindrične strukture in mišljene tudi kot alotropi ogljika. Imajo unikatne mehanske in elektronske lastnosti, ki so pomembne pri materialni kemiji in nanotehnologiji in se uporablja pri termalnem ablacijskem slikanju ter dostavi genov in zdravil. Pomembnost nanocevk se je povečala po zaslugi učinkovitega celičnega vnosa, čeprav natančen mehanizem še ni poznан (Ahmed in sod., 2012).

1.3.3 Kvantne pike v teranostiki raka

Kvantne pike so anorganski polprevodniki fluoroforjev s premerom med 2 in 10 nm, ki temeljijo na prehodnih elementih periodičnega sistema. Uporablja se pri bioloških aplikacijah, predvsem pri slikanju in dostavi zdravil ter kot označevalci v imunotestih, imunohistokemijskih barvanjih in celičnem slikanju (Ahmed in sod., 2012; Azzazy in Mansour, 2009).

Posebna funkcija kuantnih pik je točno prilaganje optičnih lastnosti z uravnavanjem njihove velikosti in kompozicije (Xie in sod., 2010). Vendar velik problem kuantnih pik predstavlja njihova toksičnost, ki jo lahko zmanjšamo z uporabo silicijevih spojin in ogljika pri pripravi kuantnih pik (Ahmed in sod., 2012).

1.3.4 Zlato v teranostiki raka

Zlati nanodelci so večinoma sestavljeni iz tankega ovoja zlata, ki obdaja dielektrično jedro (izolacijski material), lahko pa tudi kot samostojni zlati nanodelci (v sferični obliki). Velikost zlatih nanodelcev znaša med 0,8 in 250 nm in posledično vpliva na njihove optične lastnosti. Zaradi visokega absorpcijskega koeficiente so uporabni pri označevanju DNA in proteinov za detekcijo bioloških tarč s povečano občutljivostjo (Azzazy in Mansour, 2009).

1.3.5 Silicijev dioksid v teranostiki raka

Silicijev dioksid že dolgo časa uporablja pri vsadkih in velja za toksikološko varen produkt. V nanomedicini se uporablja kot material za prevleko, ki zagotavlja ali preprečuje različne karakteristike nanodelcev (Ahmed in sod., 2012). Delci s silicijevim dioksidom navadno nimajo potrebnih lastnosti, uporabnih pri slikanju, vendar lahko služijo kot odlična platforma uporabna v teranostiki, saj omogočajo enostavnejše vnašanje terapevtikov (Xie in sod., 2010).

Preglednica 2: Primerjava prednosti in slabosti različnih anorganskih nanodelcev za slikanje in terapijo raka (Huang in sod., 2011)

Vrsta ND	Prednosti	Slabosti
Zlati nanodelci	<ul style="list-style-type: none">- Biokompatibilnost- Enostavnost površinske funkcionalizacije- Visoka fotermalna izmenjevalna stopnja in fotostabilnost- Omejitev detekcije posameznih molekul	<ul style="list-style-type: none">- Omejena globina penetracije pri slikanju in fotermalni terapiji
Kvantne pike	<ul style="list-style-type: none">- Višja svetlost in fotostabilnost kot pri organskih barvilih	<ul style="list-style-type: none">- Toksičnost- Omejena resolucija slikanja in globina penetracije
Ogljikove nanocevke	<ul style="list-style-type: none">- Konverzija absorbirane svetlobne energije v toploto	<ul style="list-style-type: none">- Toksičnost
Magnetni nanodelci	<ul style="list-style-type: none">- Biorazgradljivost in biokompatibilnost- Konverzija elektromagnetne energije v toploto- Daljša tkivna penetracija pri slikanju	<ul style="list-style-type: none">- Opsonizacija in hitro čiščenje prek fagocitov
Keramični nanodelci	<ul style="list-style-type: none">- Nižji stroški in relativna enostavnost priprave- Biokompatibilnost- Visoka stabilnost	<ul style="list-style-type: none">- Manjša velikost por (0,5-1 nm) lahko omeji sprostitev enkapsulirane molekule z zdravilom

1.4 NAMEN DELA

Cilj naloge je bil *in vivo* preveriti toksičnost dostavnega modela liposomov z enkapsuliranimi magnetnimi Fe_3O_4 nanodelci. Za nadaljnjo uporabo je tako potrebno preveriti tudi, ali je tak sistem toksičen. Toksičnost smo preverili z biokemijsko analizo krvi, histološkimi metodami in morebitno akumulacijo nanodelcev v organih z določanjem železovega kompleksa.

1.5 HIPOTEZA

- Liposomi z enkapsuliranimi Fe_3O_4 nanodelci niso toksični in ne povzročajo patoloških sprememb v miših.
- Nanodelci se ne akumulirajo v organih in se odstranijo iz telesa.

2 PREGLED OBJAV

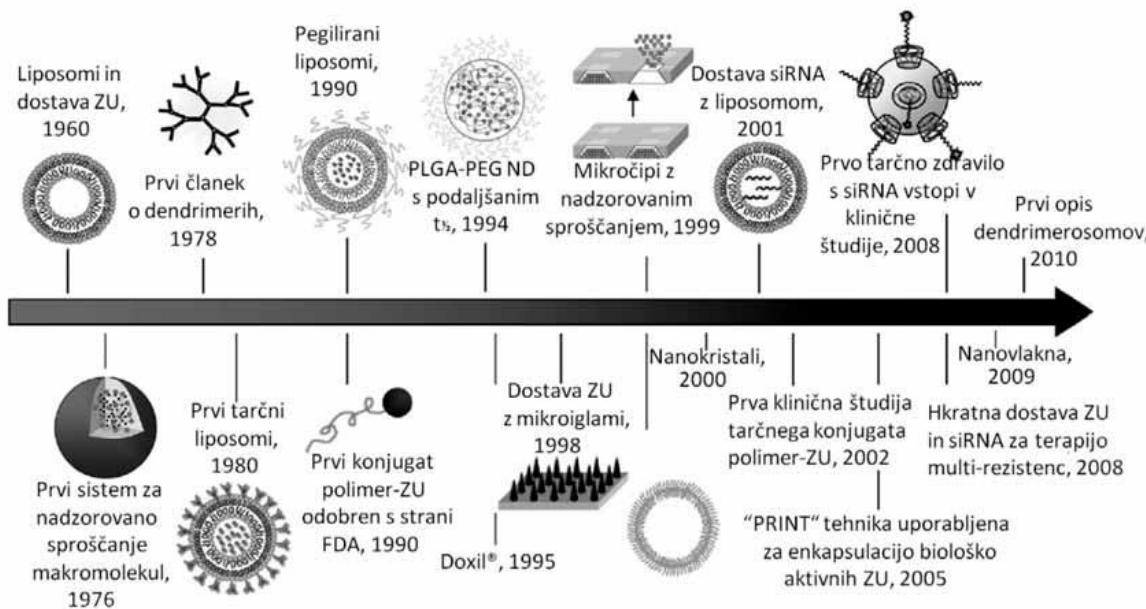
2.1 MAGNETNI NANODELCI

Magnetni nanodelci sodijo v velik razred nanomaterialov in imajo potencial, da korenito spremenijo trenutno klinično diagnostiko in terapevtske tehnike. S širokim naborom aplikacij v detekciji, diagnostiki in zdravljenju bolezni bi lahko magnetni nanodelci imeli pomembno vlogo pri doseganju zdravstvenih potreb prihodnosti, kot so rak, kardiovaskularne bolezni in nevrološke bolezni. Poleg tega so nekateri uporabni kot kontrastna sredstva za MRI ter kot toplotni mediatorji pri terapijah raka. Zaradi njihove majhne velikosti feri- ali fero- magnetni nanomateriali postanejo enotna magnetna domena (Sun in sod., 2008; Mikhaylov in Vasiljeva, 2011).

2.1.1 Razvoj magnetne dostave zdravil

Vsek pregled razvoja dostave zdravil bi se lahko začel z omembo imena Paula Ehrlicha (1854-1915), ki je predlagal, da lahko toksin za ta organizem dostavimo skupaj s sredstvom za selektivnost, če lahko neko sredstvo selektivno cilja organizem, ki povzroča bolezen. Ehrlich je l. 1908 za raziskave na področju imunosti prejel Nobelovo nagrado za medicino. Freeman s sod. (1960, cit. po Arruebo in sod., 2007) je predlagal, da bi se lahko magnetni nanodelci prenesli preko vaskularnega sistema in koncentrirali v specifičnih delih telesa s pomočjo magnetnega polja. Uporaba magnetnih mikro- in nano-delcev za dostavo kemoterapevtikov je napredovala v 70-ih letih, ko so Zimmerman in sod. (1976, cit. po Arruebo in sod., 2007) uporabili magnetne eritrocite za dostavo citotoksičnih zdravil. V tem času so Widder in sod. opisali usmerjeno ciljanje namagnetenih albuminskih mikrosfer enkapsuliranih z doxorubicinom za zdravljenje raka v živalskih modelih. V 1980-ih je več avtorjev razvilo strategijo dostave različnih zdravil s pomočjo magnetnih mikrokapsul in mikrosfer in vsi ti pristopi so temeljili na delcih mikro velikosti. Lübbe s sod. (1996, cit. po Arruebo in sod., 2007) je prvič uporabil magnetne nanodelce v živalskih modelih. Opravljena je bila 1. faza kliničnih raziskav, v okviru katere so paciente z neuspešno zdravljenjo obliko raka zdravili z magnetnimi nanodelci, ki so vsebovali epirubicin. V tem poskusu je več kot 50 % nanodelcev končalo v jetrih. Slika 2 prikazuje nekatere izmed mejnikov v zgodovini nanodostavnih sistemov učinkovin (Arruebo in sod., 2007).

Različna podjetja proizvajajo magnetne mikro- in nano- delce, ki jih uporabljam v MRI, inducirani hipertermiji, sortiranju in ciljanju celic, bioseparaciji, encimski imobilizaciji, imunotestih, transfekciji genov ter detekcijskih sistemih (Arruebo in sod., 2007).



Slika 2: Prikaz nekaterih mejnikov v zgodovini nanodostavnih sistemov učinkovin (Kristi, 2012)

2.1.2 Novejše oblike magnetnih nanodelcev v biomedicini

Železoksidni nanodelci so že bili uspešno uporabljeni v biomedicinskih aplikacijah tako *in vitro* (magnetna separacija, magnetna detekcija in magnetna transfekcija) kot *in vivo* (MRI, usmerjena dostava zdravil in tkivno inženirstvo). Vendar imajo nekateri nanodelci tudi svoje omejitve, kot so nizek magnetni moment, nizka občutljivost v MRI diagnostiki in predvsem majhna kapaciteta tovora. V želji po odpravi teh omejitev mono-funkcionalnih nanodelcev so se raziskave usmerile v razvoj novih oblik magnetnih nanodelcev, kot so nanodelci z visokim magnetnim momentom, multifunkcionalni magnetni nanodelci in nanodelci s povišano kapaciteto zdravil (Xu in Sun, 2012).

2.1.2.1 Magnetni nanodelci z visokim magnetnim momentom

Mednje prištevamo struktурno kontrolirane feritne ter kovinske magnetne nanodelce. Slednji temeljijo na železu, kobaltu in niklu, ki imajo večji magnetni moment v primerjavi z oksidi in so običajno pripravljeni s termično dekompozicijo ali z redukcijo organokovinskih prekurzorjev (Xu in Sun, 2012).

2.1.2.2 Multifunkcionalni magnetni nanodelci

Multifunkcionalni magnetni nanodelci z železovim oksidom so bili zaradi njihovega odziva na zunanje magnetno polje raziskani kot kontrastna sredstva za MRI in uporabo pri magnetni hipertermiji. Vendar je problem, da imajo ti nanodelci le en tip kemične površine in so posledično manj primerni za združitev z biološkimi sredstvi in molekularnimi zdravili. Multifunkcionalnost lahko dosežemo prek molekularne funkcionalizacije obstoječih magnetnih nanodelcev, z izdelavo multi-komponentnih magnetnih nanodelcev (heterogeni

magnetni nanodelci) ali s ko-enkapsulacijo magnetnih nanodelcev z drugimi funkcionalnimi komponentami v matriks ("core/shell"magnetni nanodelci) (Xu in Sun, 2012).

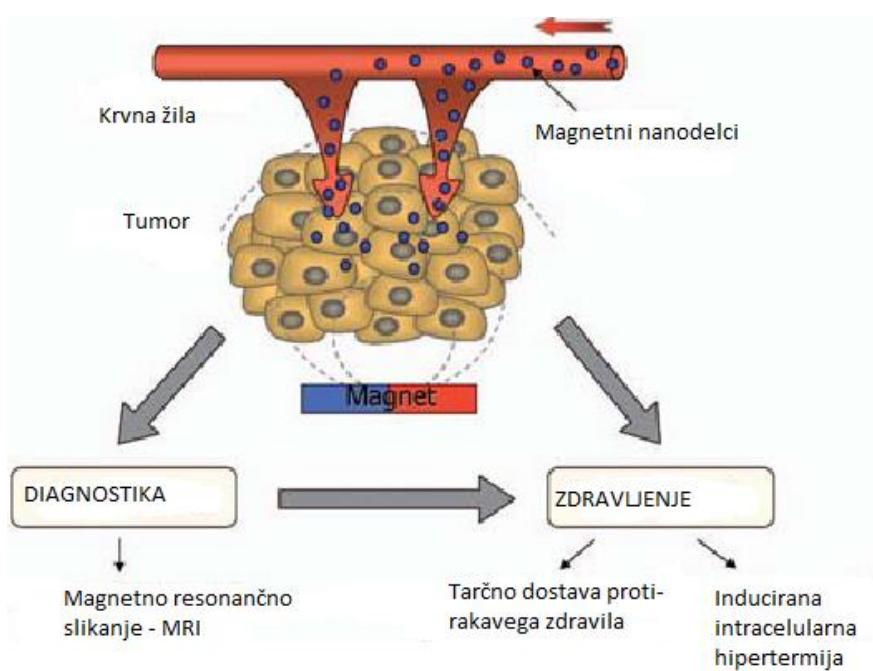
2.1.2.3 Votli magnetni nanodelci

Učinkovitost magnetnih nanodelcev kot dostavnega sistema je omejena zaradi visoke gostote anorganskega jedra in potrebnega ovoja za stabilizacijo, kar močno zmanjša odstotek masnega deleža zdravila v konjugatu. Ena od rešitev je uporaba votlih nanodelcev, ki imajo magnetni ovoj in prazno jedro, saj je v tem primeru lahko zdravilo naloženo znotraj in zunaj magnetnih nanodelcev. Upoštevajoč biokompatibilnostne zahteve, so najboljši kandidati Fe_3O_4 votli magnetni nanodelci, Fe votli nanookvir, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{ZnS}$ votli magnetni nanodelci in porozni Fe_3O_4 ali $\text{Fe}_3\text{O}_4-\text{SiO}_2$ dvoslojne votle nanopalice (Xu in Sun, 2012).

2.1.3 Magnetno usmerjanje zdravil

Magnetno usmerjanje zdravil je uporabno, ker omogoča specifično dostavo zdravila ob uporabi magnetnih nanodelcev in zunanjega magnetnega polja, ki je osredotočeno na tumor. Shema multifunkcionalne uporabe magnetnih nanodelcev za diagnozo in zdravljenje raka prikazuje slika 3. Takšen način usmerjene dostave zdravil poskuša koncentrirati zdravilo na specifično območje, s čimer izboljšuje njegovo učinkovitost in zmanjšuje škodljive stranske učinke (Mikhaylov in Vasiljeva, 2011).

Zdravilo ali terapevtski radionukleid je vezan na magnetno spojino ter vnesen v telo in koncentriran v tarčnem mestu s pomočjo magnetnega polja (uporabljamoc interno vstavljen stalni magnet ali zunanje uporabljen polje). Glede na aplikacijo delci nato sprostijo zdravilo ali povzročijo lokalni učinek (obsevanje iz radioaktivnih mikrosfer ali hipertermije z magnetnimi nanodelci). Sprostitev zdravila lahko poteka na več načinov: z enostavno difuzijo preko mehanizmov, ki potrebujejo encimsko aktivnost ali kot sprememb v fizioloških pogojih, kot so pH, osmolalnost in magnetno prek magnetnih nanodelcev konjugiranih z zdravilom (Arruebo in sod., 2007).



Slika 3: Shema multifunkcionalne uporabe magnetnih nanodelcev za diagnozo in zdravljenje raka
(Mikhaylov in Vasiljeva, 2011)

2.1.3.1 Magnetno resonančno slikanje

Magnetno resonančno slikanje (MRI) je diagnostična metoda, katere razvoj se je močno pospešil predvsem po zaslugu odkritja materialov z nizko odpornostjo pri izdelavi superprevodnih magnetov ter izboljšanja računalniških zmogljivosti shranjevanja in procesiranja podatkov. MRI omogoča diferenciacijo tkiv na osnovi različnih relaksacijskih časov ter je trenutno najbolj učinkovita neinvazivna radiološka tehnika, ki se uporablja v medicini. Učinkovita je predvsem pri ocenjevanju bolezni kosti, mehkih tkiv in centralnega živčnega sistema. Do močnega razvoja magnetnega resonančnega slikanja v zadnjih 30-ih letih je prišlo predvsem po zaslugu odkritja materialov z nizko odpornostjo pri izdelavi superprevodnih magnetov ter izboljšanja računalniških zmogljivosti shranjevanja in procesiranja podatkov (Duguet in sod., 2010; Mikhaylov in Vasiljeva, 2011).

MRI izkorišča lastnosti jedrske magnetne resonance (NMR) komponent človeškega telesa in predvsem protone v vodi znotraj tkiv, lipidnih membran, proteinov itn. Temeljno načelo je enako kot pri NMR spektroskopiji kemijskih analiz, kjer je združeno močno statično magnetno polje B_0 in perpendikularno radiofrekvenčno polje (5 – 100 MHz). Po radiofrenčnem pulzu se spini trudijo poravnati z B_0 poljem. Ta relaksacijski fenomen je lahko razgrajen v dva mehanizma: vzdolžna relaksacija, ki ustreza postopnemu povečanju vzdolžne komponente magnetizacije, ter prečni relaksacija, ki ustreza postopnemu pojemanju prečne komponente. Okarakterizirane so z relaksacijskima časoma T_1 (čas potreben, da se 63 % vzdolžne komponente ponovno vzpostavi) in T_2 (čas potreben, da 37 % prečne komponente izgine) (Duguet in sod., 2010).

2.1.3.2 Inducirana hipertermija

Hipertermija je postopek dviganja temperature v tkivu do 40-45 °C in predstavlja obetaven pristop pri zdravljenju raka, ki sloni na hipotezi, da so rakave celice bolj občutljive na povišanje T kot normalne celice. Magnetni nanodelci ob prisotnosti visoko frekvenčnega magnetnega polja ustvarijo toploto prek oscilacije njihovega magnetnega momenta kot posledica Neel in Brownian relaksacij. Pomembna prednost pri uporabi magnetnih nanodelcev za inducirano hipertermijo je sposobnost kombiniranja le-teh z *in vivo* slikanjem, ki uporablja MRI kontrastne lastnosti magnetnih nanodelcev (Mikhaylov in Vasiljeva, 2011).

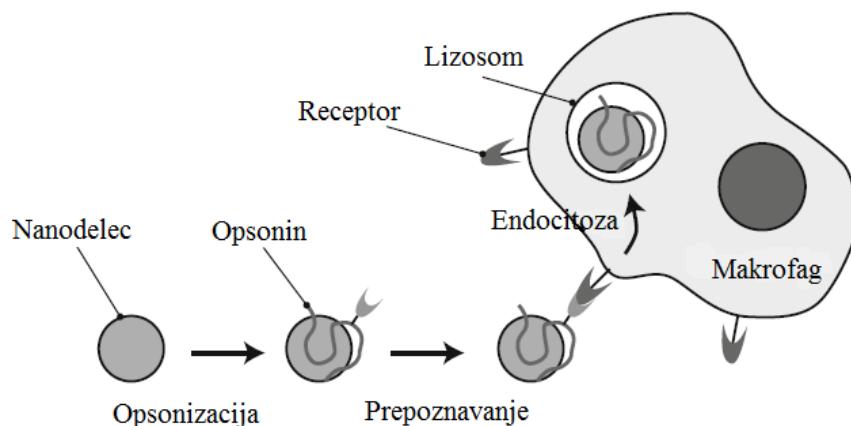
2.2 TOKSIČNOST

Vse farmacevtske učinkovine namenjene uporabi za ljudi in živali zahtevajo obsežna testiranja za oceno merebitnih toksičnih stranskih učinkov. Toksičnost nanodelcev je odvisna od številnih faktorjev kot so: kemijska sestava, metoda vnosa, velikost, biorazgradljivost, topnost, farmakokinetika, biodistribucija, površinska kemija, oblika itn. Med najbolj pomembne lastnosti, ki vplivajo na citotoksičnost nanodelcev sodijo sestava, oblika in preveleka nanodelcev. Zato so prav spremembe v površini nanodelcev ključno orodje pri zmanjšanju toksičnega vpliva. Za magnetne nosilce s potencialom dostavnega vektorja zdravil je potrebno pred začetkom kliničnih testiranj analizirati sledeče:

- toksičnost (akutna, subkutana, kronična, teratogenost in mutagenost) v celičnih in živalskih modelih,
- hematokompatibilnost,
- biorazgradljivost (kadarkoli je možno),
- imunogenost,
- farmakokinetika (distribucija po telesu, metabolizem, biodostopnost, izločanje, organsko-specifično toksičnost) (Arruebo in sod., 2007; Neuberger in sod., 2005).

2.2.1 Vnos, biodistribucija in čiščenje magnetnih nanodelcev

Večinoma se tukti vneseni v telo aktivno izločajo preko mononuklearnega fagocitnega sistema oz. RES, ki posledično predstavlja prvo obrambno linijo imunskega sistema. Sistem obsega makrofage razporejene v mrežo in postavljene na strateških točkah v organizmu. Večinoma jih najdemo v kostnem mozgu, kjer nastajajo, v krvi krožijo kot monociti, v pljučih kot alveoli, v vranici ter še posebej v jetrih kot Kupfferjeve celice. Proses čiščenja krvi je navadno sprožen z opsonizacijo, kjer se cirkulirajoči proteini (različni podrazredi imunoglobulinov, elementi krvi, fibronektin) adsorbirajo na površino delcev (slika 4). Tako označene nanodelce potem prepozna specifični receptorji. Posledično se internalizirajo z endocitozo in akumulirajo v lizosomih/endosomih, kjer jih sčasoma razgradijo proteolitični encimi.



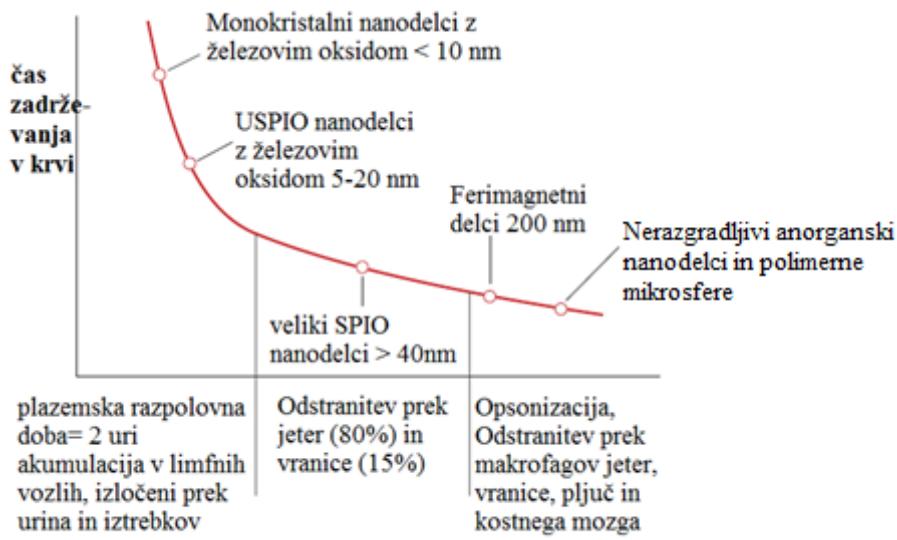
Slika 4: Mehanizmi uporabljeni pri retikuloendotelijski sistem za prepoznavanje in odstranitev nanodelcev v krvni (Duguet in sod., 2010)

2.1.3.3 Usoda nanodelcev v telesu

Distribucija nanodelcev in njihovih tovorov skozi telo je odvisna od številnih fizikalno-kemijskih lastnosti: velikosti delcev, toksičnosti, površinskega naboja, površinske hidrofobnosti, sposobnosti adsorpcije proteinov, nalaganja zdravil in sprostitevne kinetike, stabilnosti, degeneracije nosilnih sistemov, poroznosti, specifičnih površinskih karakteristik, gostote, kristaliničnosti, in molekulske teže. Predvsem je usoda magnetnih nanodelcev močno odvisna od doze in načina vnosa. Najpogostejši načini vnosa so: intravenozno, subkutano in peroralno (Arruebo in sod., 2007). Slednji načini vnosa nanodelcev so prikazani na sliki 6, vključno z opisom njihovih prednosti in slabosti.

2.1.3.4 Intravenozni vnos delcev

Splošno pravilo pri intravenoznem vnosu magnetnih nanodelcev je, da je nosilec netoksičen, neimunogen in tolikšne velikosti, da se izogne embolizaciji kapilarnih kanalov. Po vstopu nanodelcev v krvni obtok poteče proces opsonizacije in zažene retikulo-endotelijski sistemski odziv. Cirkulirajoči fagoci očistijo nanodelce iz jeter, vranice in kostnega mozga, kjer rezidenčne celice (v jetrih so to Kupfferjeve celice) zajamejo nanodelce pred razgradnjo. Odvisno od biorazgradljivosti in velikosti, so nekateri nanodelci prisotni v lizosomalnih veziklih Kupfferjevih celic in posledično vključeni v žolč za nadaljnje izločanje preko gastrointestinalnega trakta (GIT). Nanodelci se lahko izločijo tudi preko filtracije v ledvicah. Tipična zaključna biodistribucija metabolizma magnetnih nanodelcev je: 80–90 % v jetrih, 5–8 % v vranici in 1–2 % v kostnem mozgu. Na splošno se delci večji od 200 nm vežejo v vranici preko mehanske filtracije, ki ji sledi fagocitoza (makrofagi in dendritske celice), medtem ko se delce manjše od 10 nm hitro odstranijo s pomočjo endocitoze (B in T limfociti) in ledvičnim očiščenjem. Tako velja, da razpolovna doba delcev v krvni plazmi pada sorazmerno z naraščanjem velikosti delcev (Arruebo in sod., 2007; Shabayev in sod., 2009).



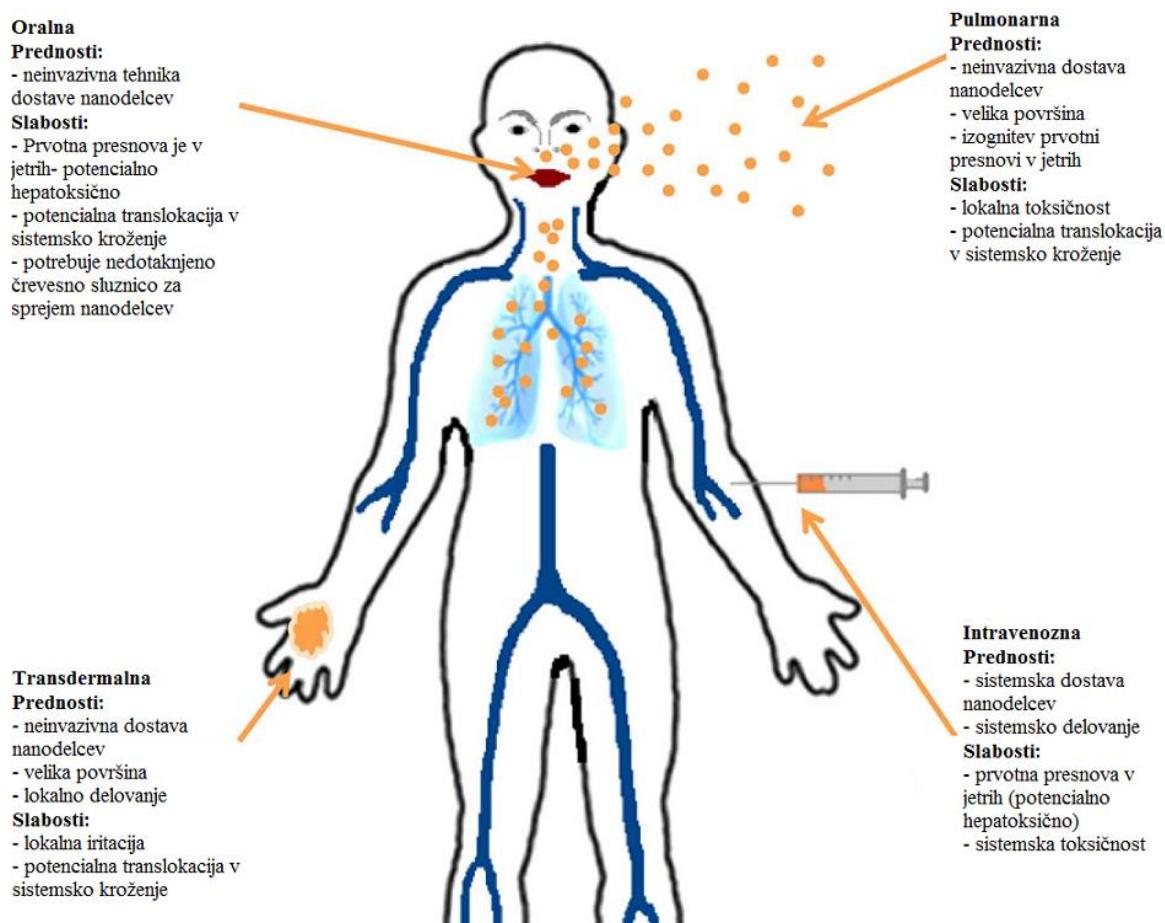
Slika 5: Kvalitativni diagram prikaza razvoja časa zadrževanja v krvi glede na velikost delcev (Arruebo in sod., 2007)

2.1.3.5 Subkutani ali intratumorski vnos

Vodotopne molekule se hitro absorbirajo skozi stene krvnih kapilar in preidejo v krvni obtok, medtem ko se lokalno injicirani delci infiltrirajo v vmesne prostore okoli mesta aplikacije in postopoma absorbirajo v limfatični kapilarni sistem. Zaradi tega so lahko subkutano ali lokalno injicirani nanodelci uporabni kot orodje za kemoterapijo pri limfatičnih tumorjih, čeprav se ta možnost redko uporablja v klinični praksi, saj ni uporabna pri ciljanju malignih tumorjev (Arruebo in sod., 2007).

2.1.3.6 Peroralni vnos

Glavni problem peroralnega vnosa predstavljajo GIT zaradi nizkega pH v želodcu in proteolitičnih encimov, nizka absorbcija, začetna presnova prek jeter in močno povečana začetna koncentracija zdravil. Feng in Chien (2003) sta opisala usodo kemoterapevtskih nanodelcev pri peroralni dostavi. Ugotovila sta, da se lahko delci pod 5 μm odstranijo prek limfatične drenaže, medtem ko lahko delci do 500 nm preidejo membrano epitelnih celic s pomočjo endocitoze delci manjši od 50 nm pa lahko dosežejo paracelični prehod med črevesnimi epitelnimi celicami (Arruebo in sod., 2007).



Slika 6: Prikaz štirih različnih poti vnosa nanodelcev z njihovimi prednostmi in slabostmi (Yildirimer in sod., 2011)

2.3 LIPOSOMI

Liposomi so samo-sestavljoče se strukture s sferično obliko, sestavljene iz lipidnega dvo-sloja, ki v celoti obdaja hidrofilno jedro, sposobno enkapsulacije in dostave različnih hidrofilnih in hidrofobnih biomolekul. Velikost veziklov lahko obsega od nekaj nanometrov do nekaj mikrometrov, odvisno od tehnike priprave. Pri injiciranju v organizem so liposomi zanimivi nosilni kandidati za dostavo inteligentnih nanomaterialov zaradi "nano-prostora" v njihovem hidrofilnem jedru (Lehner in sod., 2013; Petros in DeSimone, 2010).

2.3.1 Magnetni liposomi

Magnetni liposomi (magnetni nanodelci enkapsulirani znotraj liposomov) so vsestranski dostavni sistem zaradi njihove biokompatibilnosti, kemijske funkcionalnosti in njihovega potenciala pri kombinaciji dostave zdravil in hipertermičnem zdravljenju raka (Pradhan in sod., 2010).

2.3.2 Karakterizacija feriliposomov

Glavni omejujoč faktor pri uporabi magnetnih nanodelcev *in vivo* je njihova nizka koloidna stabilnost. Ferimagnetni nanodelci z železovim oksidom (FMIO) imajo negativen zeta površinski potencial $27,9+4,3$ mV pri pH 7,4 in 37°C . Njihova suspenzija ima visoko koloidno stabilnost tako pri fizioloških pogojih kot pri ostalih pH vrednostih in ionskih jakostih. Magnetni nanodelci enkapsulirani v fosfolipidni dvosloj, ki tvorijo feriliposome naj bi imeli precejšne strukturne in farmakokinetske prednosti pri dostavi zdravil. Zahvaljujoč njihovi zmožnosti, da enkapsulirajo tako hidrofobne kot hidrofilne terapevtike, preprečujejo lokalno redčenje zdravil in omejujejo njihove interakcije z okoljem, ter tako omogočajo zmanjšanje doze terapevtikov in njihovo toksičnost. Zaradi njihove velikosti, hidrofobnih in hidrofilnih lastnosti, ter biokompatibilnosti sistem feriliposomov omogoča sočasno enkapsulacijo FMIO nanodelcev z drugimi substancami, kot so zdravila ali DNA in njihovo usmerjeno dostavo v organizem (Mikhaylov in sod., 2011).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Pri raziskovalnem delu smo uporabili naslednje materiale:

- cianoakrilatno lepilo Loctite (Henkel, Slovenija),
- plastične in steklene čaše,
- magneti,
- formalin 4 %,
- razkužilo Spitaderm (Ecolab, ZDA),
- Fosfatni pufer z NaCl (PBS),
- aceton,
- 2 ml serumske epruvete (BD, ZDA),
- absolutni etanol (Merck KgaA, ZDA),
- destilirana voda,
- Ksilol,
- Canada Balsam (Sigma-Aldrich, Nemčija),
- Kalijev heksacianoferat (II) trihidrat (Sigma-aldrich, Nemčija),
- SPIO Fe_3O_4 nanodelci,
- Microm HM-315 (Thermo scientific, Nemčija),
- grelnik vode- Microm SB 80 (Thermo scientific, Nemčija),
- objektna stekelca 75 x 25 mm (Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Nemčija),
- odstranjevalec parafina Paragard (TBS inc., ZDA),
- brezprašna komora (Köttermann systemlabor, Nemčija),
- krovna stekelca 60 x 24 mm,
- HCl 37 % p.a. (AppliChem GmbH, Nemčija),
- barvilo Eozin (Sigma-Aldrich, Nemčija): Pripravili smo delovno raztopino, 60 ml založne raztopine + 140 ml dH₂O. Prefiltriramo in dodamo 1 ml ocetne kisline.
- barvilo hematoksilin (Sigma-Aldrich, Nemčija): Pripravili smo delovno raztopino, 50 ml založne raztopine in 150 ml H₂O. Prefiltriramo.
- barvilo Azocarmin,
- procesor za parafiniranje vzorcev SHANDON Citadel 1000,
- Thermo scientific MICROM EC 350-1/2,
- kirurške škarje,
- kirurška pinceta,
- injekcijska brizga 5ml,
- injekcijska igla 0,45 x 16 mm (BD Microlance, ZDA),
- injekcija brizga 1ml z iglo (BD Microlance, ZDA),
- falkonke 50 ml.

3.2 POSKUSNE ŽIVALI

Poskusne živali miši seva FVB/N smo vzredili na Inštitutu Jožef Stefan leta 2012 v nadzorovanem okolju za rejo živali pri temperaturi 21 ± 2 °C, relativni vlažnosti 50 ± 5 % in svetlobnem ciklusu 16 ur svetlobe in 8 ur teme. Miši smo označevali z metodo luknjanja ušes. Živali smo hranili s standardno hrano za miši v obliki peletov (Altromin, Nemčija); imele so dostop do hrane in vode *ad libitum*. V poskusu smo uporabili 40 miši, ki smo jih razdelili v 5 skupin; v vsaki skupini so bile 4 samice in 4 samci, stari od 9 do 10 tednov.

Preglednica 3: Prikaz razvrstitev miši po skupinah

Spol	Starost v tednih	Povprečna teža	mg/kg miši	Spol	Starost v tednih	Povprečna teža	mg/kg miši
Nanodelci v pufru (50mg/kg)							
M	10,0	27,5 g	1,10 ml	F	10,0	22,2 g	0,89 ml
M	10,0	29,9 g	1,20 ml	F	10,0	20,4 g	0,82 ml
M	10,0	27,4 g	1,10 ml	F	9,6	19,6 g	0,78 ml
M	9,6	24,7 g	0,99 ml	F	9,6	21,7 g	0,87 ml
Nanodelci v liposomih							
M	10,0	29,3 g	1,17 ml	F	10,0	23,0 g	0,92 ml
M	10,0	29,6 g	1,20 ml	F	10,0	22,1 g	0,88 ml
M	9,6	26,5 g	1,06 ml	F	9,6	21,9 g	0,88 ml
M	9,6	28,8 g	1,15 ml	F	9,6	23,7 g	0,95 ml
Nanodelci v liposomih in ciljanje							
M	10,0	28,3 g	1,13 ml	F	10,0	21,9 g	0,88 ml
M	10,0	28,6 g	1,14 ml	F	10,0	22,4 g	0,90 ml
M	9,6	26,6 g	1,06 ml	F	9,6	20,6 g	0,82 ml
M	9,6	28,7 g	1,15 ml	F	9,6	21,2 g	0,85 ml
Pufer za nanodelce							
M	10,0	27,8 g	1,11 ml	F	10,0	23,0 g	0,92 ml
M	10,0	32,3 g	1,30 ml	F	10,0	23,0 g	0,92 ml
M	9,6	27,8 g	1,11 ml	F	10,0	25,2 g	1,01 ml
M	9,6	29,0 g	1,16 ml	F	9,6	20,3 g	0,81 ml
Kontrola (brez pufra)							
M	9,4	30,2 g		F	9,4	23,0 g	
M	9,4	28,4 g		F	9,4	21,5 g	
M	9,0	25,2 g		F	9,4	20,2 g	
M	9,0	25,9 g		F	9,4	23,1 g	

Legenda: Oznaka M (ang. male) predstavlja moški spol in oznaka F (ang. female) ženski spol.

3.3 METODE DELA

3.3.1 Začetek poskusov

Pred aplikacijo nanodelcev smo miši stehtali in aplicirali 50 mg/kg nanodelcev vsak dan 4 dni zaporedoma. Po aplikaciji smo miši vsak dan opazovali. 3. skupini miši smo za 24 ur po aplikaciji pritrdirili magnet.

3.3.2 Odvzem krvi in osamitev organov

Po končanem poskusu smo miši usmrtili in iz srca odvzeli 500 µl krvi. Kri smo shranili v 2 ml serumskih epruvetah (BD, ZDA) in močno stresali 30 sekund. Tako pripravljeno kri smo nato centrifugirali 10 min pri 1300 relativne centrifugalne sile (RCF) in 4 °C. S tem postopkom smo pridobili krvno plazmo. Živalim smo odvzeli tudi jetra, pljuča, srce, vranico, ledvica, nadledvično žlezo ter limfne vozle in del dvanajstnika za nadaljnje histopatološke analize. Del vsakega organa smo shranili v 4 % raztopini formaldehida, drugi del pa smo zamrznili v tekočem dušiku ter shranili pri -80 °C.

3.3.3 Biokemijska analiza krvi

Biokemijsko analizo krvi so opravili na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijsko v UKC Ljubljana. Biokemijske preiskave so analizirali na aparaturi Olympus AU 400 (Beckman Coulter) z reagenti Beckman Coulter OSR. Opravili smo preiskave za naslednje snovi:

- **sečnina:** kinetični ultravijolični (UV) test (ureaza, glutamat dehidrogenaza),
- **kreatinin:** kinetični barvni test – metoda Jaffe (s pikrinsko kislino v alkalnem mediju), izotopsko dilucijska masno spektrometrična (IDMS) sledljivost,
- **alkalna fosfataza:** kinetični barvni test (mednarodna federacija za klinično kemijo (IFCC)),
- **aspartat aminotransferaza (AST):** kinetični UV test (IFCC),
- **alanin aminotransferaza (ALT):** kinetični UV test (IFCC),
- **α-amilaza:** kinetični barvni test EPS (IFCC),
- **lipaza:** kinetični barvni test,
- **laktat dehidrogenaza (LDH):** kinetični UV test (IFCC, laktat v piruvat).

Elektroforeza izoencimov kreatin kinaze (CK) je bila izvedena na avtomatskem sistemu Sebia (France), s testnim kompletom Sebia:

- **S-CK –izo→elektroforeza na agaroznem gelu (Sebia hydragel iso-CK).**

Aparat: avtomatski sistem Hydrasis (Sebia France).

3.3.4 Priprava organov

Po 24 urah smo organe iz 4 % raztopine formaldehida prenesli v plastične kasete (slika 8) za pripravo organov in jih vstavili v tkivni procesor (Shandon CITADEL 1000, ZDA) (slika 7).



Slika 7: Prikaz tkivnega procesorja Shandon CITADEL 1000 lociranega na IJS



Slika 8: Kasete za pripravo organov (Tissue..., 2010)

Preglednica 4: Posamezni koraki priprave organov ter čas trajanja korakov v tkivnem procesorju
Posamezen korak traja 1 uro

KORAK	Reagent
1	70 % etanol
2	70 % etanol
3	80 % etanol
4	95 % etanol
5	95 % etanol
6	absolutni etanol
7	absolutni etanol
8	absolutni etanol
9	ksilol
10	ksilol
11	parafin
12	parafin

Po končani obdelavi organov smo začeli s pripravo parafinskih kock organov v aparaturi MICROM EC 350-1 (Thermo scientific, Anglija) (slika 9). Organ smo vstavili v segret kovinski kalup ter ga prelili s parafinom (Leica Biosystems, Nemčija) segretim na 62 °C. Nato smo parafinske kocke ohladili na hladilni plošči MICROM EC 350-2 (Thermo scientific, Anglija) ter jih do nadaljnega shranili v skrinji pri temperaturi -20 °C.



Slika 9: Prikaz mikrotoma MICROM EC 350-1/2 za obdelavo organov s parafinom (Thermo..., 2010)

3.3.5 Priprava histoloških rezin

Za pripravo histoloških rezin smo uporabili mikrotom MICROM HM-315 (Thermo scientific, Nemčija) (slika 10). Narezali smo 5 µm debele rezine, ki smo jih prenesli v posodo z dH₂O, ogreto na 40 °C. Po 2 rezini organa smo prenesli na posamezno objektno stekelce ter posušili pri 40 °C na grelni plošči (Hotplate Thermo scientific, Anglija).



Slika 10: Prikaz mikrotoma MICROM HM – 315 na IJS

3.3.6 Protokol barvanja histoloških rezin z eozinom in hematoksilinom:

Protokol barvanja histoloških rezin je sledeč:

- čiščenje v ksilolu (4 x 5 min),
- rehidracija v absolutnem etanolu (1 min),
- v absolutnem etanolu (1 min),
- v 96 % etanolu (1 min),
- v 70 % etanolu (1 min),
- v 70 % etanolu (1 min),
- v 50 % etanolu (1 min),
- v 50 % etanolu (1 min),
- in v dH₂O (1 min),
- barvanje s hematoksilinom (4-5 min),
- spiranje pod tekočo vodo (10-15 min),
- barvanje v eozinu (1 min),
- potopitev v 50 % etanolu,
- dehidracija v 50 % etanolu (1 min),
- v 50 % etanolu (1 min),
- v 70 % etanolu (1 min),
- v 70 % etanolu (1 min),
- v 96 % etanolu (1 min),
- v absolutnem etanolu (1 min),
- v absolutnem etanolu (1 min),
- čiščenje v ksilolu (4x 5 min).

Po končanem barvanju smo na objektno steklo dali 1-2 kapljici Canada balsam (Sigma-Aldrich, ZDA) in pokrili s krovnim stekelcem.

3.3.7 Barvanje histoloških rezin po Perl's Prussian Blue

Barvanje po Perl's Prussian Blue uporabljamo za detekcijo železa. Železo reagira s kalijevim heksacianoferatom in tvori železov ferocianid. To je netopna, modra snov poznana kot "Prussian modra". Pri delu se izogibamo materialom in posodam, ki vsebujejo železo, kar bi lahko kontaminiralo tkiva (Perl's ..., 2011).

Kemijska reakcija:



Priprava delovne raztopine

Združitev raztopine A in raztopine B v enakem razmerju.

Delovno raztopino smo pripravili tik pred uporabo.

Raztopina A	Raztopina B
2 g kalijev heksacianoferat	2 mL 37 % a.d. klorovodikova raztopina
100 mL dH ₂ O	100 mL dH ₂ O

Protokol dela:

- čiščenje v ksilolu (4 x 5 min),
- rehidracija v padajočih koncentracijah alkoholov (absolutnem etanolu (2 x 1 min), 96 % etanolu (1 min), 70 % etanolu (2 x 1 min), 50 % etanolu (2 x 1 min)),
- rehidracija v dH₂O (1 min),
- barvanje v »Perl's Prussian blue« (25-30 min),
- spiranjev dH₂O ter pod tekočo vodo,
- barvanje v Azocarminu (10-15 min),
- splakovanje pod tekočo vodo (3-4x),
- dehidratacija vzorcev v naraščajočih koncentracijah alkoholov (50 % etanolu (2x 1 min), 70 % etanolu (2 x 1 min), 96 % etanolu (1 min), absolutnem etanolu (2 x 1 min)),
- čiščenje v ksilolu (4x 5 min).

Po končanem barvanju smo na objektno steklo dali 1-2 kapljici Canada balsam in pokrili s krovnim stekelcem.

3.4 MIKROSKOPIJA

Preparate organov smo pregledali z mikroskopom (Olympus ..., 2012) povezanim s kamerico (Olympus U-LH100L, Nemčija) (oboje je prikazano na sliki 11). Preparate smo slikali s pomočjo programa Cell^f za zajem in obdelavo slik.



Slika 11: Prikaz mikroskopa Olympus IX81 (Olympus ..., 2012)

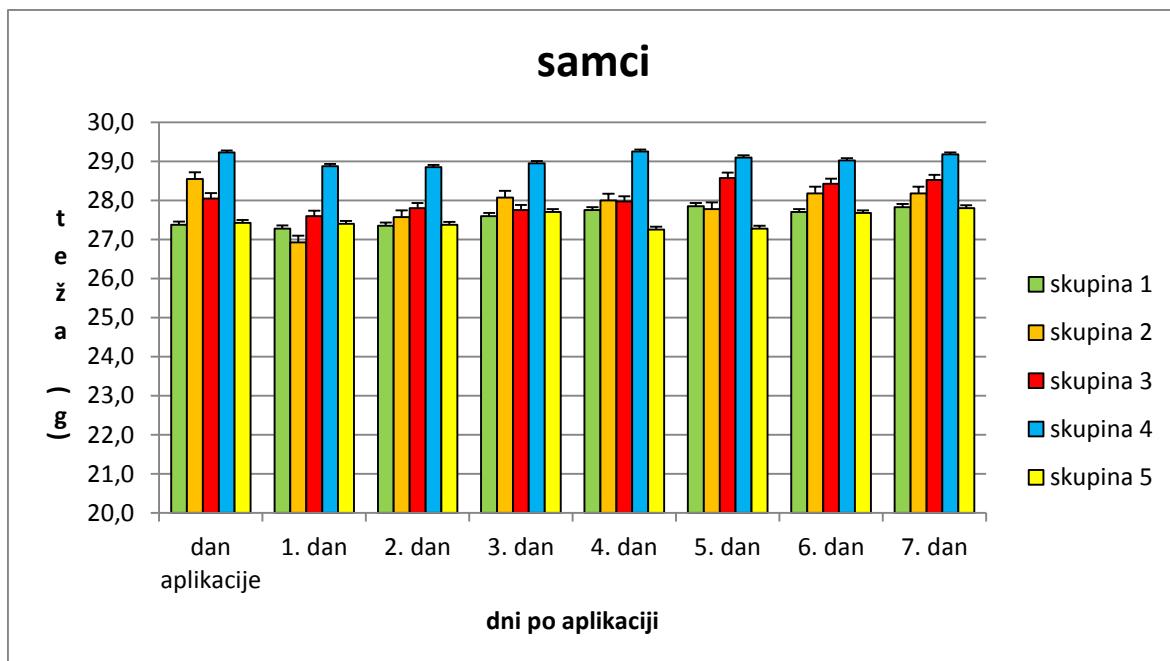
4 REZULTATI

Naše eksperimentalno delo je bilo razdeljeno na dva dela. Prvi del je poleg vsakodnevnega odčitavanja telesne teže miši vključeval še opazovanje zunanjih sprememb v obdobju enega tedna po aplikaciji. Drugi del je zajemal analizo krvi in histopatološki pregled organov.

4.1 OPAZOVANJE MIŠI MED POSKUSOM

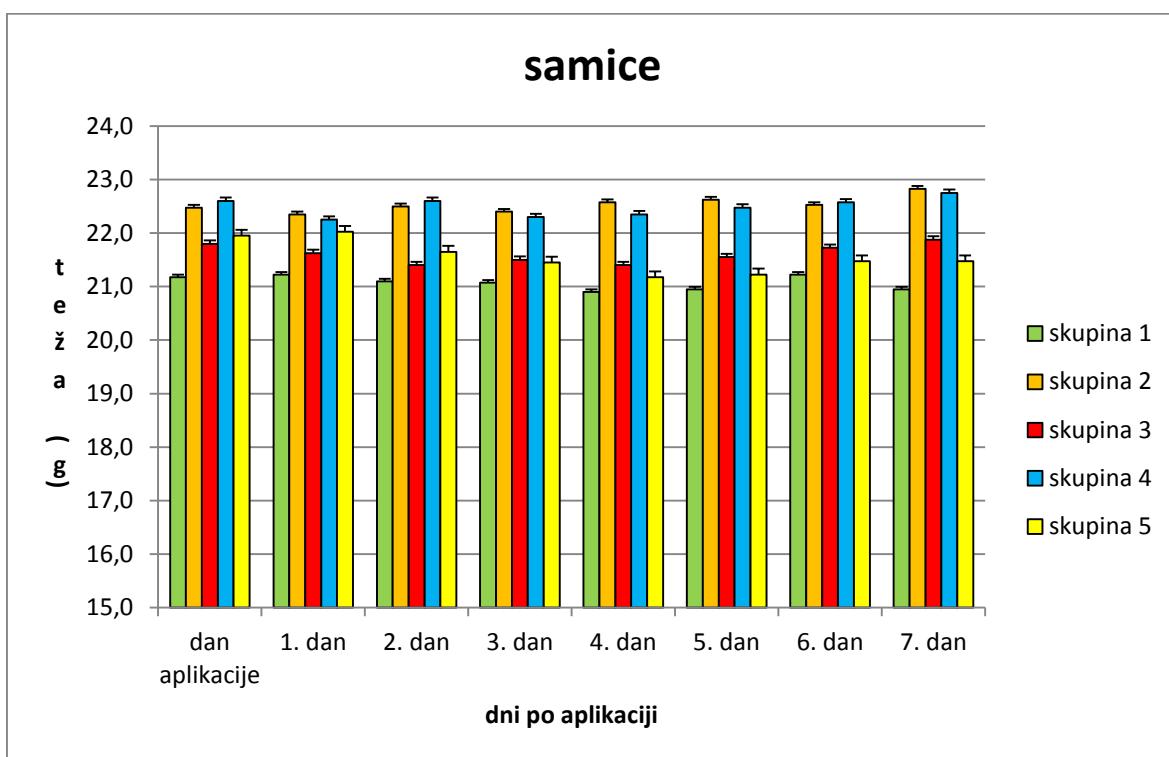
Pri študijah ugotavljanja toksičnosti je potrebno opazovati zunanje spremembe miši zaradi morebitnih primerov smrti. Miši med izvajanjem poskusa niso kazale nobenih znakov, ki bi nakazovali toksičnost (diareja, bruhanje, zmanjšana aktivnost, spremembe kožuha). Poskus so preživele vse miši.

4.1.1 Spremembe v telesni teži pri vsaki skupini



Slika 12: Prikaz povprečne teže samcev posameznih skupin glede na število dni po aplikaciji

Legenda: (Skupina 1) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina 2) nanodelci v liposomih, (skupina 3) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina 4) pufer za nanodelce, (skupina 5) kontrola (brez pufra)



Slika 13: Prikaz povprečne teže samic posameznih skupin glede na število dni po aplikaciji

Legenda: (Skupina 1) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina 2) nanodelci v liposomih, (skupina 3) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina 4) pufer za nanodelce, (skupina 5) kontrola (brez pufra)

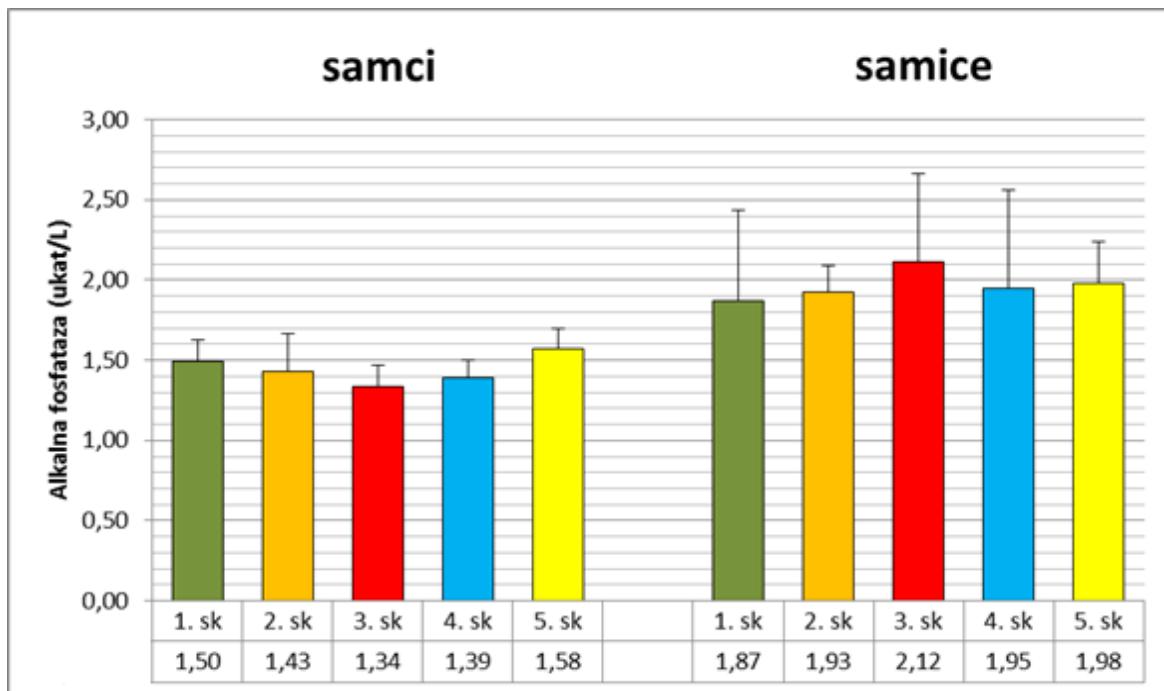
Miši smo dnevno tehtali pred aplikacijo nanodelcev. Na slikah 9 in 10 so grafično prikazane spremembe telesne teže za vsako od 5-ih testnih skupin pri samcih in samicah. Iz rezultatov smo ugotovili, da je povprečna telesna teža posameznih skupin pri samcih in samicah rahlo upadla 1. dan po aplikaciji nanodelcev ter nato postopoma naraščala do začetnih vrednosti.

4.2 BIOKEMIJSKA ANALIZA KRVI

Po evtanaziji smo odvzete vzorce krvi poslali na biokemijsko analizo.

Preglednica 5: Referenčne vrednosti za biokemijsko analizo krvi miši (Mouse ..., 2013)

Vrsta testa	Referenčne vrednosti	µkat/l
Sečnina	6,89-31,4 mmol/l	
Kreatinin	24,6-33,9 µmol/l	
Alkalna fosfataza - ALP	31-249 U/l	0,52-4,15
Aspartat aminotransferaza - AST	71-236 U/l	1,18-3,93
Alanin aminotransferaza - ALT	28-114 U/l	0,47-1,90
Amilaza	2496-2694 U/l	41,6-44,9
Pankreasna lipaza	900-1200 U/l	15-20
Laktat dehidrogenaza - LDH	268-873 U/l	4,47-14,55
MB Izoforma fosfokreatinin kinaze	107-130 U/l	1,78-2,17

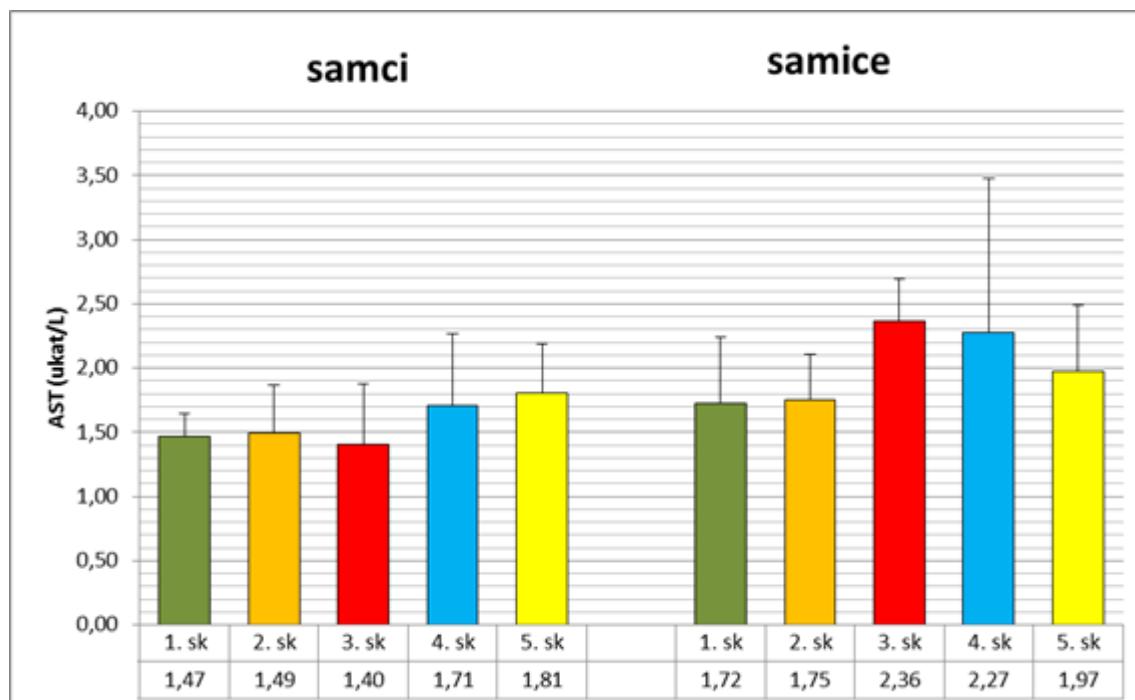


Slika 14: Prikaz aktivnosti alkalne fosfataze v µkat/l

Primerjava povprečnih vrednosti med posameznimi skupinami in spoloma.

Legenda: (skupina 1) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina 2) nanodelci v liposomih, (skupina 3) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina 4) pufer za nanodelce, (skupina 5) kontrola (brez pufra)

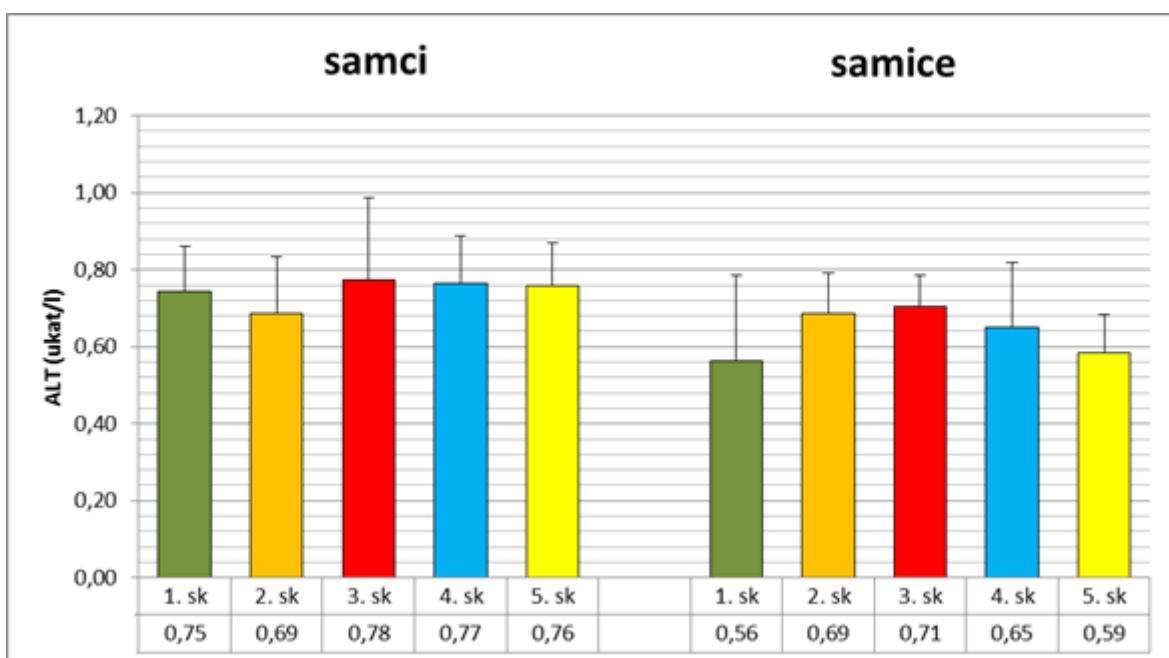
Alkalna fosfataza ali ALP nastaja v jetrih, kar nakazuje na njihovo delovanje in v manjših količinah v kosteh, ledvicah in črevesju. Iz rezultatov ALP testa smo ugotovili, da so vse vrednosti znotraj referenčnih vrednosti. Statistična obdelava podatkov ne kaže bistvenih razlik med skupinami ($p < 0,05$).



Slika 15: Prikaz aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST) v $\mu\text{kat/l}$
Primerjava povprečnih vrednosti med posameznimi skupinami in spoloma

Legenda: (**Skupina 1**) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (**skupina 2**) nanodelci v liposomih, (**skupina 3**) nanodelci v liposomih in ciljanje, (**skupina 4**) pufer za nanodelce, (**skupina 5**) kontrola (brez pufra)

Test merjenja aktivnosti aspartat aminotransferaze (AST) nam pomaga pri ugotavljanju poškodb jeter. Encim se navadno nahaja v eritrocitih, jetrih, srcu, mišičnem tkivu, trebušni slinavki ter ledvicah. Iz rezultatov AST testa smo ugotovili, da so vse vrednosti znotraj referenčnih vrednosti. Statistična obdelava podatkov ne kaže bistvenih razlik med skupinami ($p < 0,05$).

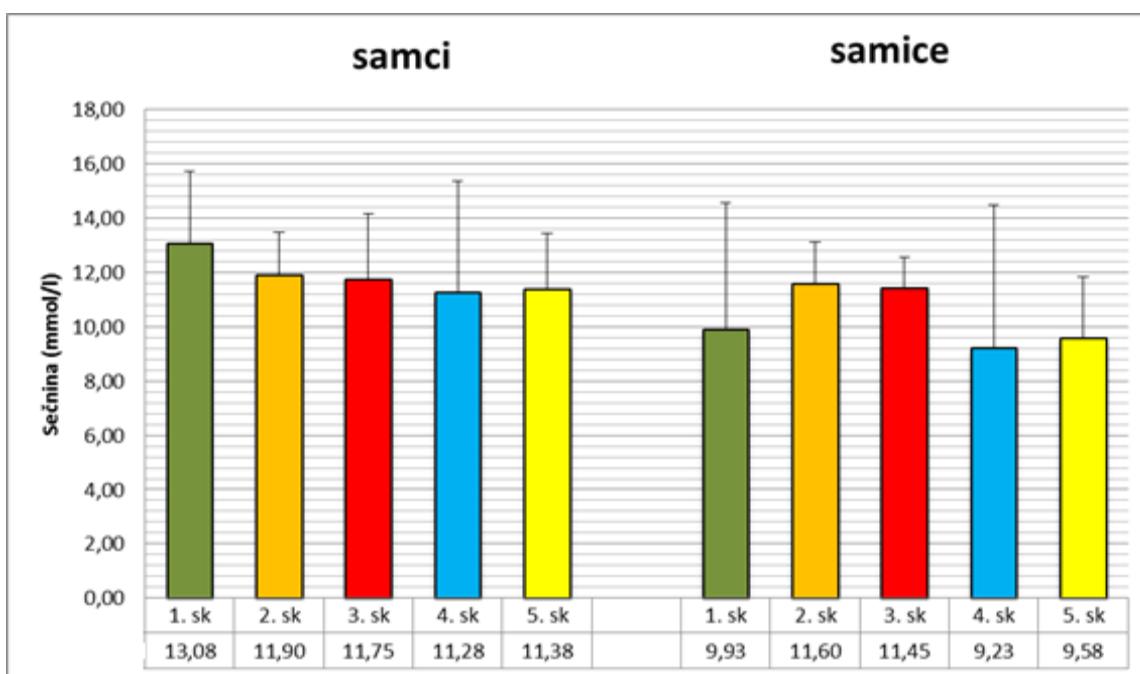


Slika 16: Prikaz aktivnosti alanin aminotransferaze (ALT) v $\mu\text{kat/l}$

Primerjava povprečnih vrednosti med posameznimi skupinami in spoloma

Legenda: (skupina 1) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina 2) nanodelci v liposomih, (skupina 3) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina 4) pufer za nanodelce, (skupina 5) kontrola (brez pufra)

Tudi aktivnost alanin aminotranferaze (ALT) je pokazatelj morebitnih poškodb jeter. V telesu jo najdemo večinoma v jetrih ter v manjših količinah v ledvicah, srcu, mišicah ter trebušni slinavki. Iz rezultatov ALT testa smo ugotovili, da so vse vrednosti znotraj referenčnih vrednosti. Statistična obdelava podatkov ne kaže bistvenih razlik med skupinami ($p < 0,05$).

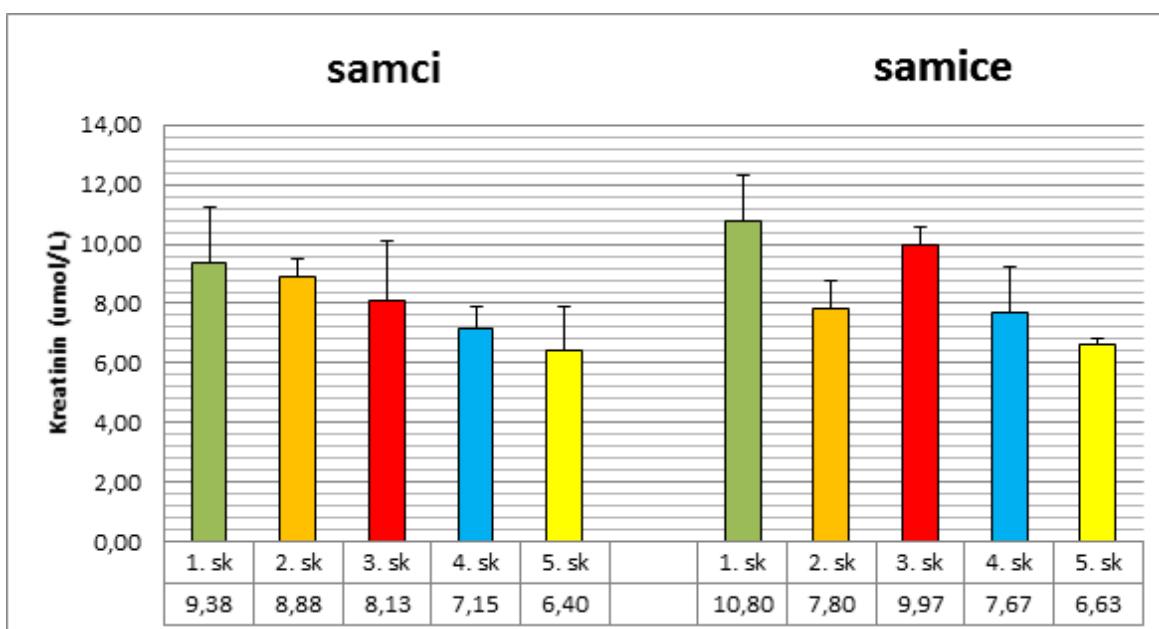


Slika 17: Prikaz koncentracije dušika v obliki sečnine (BUN) (mmol/l)

Primerjava med posameznimi skupinami in spoloma

Legenda: (**Skupina 1**) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (**skupina 2**) nanodelci v liposomih, (**skupina 3**) nanodelci v liposomih in ciljanje, (**skupina 4**) pufer za nanodelce, (**skupina 5**) kontrola (brez pufra)

Koncentracija dušika v obliki sečnine (BUN) v krvi je indikator delovanja ledvic. Iz slike 17 je razvidno, da so vse vrednosti iz skupin znotraj referenčnih vrednosti, medtem ko imajo samci rahlo višje vrednosti BUN v primerjavi s samicami. Statistična obdelava podatkov ne kaže bistvenih razlik med skupinami ($p < 0,05$).

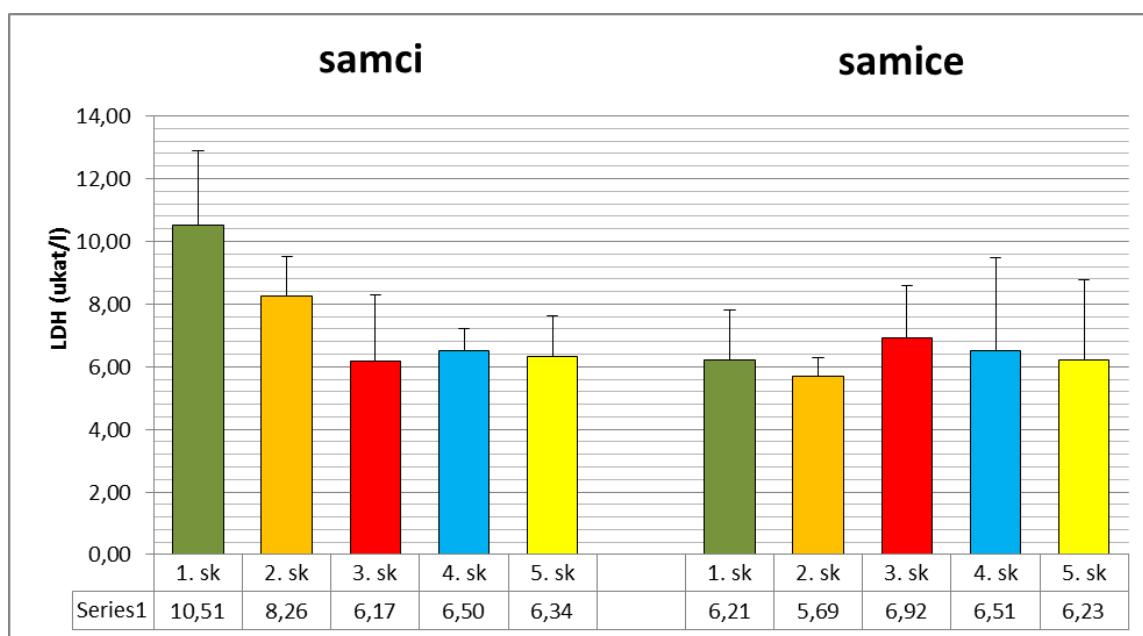


Slika 18: Prikaz koncentracije kreatinina ($\mu\text{mol/l}$)

Primerjava povprečnih vrednosti med posameznimi skupinami in spoloma.

Legenda: (skupina 1) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina 2) nanodelci v liposomih, (skupina 3) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina 4) pufer za nanodelce, (skupina 5) kontrola (brez pufra)

Kreatinin test meri stopnjo odpadnega produkta kreatinina v krvi in urinu in nam pove o delovanju ledvic. Visok nivo kreatinina kaže na nepravilno delovanje ledvic in je povezan s količino mišičnega tkiva v telesu, zaradi česar je nivo kreatinina navadno višja pri samcih kot pri samicah. Na sliki 18 vidimo, da se vrednosti med samci in samicami bistveno razlikujejo in odstopajo od kontrolne skupine. Statistična obdelava podatkov kaže na bistvene razlike med skupinami ($p > 0,05$).

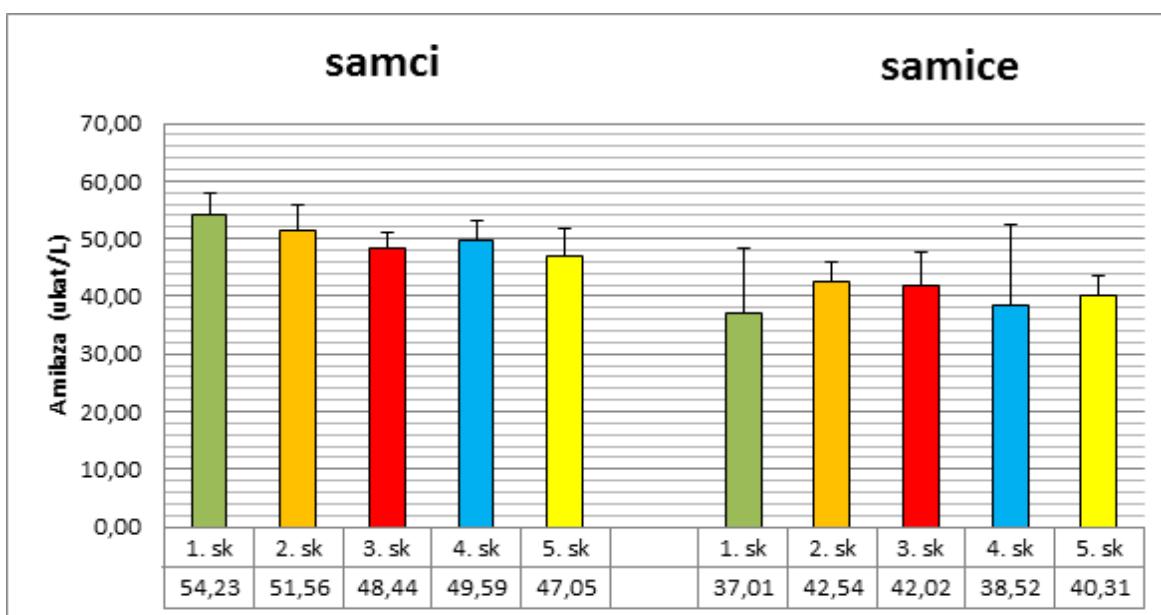


Slika 19: Prikaz aktivnosti laktat dehidrogenaze v $\mu\text{kat/l}$

Primerjava povprečnih vrednosti med posameznimi skupinami in spoloma.

Legenda: (**Skupina 1**) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (**skupina 2**) nanodelci v liposomih, (**skupina 3**) nanodelci v liposomih in ciljanje, (**skupina 4**) pufer za nanodelce, (**skupina 5**) kontrola (brez pufra)

Aktivnost laktat dehidrogenaze (LDH) je pokazatelj obstoja in resnosti akutnih ter kroničnih tkivnih poškodb. Iz rezultatov testa ugotavljanja aktivnosti LDH smo ugotovili, da so vse vrednosti znotraj referenčnih vrednosti. Statistična obdelava podatkov ne kaže bistvenih razlik med skupinami ($p < 0,05$).

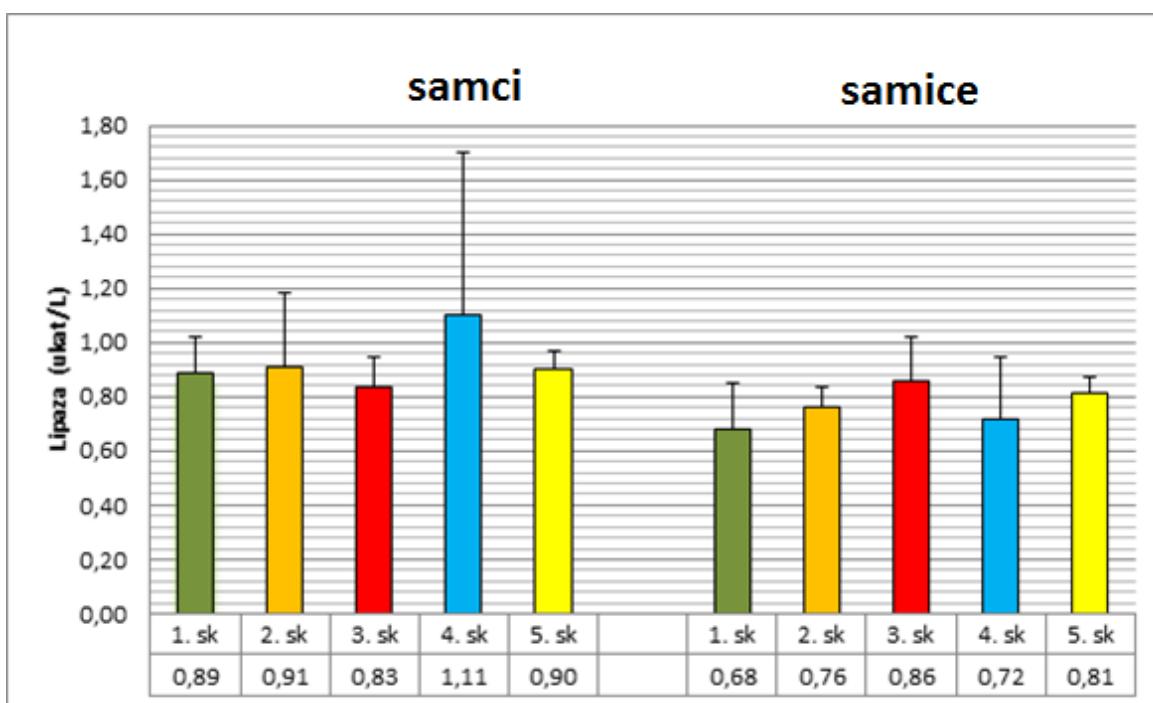


Slika 20: Prikaz aktivnosti amilaze v $\mu\text{kat/l}$

Primerjava povprečnih vrednosti med posameznimi skupinami in spoloma.

Legenda: (**Skupina 1**) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (**skupina 2**) nanodelci v liposomih, (**skupina 3**) nanodelci v liposomih in ciljanje, (**skupina 4**) pufer za nanodelce, (**skupina 5**) kontrola (brez pufra)

Aktivnost amilaze je pokazatelj delovanja vranice. Samci imajo rahlo višje vrednosti v primerjavi s samicami. Vse vrednosti so znotraj referenčnih vrednosti. Statistična obdelava podatkov ne kaže bistvenih razlik med skupinami ($p < 0,05$).

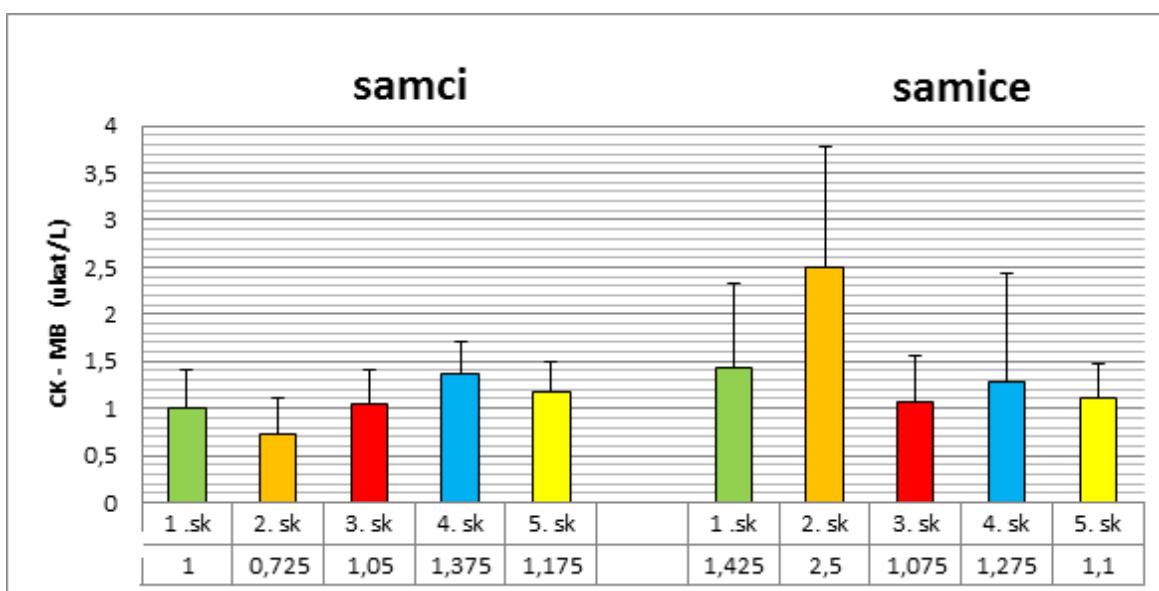


Slika 21: Prikaz aktivnosti lipaze v $\mu\text{kat/l}$

Primerjava povprečnih vrednosti med posameznimi skupinami in spoloma.

Legenda: (Skupina 1) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina 2) nanodelci v liposomih, (skupina 3) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina 4) pufer za nanodelce, (skupina 5) kontrola (brez pufra)

Test aktivnosti lipaze je pokazatelj delovanja trebušne slinavke. Vse vrednosti so znotraj referenčnih vrednosti. Statistična obdelava podatkov ne kaže bistvenih razlik med skupinami ($p < 0,05$).



Slika 22: Prikaz aktivnosti fosfokreatin kinaze (MB) v $\mu\text{kat/l}$

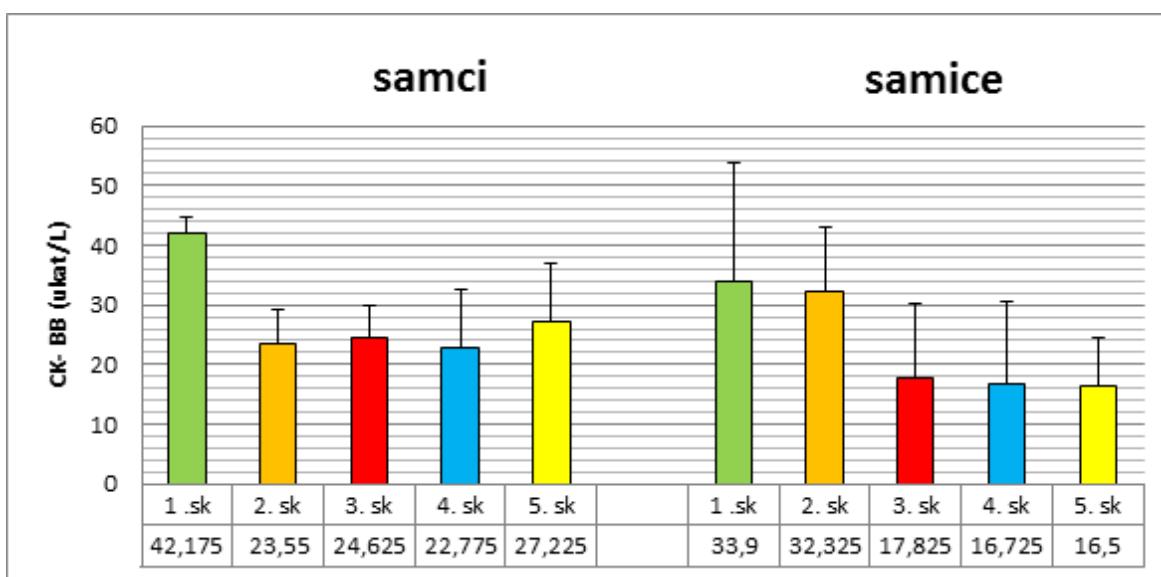
Primerjava povprečnih vrednosti med posameznimi skupinami in spoloma.

Legenda: (skupina 1) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina 2) nanodelci v liposomih, (skupina 3) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina 4) pufer za nanodelce, (skupina 5) kontrola (brez pufra)

Kreatin kinaza je encim, ki je dober pokazatelj morebitnih poškodb mišic. Obstaja v treh izoenzimskih oblikah:

- CK-MB je prisoten v srcu in naraste ob poškodbah srčnih mišic,
- CK-MM je prisoten v skeletnih mišicah in srcu,
- CK-BB je povečini prisoten v možganih.

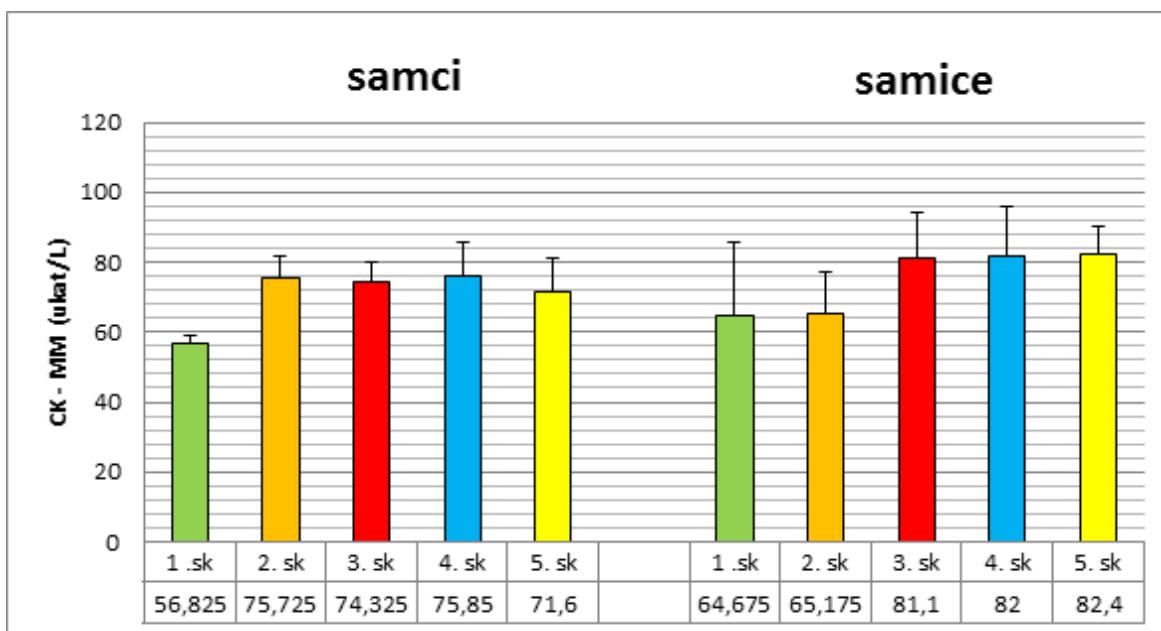
Na sliki 22 smo ugotovili, da so vse vrednosti CK-MB znotraj referenčnih vrednosti in ni bistvenih razlik med skupinami. Ker na spletni strani The Jackson laboratory nismo našli primerljivih referenčnih vrednosti za analize CK-BB in CK-MM, smo dobljene vrednosti skupin primerjali medsebojno ter s kontrolno skupino, kar je prikazano na slikah 23 in 24. Rezultati pri obeh testih ne odstopajo od vrednosti kontrolne skupine. Statistična obdelava podatkov ne kaže bistvenih razlik med skupinami ($p < 0,05$).



Slika 23: Prikaz aktivnosti fosfokreatin kinaze (BB) v $\mu\text{kat/l}$

Primerjava povprečnih vrednosti med posameznimi skupinami in spoloma.

Legenda: (Skupina 1) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina 2) nanodelci v liposomih, (skupina 3) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina 4) pufer za nanodelce, (skupina 5) kontrola (brez pufra)



Slika 24: Prikaz aktivnosti fosfokreatin kinaze (MM) v $\mu\text{kat}/\text{L}$

Primerjava povprečnih vrednosti med posameznimi skupinami in spoloma.

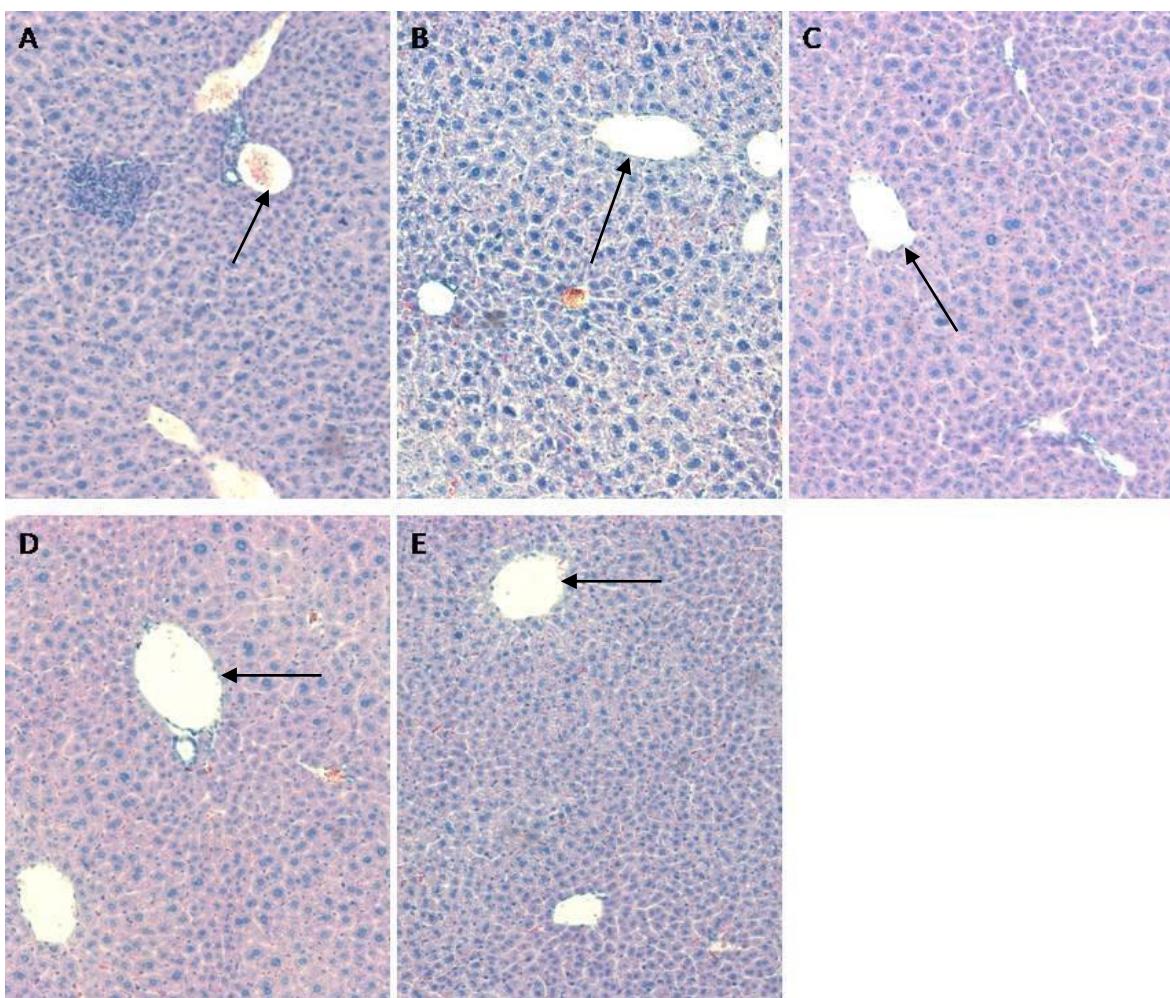
Legenda: (skupina 1) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina 2) nanodelci v liposomih, (skupina 3) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina 4) pufer za nanodelce, (skupina 5) kontrola (brez pufra)

4.3 ANALIZA ORGANOV

Po odvzemu organov smo le-te najprej makroskopsko pregledali za kakršne koli patološke spremembe, ki bi bile posledica toksičnosti nanodelcev. Znaki se kažejo v spremembah barve in/ali velikosti posameznega organa. Pri makroskopski analizi organov nismo opazili sprememb, zato smo v nadaljevanju naredili še histološke preglede posameznih organov: jeter, pljuč, vranice, ledvic, limfnih vozlov in dela dvanajstnika. Poleg tega smo analizirali lokalizacijo in možno kopičenje nanodelcev v organih s pomočjo barvanja po Perl's Prussian Blue.

4.3.1 Histološki pregled organov

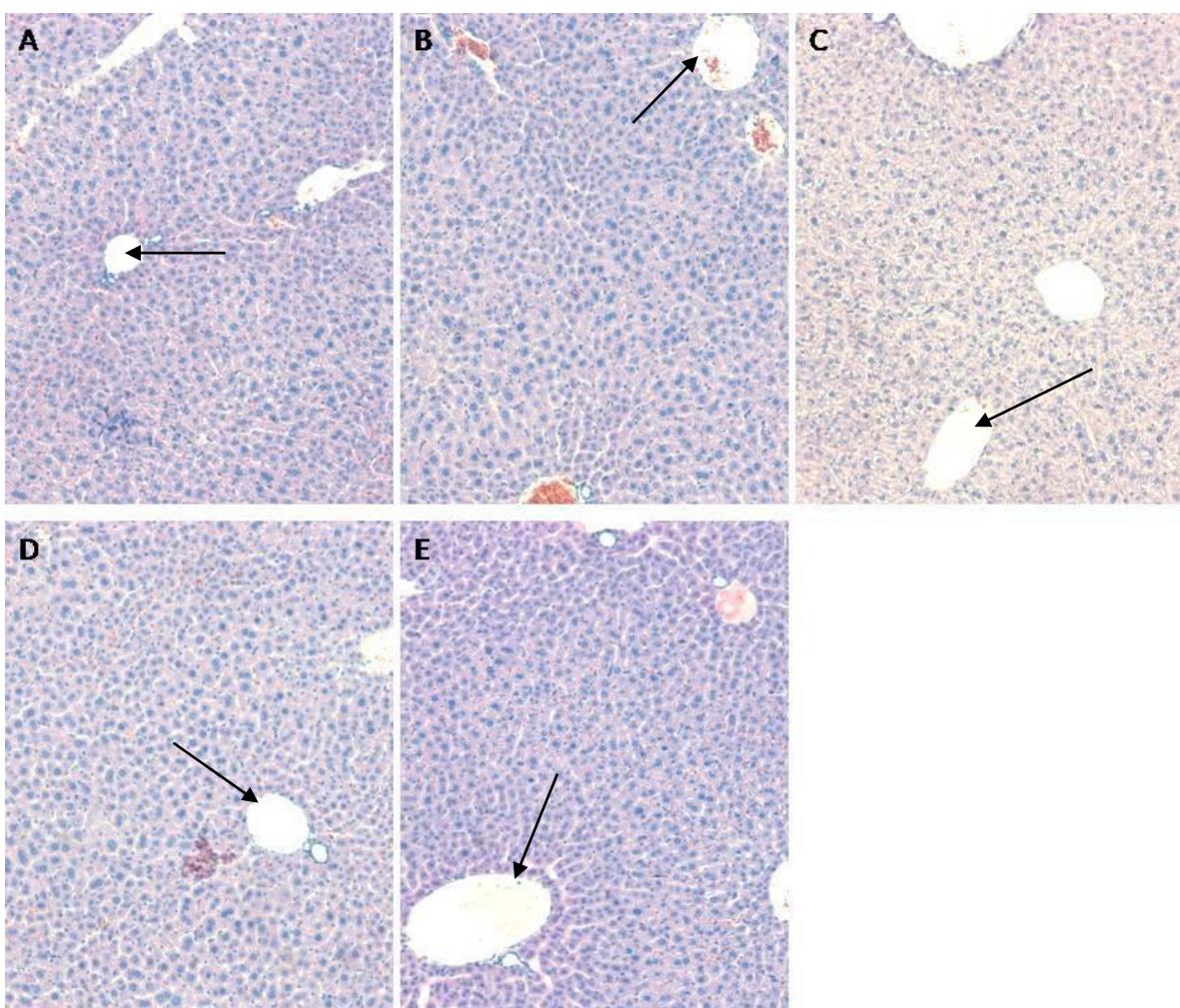
Pri histološkem pregledu smo organe barvali s hematoksilinom in eozinom, da bi ugotovili morebitne patološke spremembe.



Slika 25: Primerjava obarvanih jeter samcev po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E
S puščicami so označene centralne vene.

Legenda: (**Skupina A**) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (**skupina B**) nanodelci v liposomih, (**skupina C**) nanodelci v liposomih in ciljanje, (**skupina D**) pufer za nanodelce, (**skupina E**) kontrola (brez pufra)

Na sliki 25 je prikazana primerjava jeter pri skupinah vzorcev samcev, kjer nismo opazili patoloških sprememb.

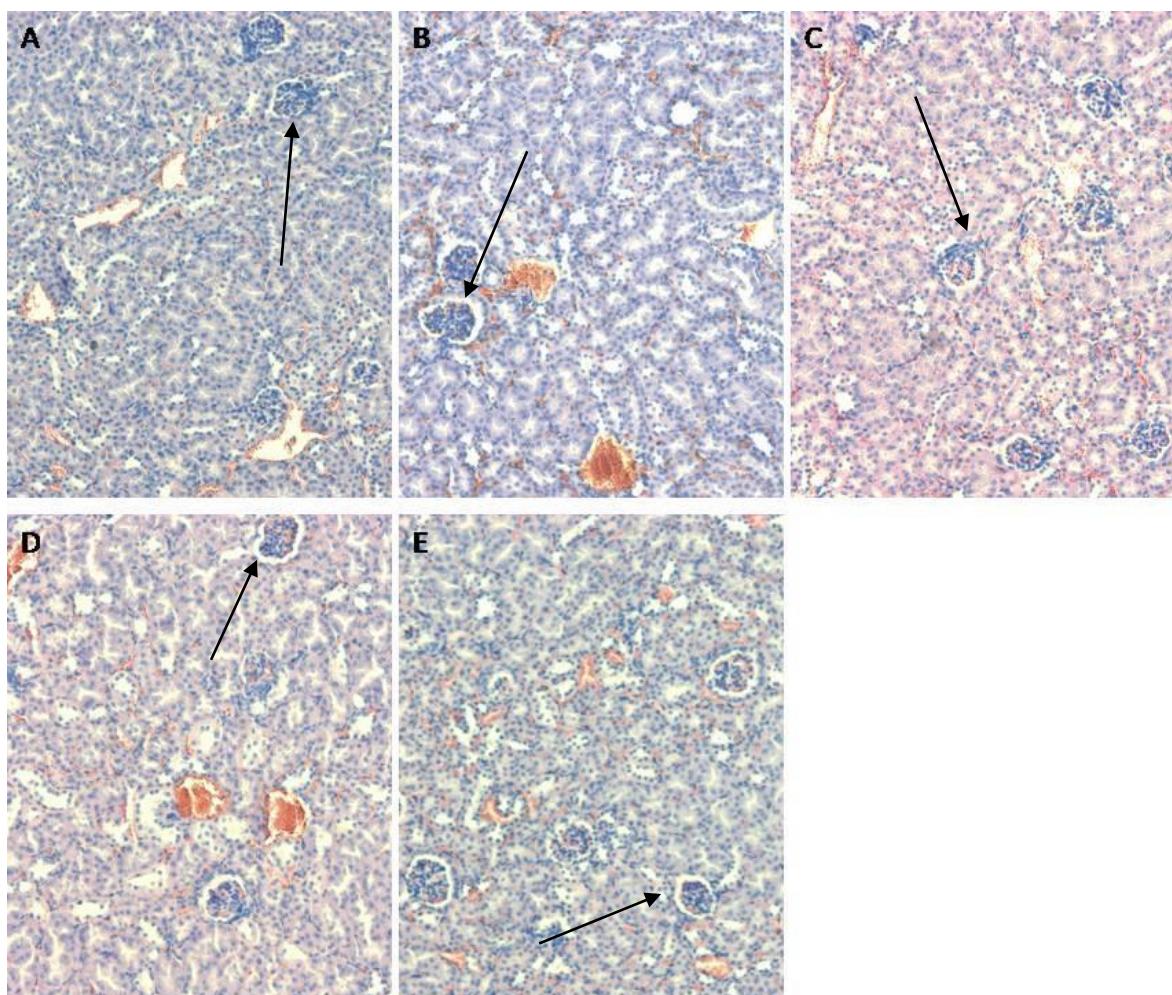


Slika 26: Primerjava obarvanih jeter samic po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E

S puščicami so označene centralne vene.

Legenda: (Skupina A) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina B) nanodelci v liposomih, (skupina C) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina D) pufer za nanodelce, (skupina E) kontrola (brez pufra)

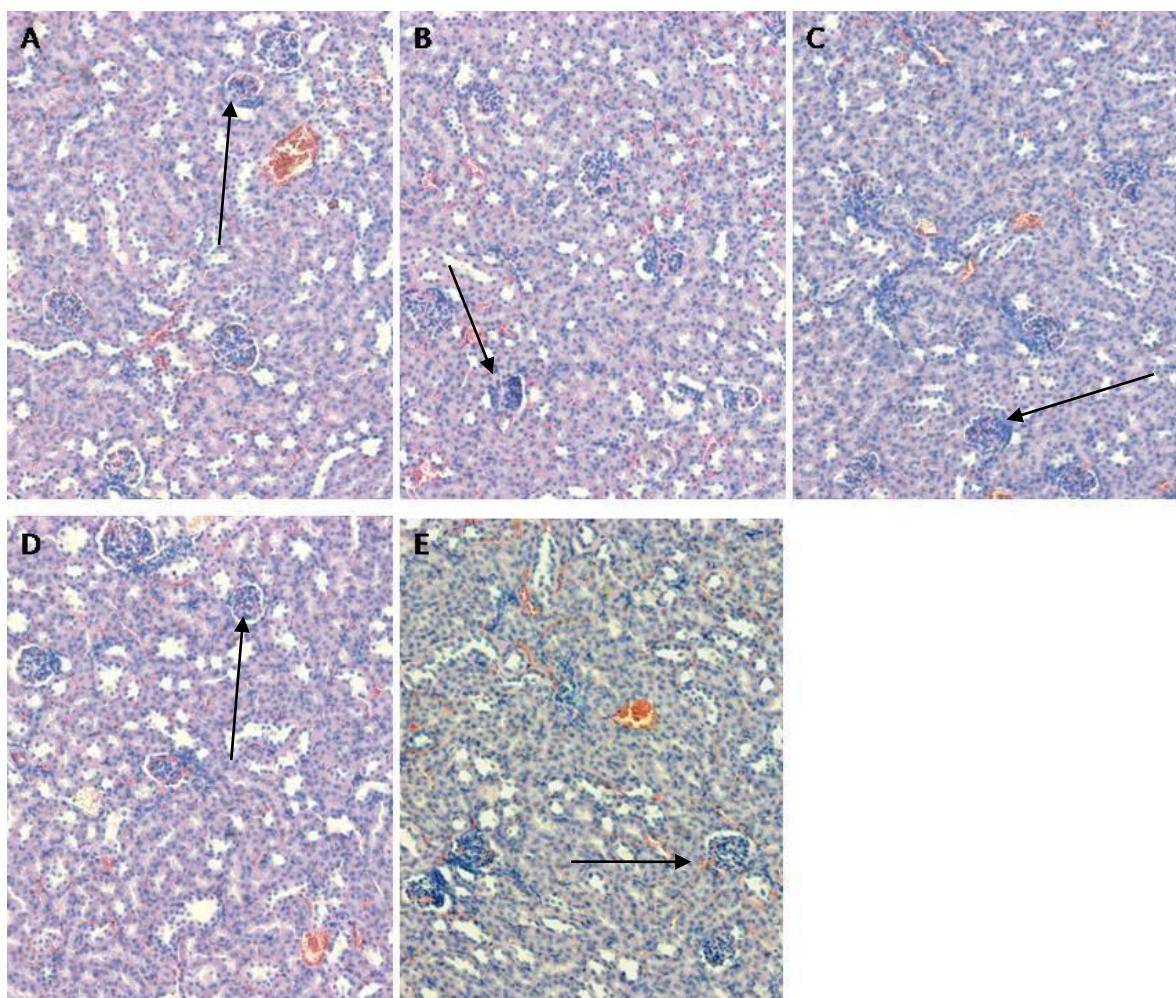
Na sliki 26 je prikazana primerjava jeter pri skupinah vzorcev samic, kjer nismo opazili patoloških sprememb.



Slika 27: Primerjava obarvanih ledvic samcev po H&E metodi med skupinami A,B,C,D,E
S puščicami so označeni glomeruli.

Legenda: (Skupina A) nanodelci v pufri (50 mg/kg), (skupina B) nanodelci v liposomih, (skupina C)
nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina D) pufer za nanodelce, (skupina E) kontrola (brez pufra)

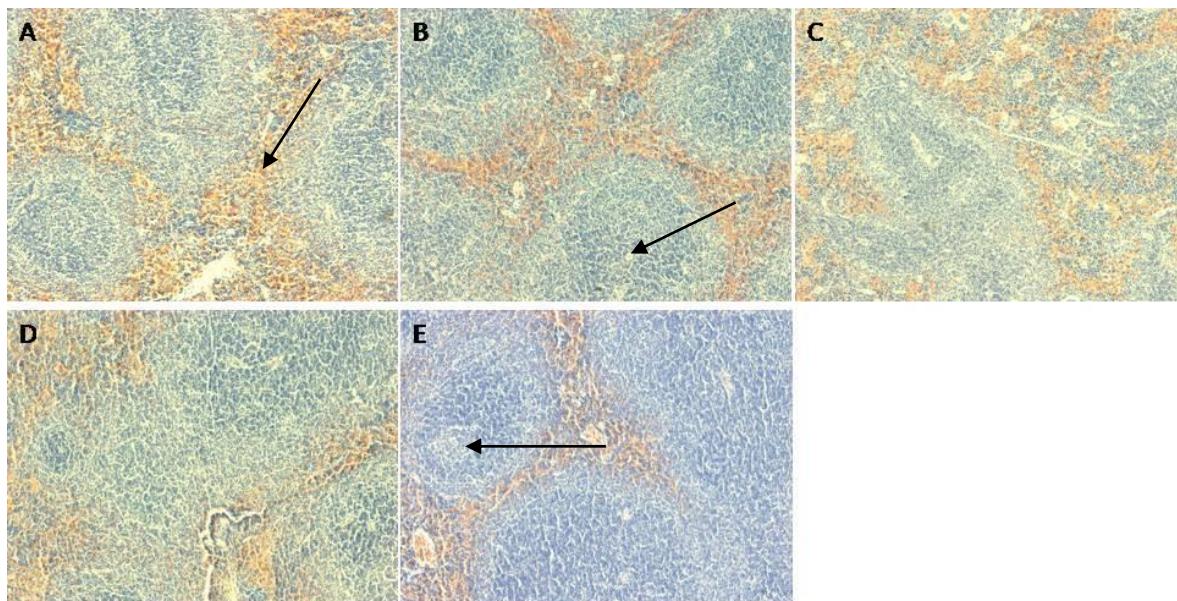
Na sliki 27 je prikazana primerjava ledvic pri skupinah samcev, kjer na okoliškem tkivu in
ledvičnih tubulih nismo opazili patoloških sprememb.



Slika 28: Primerjava obarvanih ledvic samic po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E
S puščicami so označeni glomeruli.

Legenda: (**Skupina A**) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (**skupina B**) nanodelci v liposomih, (**skupina C**) nanodelci v liposomih in ciljanje, (**skupina D**) pufer za nanodelce, (**skupina E**) kontrola (brez pufra)

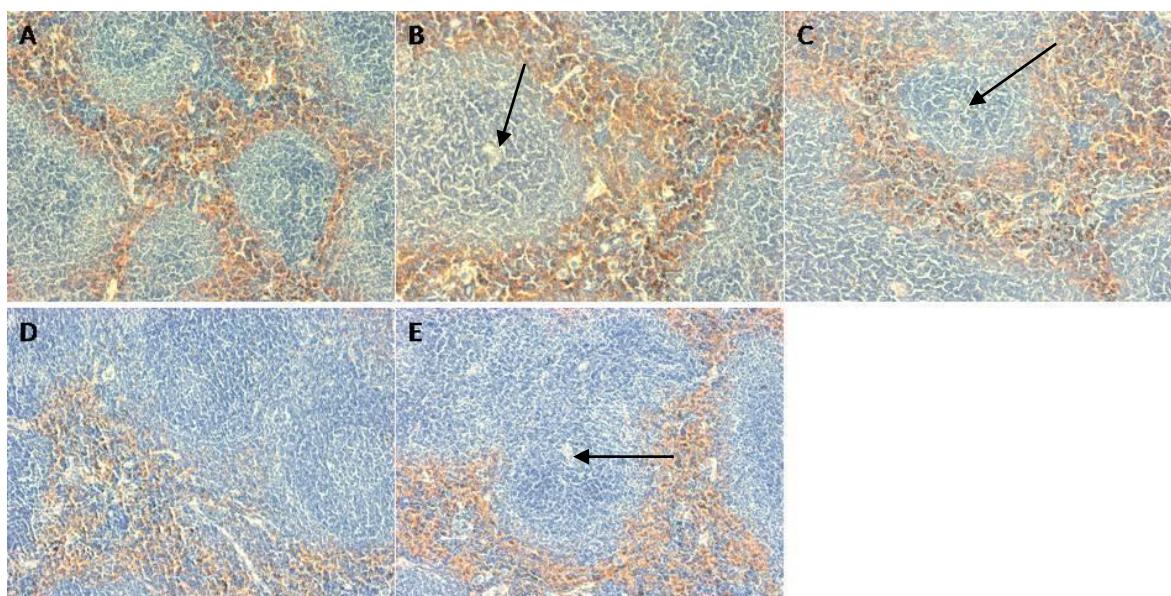
Na sliki 28 je prikazana primerjava ledvic pri skupinah vzorcev samic, kjer na okoliškem tkivu in ledvičnih tubulih nismo opazili patoloških sprememb.



Slika 29: Primerjava obarvane vranice samcev po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E
S puščicami so označene osrednje arteriole.

Legenda: (Skupina A) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina B) nanodelci v liposomih, (skupina C) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina D) pufer za nanodelce, (skupina E) kontrola (brez pufra)

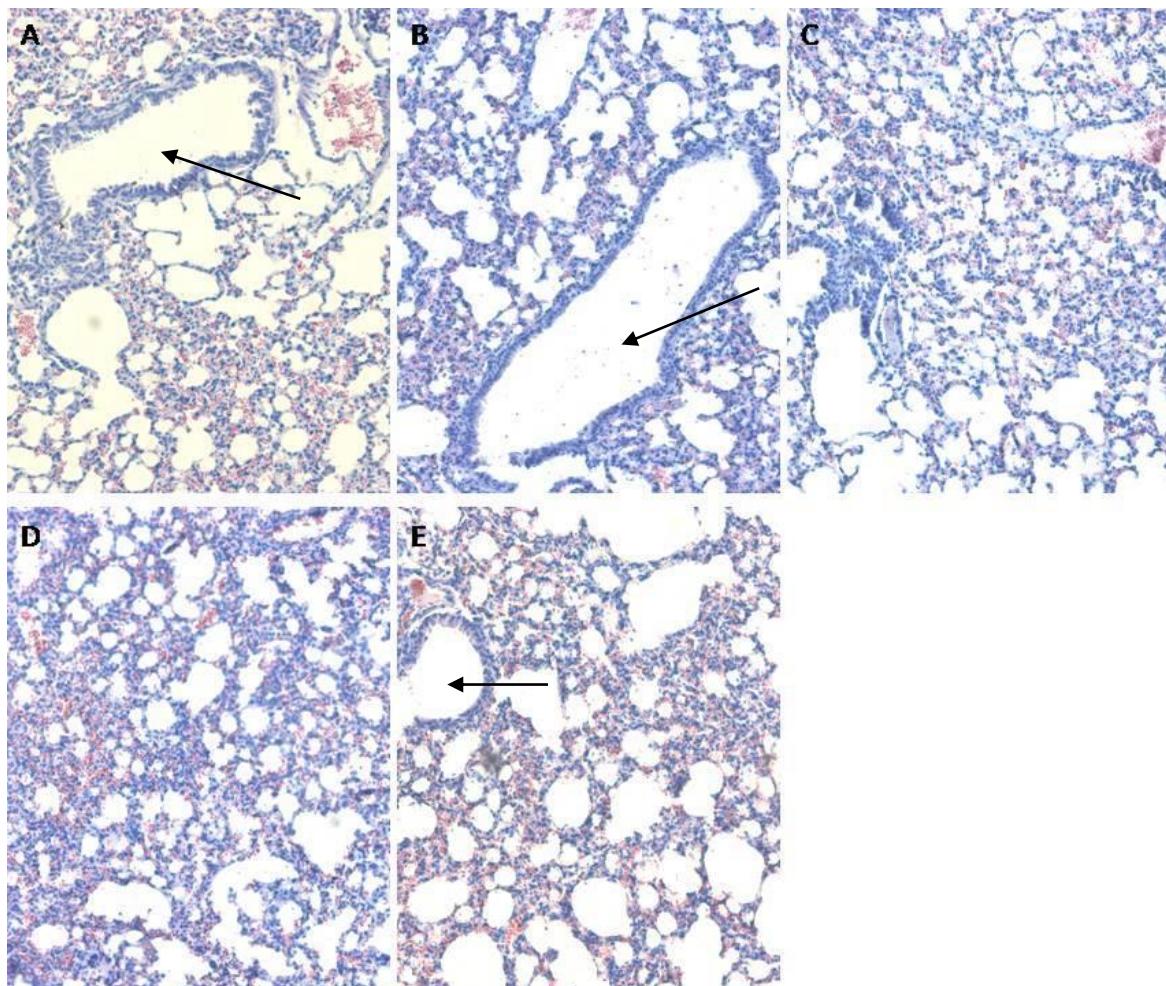
Na sliki 29 je prikazana primerjava vranic pri skupinah vzorcev samcev, kjer na okoliškem tkivu in arteriolah nismo opazili patoloških sprememb.



Slika 30: Primerjava obarvane vranice samic po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E
S puščicami so označene osrednje arteriole.

Legenda: (Skupina A) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina B) nanodelci v liposomih, (skupina C) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina D) pufer za nanodelce, (skupina E) kontrola (brez pufra)

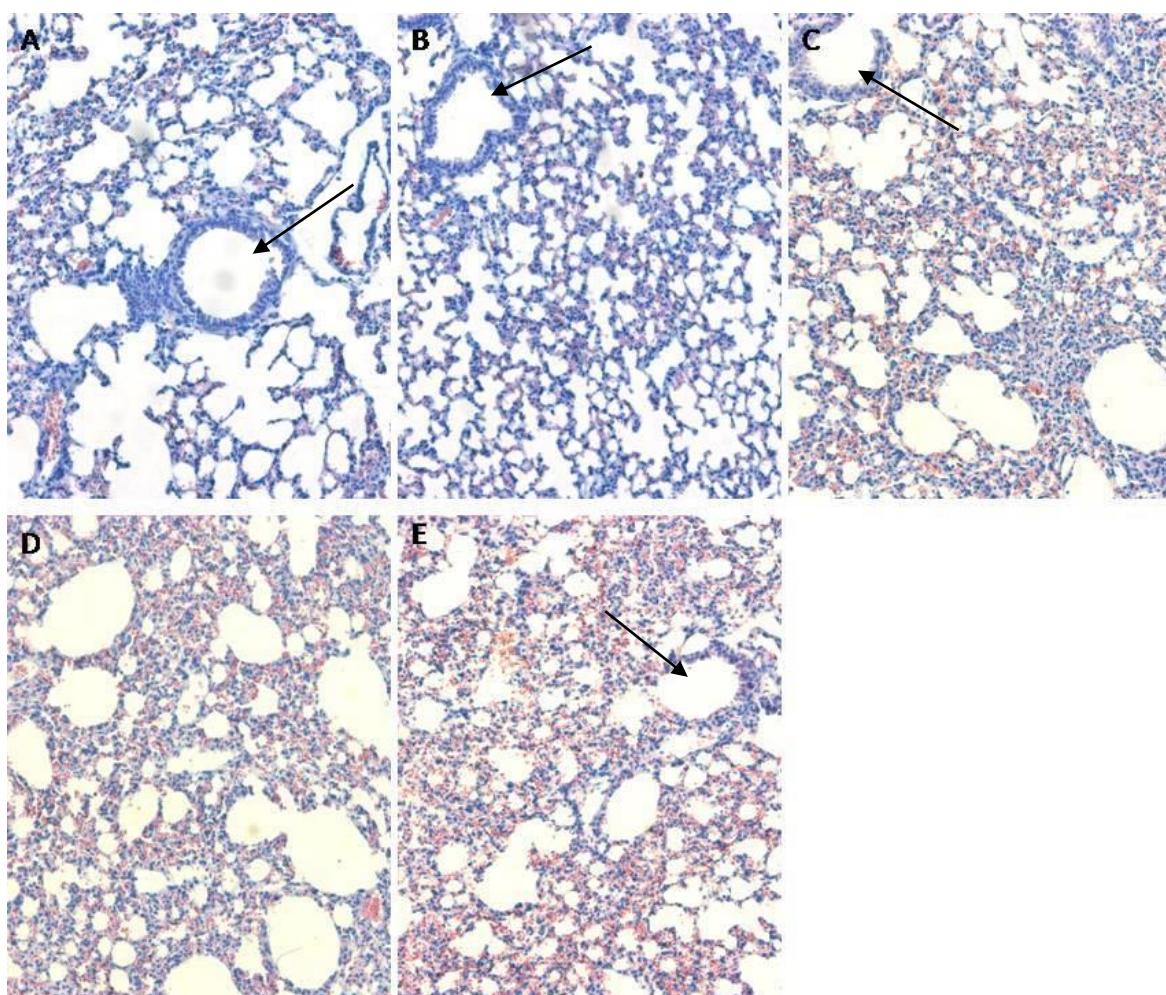
Na sliki 30 je prikazana primerjava vranic pri skupinah vzorcev samic, kjer na okoliškem tkivu in arteriolah nismo opazili patoloških sprememb.



Slika 31: Primerjava obarvanih pljuč samcev po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E
S puščicami so označeni bronhiji.

Legenda: (Skupina A) nanodelci v pufri (50 mg/kg), (skupina B) nanodelci v liposomih, (skupina C)
nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina D) pufer za nanodelce, (skupina E) kontrola (brez pufra)

Na sliki 31 je prikazana primerjava pljuč pri skupinah vzorcev samcev, kjer so bronhiji in okoliško tkivo brez patoloških sprememb.



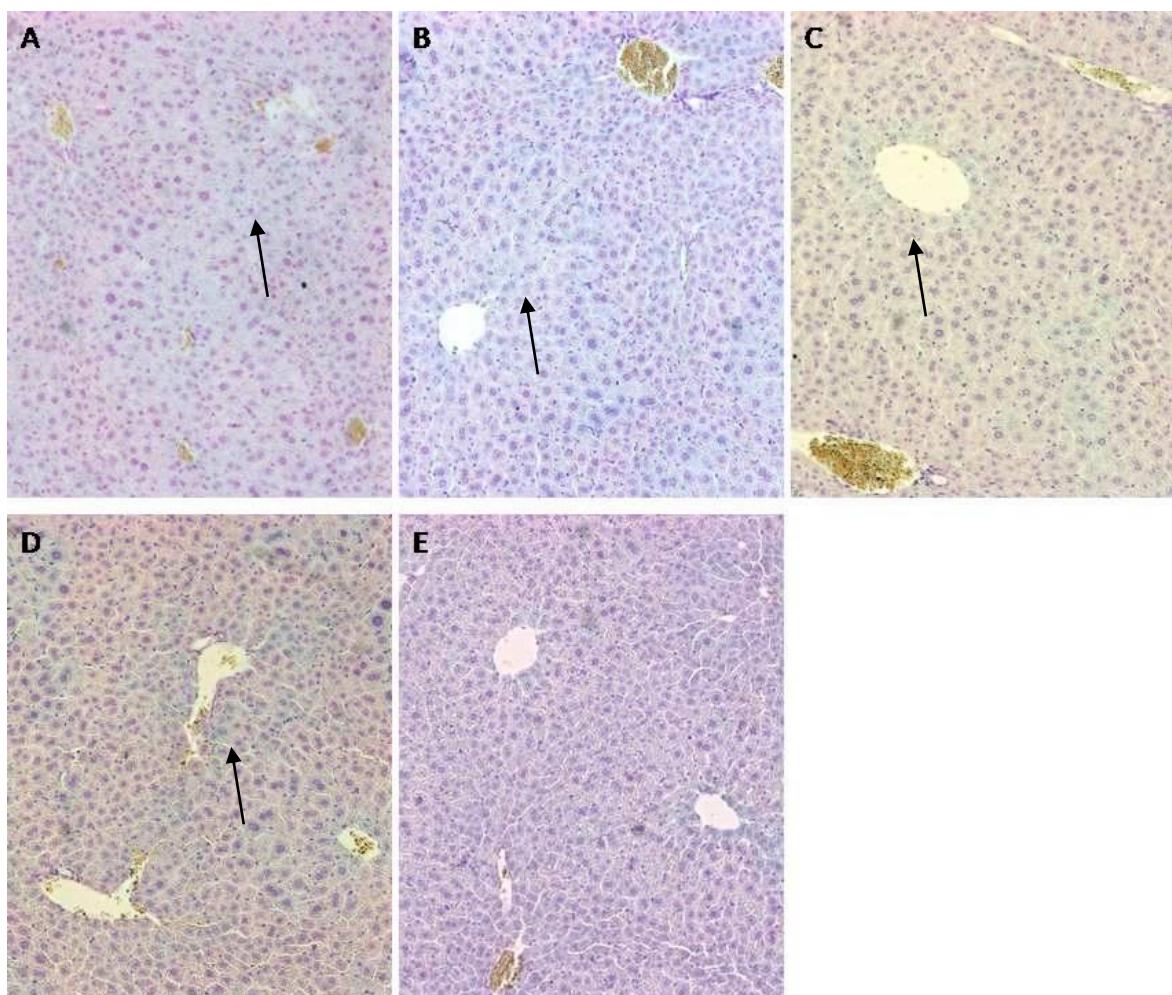
Slika 32: Primerjava obarvanih pljuč samic po H&E metodi med skupinami A,B,C,D in E
S puščicami so označeni bronhiji.

Legenda: (Skupina A) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina B) nanodelci v liposomih, (skupina C)
nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina D) pufer za nanodelce, (skupina E) kontrola (brez pufra)

Na sliki 32 je prikazana primerjava pri skupinah vzorcev samic, kjer so bronhiji in okoliško tkivo brez patoloških sprememb.

4.3.2 Lokalizacija nanodelcev

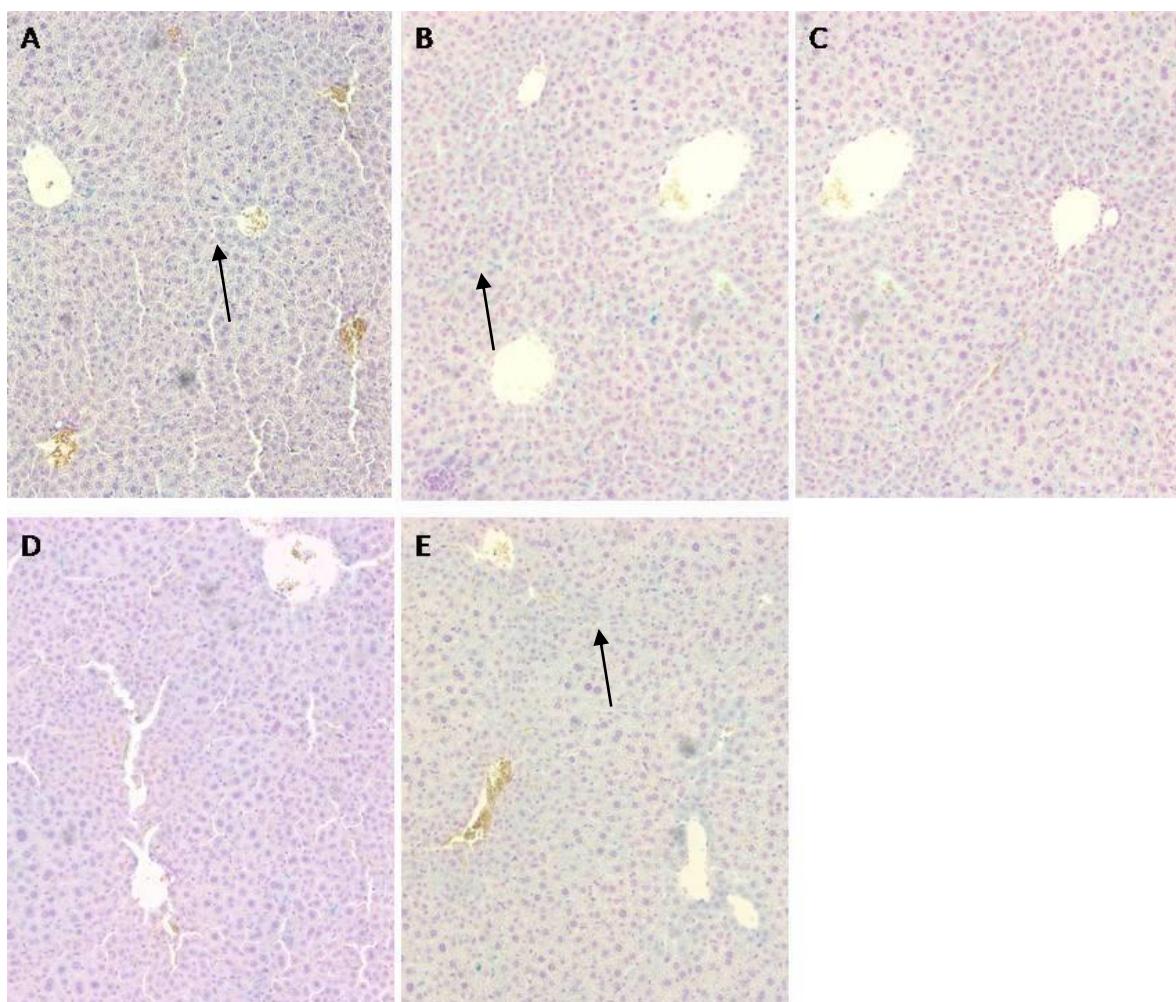
Morebitno lokalizacijo nanodelcev v organih smo ugotavljali s pomočjo tehnike barvanja po Perl's Prussian Blue. Poleg prisotnosti nanodelcev lahko s to metodo detektiramo tudi prisotnost endogenega železa.



Slika 33: Primerjava jeter obarvanih samcev po Perl's Prussian Blue metodi med skupinami A,B,C,D in E
S puščicama je označen železov kompleks.

Legenda: (Skupina A) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina B) nanodelci v liposomih, (skupina C) nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina D) pufer za nanodelce, (skupina E) kontrola (brez pufra)

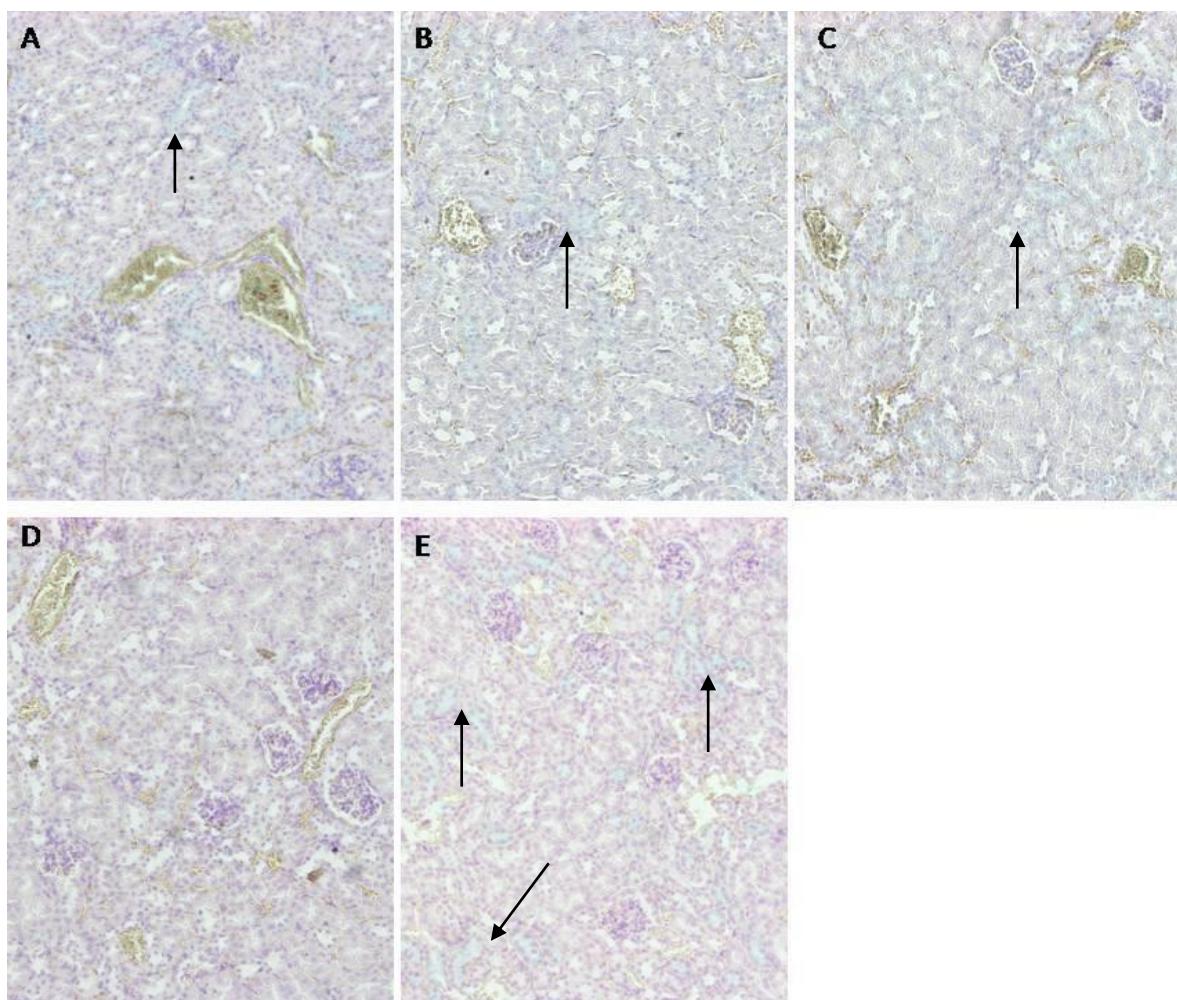
Slika 33 prikazuje jetra obarvana po Perl's Prussian Blue metodi pri skupinah samcev. Modra območja prikazujejo obarvan železov kompleks. Slike med kontrolno in testnimi skupinami ne nakazujejo na razlike v obarvanosti.



Slika 34: Primerjava jeter samic obarvanih po Perl's Prussian Blue metodi med skupinami A,B,C,D in E
S puščicami je označen železov kompleks.

Legenda: (**Skupina A**) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (**skupina B**) nanodelci v liposomih, (**skupina C**)
nanodelci v liposomih in ciljanje, (**skupina D**) pufer za nanodelce, (**skupina E**) kontrola (brez pufra)

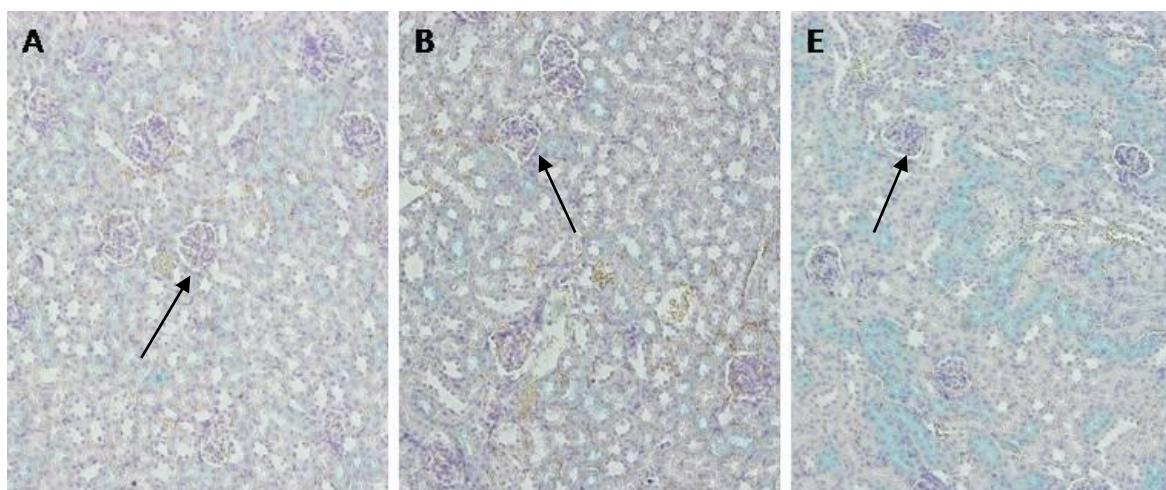
Slika 34 prikazuje jetra obarvana po Perl's Prussian Blue metodi pri skupinah vzorcev samic. Modra območja prikazujejo obarvan železov kompleks. Slike med kontrolno in testnimi skupinami ne nakazujejo na bistvene razlike v obarvanosti.



Slika 35: Primerjava ledvic samcev obarvanih po Perl's Prussian Blue metodi med skupinami A,B,C,D in E
S puščicami je označen železov kompleks.

Legenda: (skupina A) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (skupina B) nanodelci v liposomih, (skupina C)
nanodelci v liposomih in ciljanje, (skupina D) pufer za nanodelce, (skupina E) kontrola (brez pufra)

Slika 35 prikazuje ledvica obarvana po Perl's Prussian Blue metodi pri skupinah samcev. Modra območja prikazujejo obarvan železov kompleks. Slike med kontrolno in testnimi skupinami ne nakazujejo na bistvene razlike v obarvanosti.



Slika 36: Primerjava obarvanih ledvic samic po Perl's Prussian Blue metodi med skupinami A, B in E
S puščicami je označen železov kompleks.

Legenda: (**Skupina A**) nanodelci v pufru (50 mg/kg), (**skupina B**) nanodelci v liposomih, (**skupina E**) kontrola (brez pufra)

Skupina A: nanodelci v pufru (50 mg/kg)

Skupina B: nanodelci v liposomih

Skupina E: kontrola (brez pufra)

Slika 36 prikazuje jetra obarvana po Perl's Prussian Blue metodi med skupinami samic. Modra območja prikazujejo obarvan železov kompleks. Slike med kontrolno in testnimi skupinami ne nakazujejo na bistvene razlike v obarvanosti.

5 RAZPRAVA

Razvoj magnetnih nanodelcev je v zadnjem desetletju v močnem porastu po zaslugu napredka v nanotehnologiji, molekularni biologiji celic in orodij za slikanje laboratorijskih živali (Sun in sod., 2008). Glede na trenutno znanje o lastnostih magnetnih nanodelcev je očitno, da imajo edinstvene fizikalne, kemijske, strukturne in magnetne lastnosti. Te lastnosti omogočajo magnetnim nanodelcem, da se lahko selektivno povezujejo, manipulirajo *in situ* ali prenašajo tarčne snovi do želene lokacije pod vplivom zunanjega magnetnega polja (Mikhaylov in Vasiljeva, 2011). Uporaba magnetnih nanodelcev kot kontrastnih sredstev za MRI in pri dostavi zdravil je pritegnila veliko pozornosti, saj ima velik potencial pri zgodnji detekciji raka in terapijah s ciljano dostavo. Tehnologija tako poleg krčenja obsega invazivnih postopkov zmanjšuje tudi stranske učinke, kar predstavlja poglaviti problem pri zdravljenju raka. Glavnino razvoja magnetnih nanodelcev za medicino predstavljajo izboljšave pri kontrastnem slikanju, biokompatibilnosti, učinkovitosti nalaganja zdravil in specifičnih sposobnosti ciljanja. Nadalje je potreben tudi razvoj varnostnih smernic glede potencialnih učinkov nanodelcev na okolje in zdravje ljudi, ki jih proizvaja (Parveen in sod., 2012; Sun in sod., 2008).

Mikhaylov in sod. (2011) so razvili novo dostavno platformo za ciljanje tumorjev kot njihovega mikrookolja, ki temelji na feriliposomih. Feriliposomi so se pokazali kot učinkovit dostavni sistem za zdravila, ki lahko usmerjajo različne tipe tovora. Prav tako bi lahko sistem feriliposomov omogočil neinvazivno MRI diagnostično snemanje v realnem času z močno izboljšano občutljivostjo.

Namen naloge je bilo karakterizirati toksičnost dostavnega modela liposomov z enkapsuliranimi magnetnimi Fe_3O_4 nanodelci na modelu miši in ugotoviti njegovo primernost za nadaljnje raziskave.

Naš poskus je bil razdeljen na dva dela. Prvi del poskusa je zajemal delo z živalmi, kjer smo miši dnevno opazovali in jim merili telesno težo. Med poskusom smo mišim injicirali 4 različne testne snovi. Poskus so preživele vse miši, prav tako nismo opazili nobenih zunanjih sprememb po injiciranju. Iz slik 12 in 13 lahko ugotovimo, da je mišim dan po aplikaciji snovi rahlo upadla telesna teža, kar je bilo pričakovati zaradi povzročenega stresa pri injiciranju. Ugotovili smo, da je telesna teža po prvotnem padcu začela naraščati in do konca tedna doseгла vrednost pred začetkom poskusa. Tako lahko sklepamo, da injicirane testne snovi niso vplivale na spremembo v telesni teži miši.

V drugem delu poskusa smo mišim po evtanaziji odvzeli kri in organe za nadaljnje analize. Z biokemijsko analizo krvi smo hoteli ugotoviti učinke testnih skupin nanodelcev na aktivnosti različnih encimov, ki so indikatorji delovanja posameznih organov. S histološko analizo organov smo ugotavljali, ali testne skupine nanodelcev povzročajo vidne patološke spremembe organov in njihovo lokalizacijo v organih. Za ugotavljanje patoloških sprememb smo uporabljali tehniko barvanja po H&E, medtem ko smo za lokalizacijo delcev

uporabljali tehniko barvanja po Perl's Prussian Blue, kjer se ob prisotnosti železa tvori moder obarvan kompleks. Histološke preparate organov smo pregledovali z mikroskopom pod 100 x povečavo. Kot je navedeno v pregledu objav so jetra in ledvice glavni organi pri odstranjevanju nanodelcev. Tako smo učinke nanodelcev na jetra preverili na dva načina. Prvi način so meritve aktivnosti encimov značilnih za jetra. Izmerili smo aktivnosti alkalne fosfataze (ALP), aspartat aminotransferaze (AST) in alanin aminotransferaze (ALT). ALP test meri količino encima alkalne fosfataze v krvi. Sodeč po sliki 14 so vse vrednosti ALP znotraj referenčnega območja brez večjih odstopanj med posameznimi skupinami. AST test meri količino encima v krvi. AST se običajno nahaja v rdečih krvničkah, jetrih, srcu, mišičnih tkivih, trebušni slinavki in ledvicah. Količina AST v krvi je neposredno povezana z obsegom tkivnih poškodb. Tako nam lahko v povezavi z ALT testom pove o poškodbi jeter. Iz slike 15 smo ugotovili, da so vse vrednosti skupin znotraj referenčnega območja. Tudi nivo ALT-ja pokaže bolezni ali poškodbo jeter. Ob pojavi poškodbe ali bolezni jeter se ALT sprosti v kri, kar se odrazi v njegovi povečani vrednosti. Na podlagi slike 16 smo ugotovili, da so vse vrednosti znotraj referenčnih vrednosti. Pri študijah toksičnosti so to obetavni rezultati, vendar še ne zadostni. Zato smo opravili še histološki pregled organov, s pomočjo barvanja po H&E in preverili morebitne patološke spremembe v jetrih. Sodeč po slikah 25 in 26 nismo opazili večjih sprememb jeter, kar je potrdilo rezultate analiz encimov. Poleg akutne toksičnosti smo hoteli ugotoviti tudi, ali se nanodelci v jetrih skladiščijo in/ali eliminirajo. To smo ugotavljali s pomočjo detekcije železovega kompleksa po barvanju s Perl's Prussian Blue. Glede na slike 33 in 34 smo opazili področja, kjer se nahaja železov kompleks, vendar o akumulaciji in/ali eliminaciji težko sklepamo, saj je najverjetneje izvor železa endogen.

Poleg jeter nam eliminacijo delcev omogočajo tudi ledvice. Vpliv nanodelcev na ledvice smo ugotavljali z merjenjem koncentracije dušika v obliki sečnine (BUN) ter kreatinina (CRE), ki sta pokazatelja delovanja ledvic. BUN test meri količino dušika v krvi, ki pride iz odpadnega produkta sečnine. Če ledvice niso sposobne odstraniti sečnine iz krvi, BUN vrednost naraste. Povišano vrednost BUN lahko povzročijo tudi odpoved srca, dehidracijo ali dieta z visoko vsebnostjo proteinov. Iz slike 17 je razvidno, da so vrednosti BUN pri vseh skupinah znotraj referenčnega območja. Kreatinin je odpadni produkt pri normalnem razpadu mišičnega tkiva. Ob produkciji kreatinina se le-ta filtrira preko ledvic in izloči z urinom. Iz slike 18 vidimo, da so povprečne vrednosti skupin znotraj referenčnih vrednosti, vendar je opazna razlika med povprečjem kontrolne skupine in ostalih skupin. Poleg analize krvi je potreben še histološki pregled organov. S pomočjo barvanja po H&E smo preverjali morebitne patološke spremembe v ledvicah. Sodeč po slikah 27 in 28 nismo opazili sprememb v strukturi ali obliku. Tako lahko sklepamo o netoksičnosti nanodelcev. Poleg akutne toksičnosti je pomemben tudi podatek o morebitni akumulaciji in/ali eliminaciji delcev, kar smo ugotavljali z detekcijo železovega kompleksa po barvanju s Perl's Prussian Blue. Glede na slike 35 in 36 smo ugotovili, da je prišlo do nastajanja železovih kompleksov, vendar na istih področjih kot pri kontrolnih skupinah, kar kaže na to, da pri skupinah z aplikacijo nanodelcev ni prišlo do povečane obarvanosti železovih kompleksov. Sklepamo

pa lahko, da je do obarvanja železovih kompleksov v ledvicah prišlo zaradi kopičenja endogenega železa.

Poleg jeter in ledvic smo opazovali tudi delovanje srca, vranice, različnih mišic ter trebušne slinavke. Učinke nanodelcev smo preverili z merjenjem aktivnosti laktat dehidrogenaze (LDH), amilaze, kreatin kinaze (v treh izoencimskih oblikah) in lipaze. Merjenje vrednosti LDH nam pomaga ugotoviti poškodbe pljuč in jeter, anemijo ter limfome. LDH je prisoten v skoraj vseh tkivih telesa, njegova vrednost pa naraste kot posledica odziva na celične poškodbe. Na sliki 19 smo ugotovili, da so vse vrednosti znotraj referenčnega območja. Amilaza je v krvi in urinu prisotna v majhnih koncentracijah, vendar te narastejo ob poškodbi ali blokadi trebušne slinavke ali žlez slinavke. V krvi količine amilaze narastejo le za kratek čas, medtem ko lahko v urinu ostanejo visoke več dni. Ker so dobljene vrednosti precej odstopale od referenčnih vrednosti, ki so navedene na spletni strani The Jackson Laboratory, smo jih primerjali medsebojno ter s kontrolno skupino. Tako smo sodeč po sliki 20 ugotovili, da vrednosti med posameznimi skupinami ne odstopajo od kontrolne skupine, kar kaže, da ni prišlo do poškodb trebušne slinavke. Pri histološkem pregledu organov sodeč po slikah 29 in 30 nismo opazili patoloških sprememb ter razlik med skupinami, kar kaže na to, da nanodelci niso bili toksični.

Kreatin kinaza je encim, ki se nahaja v mišicah. Obstaja v treh izoencimskih oblikah: CK-MM, ki se nahaja v skeletnih mišicah in srcu, CK-MB se nahaja v srčnih mišicah, jeziku, diafragmi, in CK-BB, ki ga je največ v možganih. Nivo encima naraste ob morebitnih poškodbah mišic v telesu. Glede na sliko 22 smo ugotovili, da vrednosti CK-MB pri posameznih skupinah ne odstopajo od referenčnih vrednosti, kar nakazuje da ni prišlo do poškodb srčne mišice. Pri posameznih miših smo opazili večja odstopanja pri samicah iz skupine z injiciranjem nanodelcev v liposomih, kar bi lahko nakazovalo na poškodbe srčnih mišic, vendar bi potrebovali za potrditev tega opraviti še dodatne teste. Ker na spletni strani The Jackson laboratory nismo našli primerljivih referenčnih vrednosti pri analizah CK-BB ter CK-MM, smo dobljene vrednosti skupin primerjali medsebojno ter s kontrolno skupino. Rezultati ne odstopajo od vrednosti kontrolne skupine.

Poleg biokemijske analize krvi smo opravili še histološki pregled pljuč z barvanjem po H&E, kjer prav tako nismo opazili sprememb v strukturi ali obliku pljuč. Za ugotavljanje akumulacije in/ali eliminacije nanodelcev preko pljuč smo opravili barvanje železovih kompleksov z barvanjem po Perl's Prussian Blue metodi. Po pregledu preparatov pljuč z mikroskopom smo ugotovili, da ni prišlo do premeščanja nanodelcev v pljučih, saj nismo opazili obarvanega železovega kompleksa.

Rezultati analize krvi so obetavni, saj smo ugotovili, da so izmerjene vrednosti posamičnih parametrov znotraj referenčnih vrednosti, kar nakazuje na to, da nanodelci niso vplivali na zdravje miši. Prav tako smo podobno ugotovili po pregledu histoloških slik organov, kjer nismo opazili patoloških sprememb ali kopičenja nanodelcev po njihovi aplikaciji. Za klinično uporabo nanodelcev bo potrebno opraviti še več obsežnejših in dlje časa trajajočih

študij z različnimi koncentracijami nanodelcev ter nadaljnje študije v drugih živalskih modelih.

Seveda pa ostaja vprašanje, ali so nanodelci z železovim oksidom varni za uporabo v biomedicinske namene. Na voljo imamo vedno več podatkov o toksičnosti nanodelcev, vendar je na tem področju potrebnega še veliko truda. S standardizacijo inkubacijskih pogojev, površinsko funkcionalizacijo, ki je ključni korak pri izdelavi nanomaterialov uporabnih v biomedicini, karakterizacijo nanodelcev v njihovem biološko relevantnem okolju in primerjalnih študij v večjem obsegu bi lahko naredili pomemben korak k izboljšanju poznavanja delovanja nanodelcev. Še posebej v primeru *in vivo* aplikacij je potrebnih veliko raziskav, da bi pridobili zadostno količino podatkov (Liu in sod., 2013; Soenen in sod., 2011). V prihodnosti lahko poleg dostave zdravil, hipertermije in MRI pričakujemo uporabo magnetnih nanodelcev tudi pri:

- sortiranju/ciljanju celic,
- bioseparaciji,
- imobilizaciji encimov,
- imunotestih,
- transfekciji in dostavi genov,
- dostavi nukleinskih kislin,
- na področju nevroznanosti, vključajoč dostavo zdravil do centralnega živčnega sistema (Aruebbo in sod., 2007; Cohen in Shoushan, 2013; Kreuter, 2007).

6 SKLEPI

- Iz rezultatov krvnih analiz lahko sklepamo, da nanodelci niso toksični.
- Histološka analiza organov ni pokazala patoloških sprememb, na podlagi česar lahko nadalje sklepamo, da nanodelci niso bili toksični.
- Perl's Prussian Blue metoda ni pokazala akumulacije in/ali eliminacije nanodelcev, zato lahko sklepamo, da so se nanodelci eliminirali, oz. ni prišlo do akumulacije.
- Nadaljnje testiranje nanodelcev bi moralo vključevati še teste kronične toksičnosti.

7 POVZETEK

V študiji smo preučevali vpliv akutne toksičnosti modela liposomov z enkapsuliranimi magnetnimi Fe_3O_4 nanodelci na miših seva FVB/N pri enkratni izpostavitvi. Poskusne živali miši smo vzredili na Inštitutu Jožef Stefan leta 2012 v nadzorovanem okolju za reživali. V poskušu smo poleg kontrolne skupine brez aplikacije snovi, imeli še 4 različne testne skupine. Pri vsaki skupini smo uporabili naslednje testne snovi: nanodelci v pufru, nanodelci v liposomih, nanodelci v liposomih in ciljanje z magnetom, pufer za nanodelce ter kontrolna skupina brez aplikacije snovi.

Nanodelci so različnih oblik in sestave velikosti 1-100 nm v premeru in se posledično uvrščajo v velikostni razred biomolekul in celičnih organelov. Nekateri nanodelci lahko nosijo različen tovor, kot so zdravila z majhno molekulsko maso, kontrastna sredstva, proteini, nukleinske kisline in druge snovi. Med nanodelce sodijo tudi magnetni nanodelci, ki imajo potencial, da korenito spremenijo trenutno klinično diagnostiko in terapevtske tehnike. S širokim naborom aplikacij v detekciji, diagnostiki in zdravljenju bolezni bi lahko magnetni nanodelci imeli pomembno vlogo pri doseganjу zdravstvenih potreb prihodnosti, kot so rak, kardiovaskularne bolezni in nevrološke bolezni. Poleg tega so nekateri uporabni kot kontrastna sredstva za MRI ter kot toplotni mediatorji pri terapijah raka. Magnetno usmerjanje zdravil je uporabno, ker omogoča specifično dostavo zdravila ob uporabi magnetnih nanodelcev in zunanjega magnetnega polja, ki je osredotočeno na tumor (Azzazy in Mansour, 2009; Lehner in sod., 2013; Sun in sod., 2008; Mikhaylov in Vasiljeva, 2011).

Eksperimentalno delo je bilo razdeljeno na dva dela. Prvi del je zajemal delo z mišmi v laboratoriju in poleg vsakodnevnega odčitavanja mišje teže vključeval tudi opazovanje mišjih zunanjih sprememb v obdobju enega tedna. Drugi del je zajemal biokemijsko analizo krvi, ki so jo opravili na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v UKC Ljubljana. Po usmrtnosti miši in odvzemuh organov je sledil makroskopski pregled leteh, kjer smo iskali morebitne znake v spremembah barve in/ali velikosti posameznega organa. Tovrstnih sprememb nismo opazili, zato smo v nadaljevanju naredili še histološke preglede posameznih organov: jeter, pljuč, vranice, ledvic, limfnih vozlov in dela dvanajstnika. Poleg tega smo ugotavliali tudi morebitno eliminacijo in/ali možno akumulacijo nanodelcev v telesu, kar smo preverjali s pomočjo barvanja po Perl's Prussian Blue, kjer se moder obarvajo železovi kompleksi.

S pridobljenimi rezultati smo potrdili hipotezo, da liposomi z enkapsuliranimi Fe_3O_4 nanodelci niso toksični in ne povzročajo patoloških sprememb v miših ter da se nanodelci ne akumulirajo v organih miši in se odstranijo iz telesa. Rezultati biokemijske analize krvi so pokazali, da so izmerjene vrednosti znotraj referenčnih vrednosti. Za klinično uporabo magnetnih nanodelcev bo potrebno opraviti še več obsežnejših in dlje časa trajajočih študij z različnimi koncentracijami nanodelcev.

8 VIRI

- Ahmed N., Fessi H., Elaissari A. 2012. Theranostic applications of nanoparticles in cancer. *Drug Discovery Today*, 17, 17/18: 928-934
- Arruebo M., Fernández-Pacheco R., Ibarra M. R., Santamaría J. 2007. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, 2, 3: 22 – 32
- Azzazy H. M. E., Mansour M. M. H. 2009. *In vitro* diagnostic prospects of nanoparticles. *Clinica Chimica Acta*, 403: 1–8
- Chen H., Zhen Z., Todd T., Chu P. K., Xie J. 2013. Nanoparticles for improving diagnosis. *Materials Science and Engineering*, 74, 3: 35-69
- Cohen Y., Shoushan S. Y. 2013. Magnetic nanoparticles-based diagnostics and theranostics. *Current Opinion in Biotechnology*, 24, 4: 672-681
- Duguet E., Treguer-Delapierre M., Delville M. -H. 2010. Functionalised inorganic nanoparticles for biomedical applications V: Nanoscience: Nanobiotechnology and Nanobiology. Boisseau P., Houdy P., Lahmani M. (eds.). Berlin, Springer-Verlag: 129 - 170
- Dias A. M. G. C., Hussain A., Marcos A. S., Roque A. C. A. 2011. Biotechnological perspective on the application of iron oxide magnetic colloids modified with polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 29: 142-155
- Feng S., Chien S. 2003. Chemotherapeutic engineering: application for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chemical Engineering Science*, 58, 18: 4087-4114
- Huang H-C., Barua S., Sharma G., Dey S. K., Rege K. 2011. Inorganic nanoparticles for cancer imaging and therapy. *Journal of Controlled Release*, 155: 344-357
- Kocbek P. 2012. Novosti na področju farmacevtske nanotehnologije. *Farmacevtski vestnik*, 63, 2: 75–81
- Kreuter J. 2007. Nanoparticles-a historical perspective. *International Journal of Pharmaceutics*, 331: 1–10
- Kristl J. 2012. Vpliv nanotehnologije na razvoj zdravil. *Farmacevtski vestnik*, 63, 2: 67-73
- Lehner R., Wang X., Marsch S., Hunziker P. 2013. Intelligent nanomaterials for medicine: Carrier platforms and targeting strategies in the context of clinical application. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9, 6: 742-757

Liu Y., Yang K., Cheng L., Zhu J., Ma X., Xu H., Li Y., Guo L., Gu H., Liu Z. 2013. PEGylated FePt@Fe₂O₃ core-shell magnetic nanoparticles: potential theranostic applications and *in vivo* toxicity studies. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 9, 7: 1077–1088

Mouse phenotype database: Blood chemistry. 2013. Maine, The Jackson Laboratory: 1 str.
<http://phenome.jax.org/> (junij, 2013)

Mikhaylov G., Mikac U., Magaeva A. A., Itin V. I., Naiden E. P., Psakhye I., Babes L., Reinheckel T., Peters C., Zeiser R., Bogyo M., Turk V., Psakhye S. G., Turk B., Vasiljeva O. 2011. Ferri-liposomes as an MRI-visible drug-delivery system for targeting tumours and their microenvironment. *Nature Nanotechnology*, 6: 594-602

Mikhaylov G., Vasiljeva O. 2011. Promising approaches in using magnetic nanoparticles in oncology. *Biological Chemistry*, 392: 955-960

Neuberger T., Schopf B., Hofmann H., Hofmann M., von Rechenberg B. 2005. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: possibilities and limitations of a new drug delivery system. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293: 483-496

Olympus IX81. 2012. Center Valley, Olympusamerica: 1 str.
http://www.olympusamerica.com/seg_section/images/product/detail_full/1022_secondary_lg.jpg (januar, 2014)

Parveen S., Misra R., Sahoo S. K. 2012. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 8: 147–166

Perls' Prussian Blue for Hemosiderin. 2011. Ladysmith, Stainsfile: 2 str.
<http://stainsfile.info/StainsFile/stain/pigment/perls.htm> (junij, 2013)

Petros R. A., DeSimone J. M. 2010. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9: 615-627

Pradhan P., Giri J., Rieken F., Koch C., Mykhaylyk O., Döblinger M., Banerjee R., Bahadur D., Plank C. 2010. Targeted temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy. *Journal of Controlled Release*, 142, 1: 108-121

Shubayev V., Pisanic II T. R., Jin S. 2009. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 467–477

Soenen S. J., Rivera-Gil P., Montenegro J.-M., Parak W. J., De Smedt S. C., Braeckmans K. 2011. Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today*, 6: 446—465

Suh W. H., Suslick K. S., Stucky G. D., Suh Y. 2009. Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience. *Progress in Neurobiology*, 87: 133-170

Sun C., Lee J. S.H., Zhang M. 2008. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60: 1252-1265

Thermo scientific Microm EC 350. 2010. Sollentuna, Cellab: 4 str.
<http://cellab.se/pdfbroschyr/Microm/EC350-300-E.pdf> (junij, 2013)

Tissue cassettes with plastic lids. 1999. Buford, Therapak: 4 str.
<http://www.therapak.com/catalog/histology> (januar, 2014)

Xie J., Lee S., Chen X. 2010. Nanoparticle-based theranostic agents. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62: 1064-1079

Xu C., Sun S. 2012. New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65, 5: 732-743

Yildirimer L., Thanh N. T.K., Loizidou M., Seifalian A. M. 2011. Toxicology and clinical potential of nanoparticles. *Nano Today* 6, 6: 585-607

ZAHVALA

Najprej bi se rad zahvalil mentorju dr. Borisu Turku, da mi je omogočil izdelavo magistrske naloge na Inštitutu Jožef Štefan in pa za vse strokovne nasvete pri nalogi.

Za vso pomoč pri eksperimentalnem delu in interpretaciji rezultatov bi se lepo zahvalil tudi mladima raziskovalcema na IJS Mihi Butinarju in Janji Završnik.

Pri zaključnem izgledu naloge pa mi je bila v veliko pomoč ga. mag. Simona Juvan, za kar sem ji hvaležen.

Še posebej pa se zahvaljujem tudi svoji družini, ki me je podpirala v času študija.