UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Klemen STROJAN

ANALIZA VPLIVA POVRŠINSKE PLASTI MAGNETNIH NANODELCEV NA PREŽIVETJE CELIC *IN VITRO*

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Klemen STROJAN

ANALIZA VPLIVA POVRŠINSKE PLASTI MAGNETNIH NANODELCEV NA PREŽIVETJE CELIC *IN VITRO*

MAGISTRSKO DELO Magistrski študij – 2. stopnja Biotehnologija

EFFECT OF MAGNETIC NANOPARTICLES SURFACE LAYER ON *IN VITRO* CELL VIABILITY

M. SC. THESIS Master Study Programmes - Biotechnology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega progama 2. stopnje - Biotehnologija. Magistrsko delo je bilo pripravljeno v Skupini za nano in biotehnološke aplikacije na Fakulteti za elektrotehniko Univerze v Ljubljani. Meritve DLS in zeta potenciala so bile opravljene na Nanotesla Inštitutu, presevna elektronska mikroskopija na Inštitutu za biologijo celice, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani.

Študijska komisija Študija biotehnologije je za mentorico magistrskega dela imenovala prof. dr. Mojco Narat in za somentorico doc. dr. Mojco Pavlin.

Recenzentka: prof. dr. Mateja Erdani Kreft

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednica:	prof. dr. Branka JAVORNIK Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
Članica:	prof. dr. Mojca NARAT Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
Članica:	doc. dr. Mojca PAVLIN Univerza v Ljubljani, Fakulteta za Elektrotehniko, Skupina za nano in biotehnološke aplikacije
Članica:	prof. dr. Mateja ERDANI KREFT Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za biologijo celice

Datum zagovora:

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

Klemen Strojan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
- DK UDK 60(043.2)
- KG biotehnologija/magnetni nanodelci/celice/in vitro preživetje celic
- AV STROJAN, Klemen
- SA NARAT, Mojca (mentorica)/PAVLIN, Mojca (somentorica)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije
- LI 2014
- IN ANALIZA VPLIVA POVRŠINSKE PLASTI MAGNETNIH NANODELCEV NA PREŽIVETJE CELIC *IN VITRO*
- TD Magistrsko delo (Magistrski študij 2. stopnja Biotehnologija)
- OP XI, 49 str., 3 pregl., 19 sl., 49 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Magnetni nanodelci so že izkazali uporabnost v biotehnoloških aplikacijah. Oplaščenost magnetnih nanodelcev je bistvena za njihovo stabilnost v bioloških okoljih. Cilj magistrske naloge je bil preveriti vpliv s polietilen iminom (PEI) oplaščenih magnetnih nanodelcev (PEI ND) na celično linijo CHO in z dodatnim oplaščenjem z glutationom (PEI-glutation ND) zmanjšati toksičnost in vitro. Pripravili smo PEI nanodelce in PEI-glutation nanodelce in jim lastnosti določili z metodo dinamičnega sipanja laserske svetlobe ter z merjenjem zeta potenciala. Meritvi dinamičnega sipanja laserske svetlobe in zeta potenciala sta potrdili uspešno dodatno oplaščenje z glutationom. Po izpostavitvi celic CHO nanodelcem, smo z diferencialnim barvanjem, z barviloma Hoechst in propidijev jodid, določali viabilnost, s testom MTS celično aktivnost, s standardnim kitom smo merili nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti ter s presevno elektronsko mikroskopijo spremljali vstop nanodelcev v celice. Potrdili smo vzroke toksičnosti, ki jih navaja literatura in pokazali, da z dodatnim oplaščenjem z glutationom zmanjšamo negativen vpliv na viabilnost in metabolno aktivnost celic. Manjša toksičnost je rezultat antioksidativnega delovanja glutationa in zmanjšanja presežka pozitivnega naboja na površini nanodelcev. Reaktivne kisikove zvrsti so se izkazale kot eden izmed vzrokov, ki vodi v toksičnost PEI ND. Predvidevamo, da PEI ND vstopajo v celico z makropinocitozo, PEI-glutation ND pa tudi s klatrini-posredovano endocitozo.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC UDC 60(043.2)
- CX biotechnology/magnetic nanoparticles/cells/in vitro cell viability
- AU STROJAN, Klemen
- AA NARAT, Mojca (supervisor)/PAVLIN Mojca (co-advisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study in Biotechnology
- PY 2014
- TI EFFECT OF MAGNETIC NANOPARTICLES SURFACE LAYER ON *IN VITRO* CELL VIABILITY
- DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes Biotechnology)
- NO XI, 49 p., 3 tab., 19 fig., 49 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Magnetic nanoparticles are already used in biotechnological applications. Coating of magnetic nanoparticles is crucial for their stability in biological environments. In this work we tested the effect of polyethyleneimine coated magnetic nanoparticles (PEI NP) on CHO cell line. We analyzed if additional coating with L-Glutathione Reduced (PEI-glutathione NP) can reduce cytotoxicity of PEI-NPs. First, we synthesized PEI NP and PEI-glutathione NP and second, characterization with dynamic light scattering and zeta potential measurements was made. Dynamic light scattering and zeta potential measurements confirmed additional L-Glutathione coating. Viability was determined with fluorescent staining; metabolic activity was measured with MTS assay. Also, presence of reactive oxygen species was measured, while transmission electron microscopy was used for visualization of internalization of different nanoparticles. Our results show, that additional L-Glutathione coating reduces cytotoxic effect of analyzed nanoparticles on CHO cells. Toxicity might have been reduced as a result of L-glutathione antioxidant function or as a result of lower zeta potential. In this study we have shown that reactive oxygen species plays an important role in PEI NP cytotoxicity. We assume that PEI NP and PEI-glutathione NP enter the cell via macropinocytosis, PEI-glutathione NP also via clathrin-mediated endocytosis.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
1 UVOD	1
OPREDELITEV PROBLEMA	1
CILJI RAZISKOVANJA	2
DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 NANODELCI (ND)	3
2.1.1 Jedra	4
2.1.2 Oplaščenje	4
2.1.3 Karakterizacija ND	6
2.1.4 Aplikacije	8
2.2 CELIČNA LINIJA CHO	10
2.3 POTI VSTOPA ND V CELICO	10
2.4 MEHANIZMI TOKSIČNOSTI ND, OPLAŠČENIH S PEI	11
2.4.1 Reaktivne kisikove zvrsti	11
2.4.2 Oksidativni stres	12
2.4.3 Sprostitev ND v citoplazmo	13
2.5 ZMANJŠEVANJE TOKSIČNOSTI	14
3 MATERIALI IN METODE	15
3.1 MATERIALI	15
3.1.1 Celična linija	15

3.1.2 Hranilni medij	15
3.1.3 Oprema	15
3.2 METODE	16
3.2.1 Sinteza ND	16
3.2.2 Gojenje celic	16
3.2.3 Določanje viabilnosti z diferencialnim barvanjem	16
3.2.4 Določanje metabolne aktivnosti celic s testom MTS	17
3.2.5 Določanje reaktivnih kisikovih zvrsti	17
3.2.6 Določanje načinov internalizacije ND s pomočjo TEM	18
3.2.7 Statistične metode	18
4 REZULTATI	19
4.1 KARAKTERIZACIJA ND	19
4.2 DOLOČANJE DELEŽA ŽIVIH IN MRTVIH CELIC	20
4.3 DOLOČANJE REAKTIVNIH KISIKOVIH ZVRSTI	26
4.4 DOLOČANJE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC S TESTOM MTS	29
4.5 PREVERJANJE VSTOPANJA ND V CELICE S TEM	32
4.5.1 PEI ND	33
4.5.2 PEI – glutation ND	36
5 RAZPRAVA IN SKLEPI	
5.1 RAZPRAVA	
5.2 SKLEPI	42
6 POVZETEK	43
7 VIRI	44
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Reaktivne kisikove zvrsti in spojine brez prostega elektrona	(Halliwell, 2005: 2)12
Pregl. 2: Pregled uporabljene opreme	15
Pregl. 3: Zeta potencial ND.	19

KAZALO SLIK

0	ŀr	
Э	u	•

Slika 1: Stabilizacija magnetnih ND z elektrostatskim odbojem (a) in s steričnim oviranjem (b)
(Laurent in sod., 2008)
Slika 2: Porazdelitev hidrodinamskega premera ND v hranilnem mediju HAM F12 z
dodatkom 10 % FBS, določeno z metodo DLS19
Slika 3: Delež živih in mrtvih celic CHO glede na negativno kontrolo (NK) 24 ur po
izpostavitvi PEI ND. Diferencialno smo obarvali žive in mrtve celice ter jih prešteli.
Prikazana je standardna napaka (N=3)20
Slika 4: Delež živih in mrtvih celic CHO glede na negativno kontrolo (NK) 24 ur po
izpostavitvi PEI-glutation ND. Diferencialno smo obarvali žive in mrtve celice ter jih
prešteli. Prikazana je standardna napaka (N=3)21
Slika 5: Delež živih celic CHO 24 ur po izpostavitvi PEI in PEI-glutation ND. Diferencialno
smo obarvali žive in mrtve celice ter jih prešteli. Prikazana je standardna napaka
(N=3). * p < 0,0001
Slika 6: Delež živih celic CHO glede na negativno kontrolo (NK) 24 ur po izpostavitvi
različnim koncentracijam glutationa v hranilnem mediju. Diferencialno smo obarvali
žive in mrtve celice ter jih prešteli. Prikazana je standardna napaka (N=3)
Slika 7: Delež živih celic CHO glede na negativno kontrolo (NK) 24 ur po izpostavitvi
različnim koncentracijam glutationa v hranilnem mediju in v prisotnosti PEI ND s
končno koncentracijo 3 µg/ml. V pozitivni kontroli (PK) so bili PEI ND s končno
koncentracijo 3 µg/ml brez dodatka glutationa. Diferencialno smo obarvali žive in
mrtve celice ter jih prešteli. Prikazan je standardni odklon (N=2)
Slika 8: Količina ROS (% glede na negativno kontrolo (NK)) 24 ur po izpostavitvi celic CHO
PEI ND. V pozitivno kontrolo (PK) smo dodali H ₂ O ₂ do končne koncentracije 1 mM.
Prikazana je standardna napaka (N=3)
Slika 9: Količina ROS (% glede na negativno kontrolo (NK)) 24 ur po izpostavitvi celic CHO
PEI-glutation ND. V pozitivno kontrolo (PK) smo dodali H ₂ O ₂ do končne
koncentracije 1 mM. Prikazana je standardna napaka (N=3)
Slika 10: Vpliv koncentracije PEI ND in PEI-glutation ND na nastanek ROS glede na
negativno kontrolo (NK) 24 ur po izpostavitvi celic CHO ND. V pozitivno kontrolo
(PK) smo dodali H_2O_2 do končne koncentracije 1 mM. Prikazana je standardna napaka
(N=3). * p < 0.05, **p<0.0001
Slika 11: Metabolna aktivnost (% glede na negativno kontrolo (NK)) 24 ur po izpostavitvi
PEI ND. Prikazana je standardna napaka (N=3)
Slika 12: Metabolna aktivnost (% glede na negativno kontrolo (NK)) 24 ur po izpostavitvi

Slika 13: Vpliv različno oplaščenih ND na metabolno aktivnost celic CHO glede na negativno
kontrolo (NK) 24 ur po izpostavitvi ND. Prikazana je standardna napaka (N=3). * p <
0,0001, **p=0,008
Slika 14: Agregati PEI ND na površini celice CHO. Celice smo fiksirali 24 ur po izpostavitvi
5 μg/ml PEI ND. Merilo predstavlja 500 nm
Slika 15: PEI ND v veziklih znotraj celic CHO 24 ur po izpostavitvi 5 µg/ml PEI ND. Celice
smo fiksirali 24 ur po izpostavitvi. S puščico je označen večji agregat PEI ND na
zunanji strani celice. Merilo predstavlja 500 nm
Slika 16: PEI ND prosto v citoplazmi (puščica). Celice CHO so bile 1 uro izpostavljene 10
µg/ml PEI ND. Celice smo fiksirali 1 uro po izpostavitvi. Merilo predstavlja 250 nm.
Slika 17: Agregati PEI-glutation ND na površini celice CHO. Celice so bile 24 ur
izpostavljene 8 µg/ml PEI-glutation ND, fiksirali smo jih 24 ur po izpostavitvi. Merilo
predstavlja 1 μm
Slika 18: Z A in B sta označena endosoma, napolnjena s PEI-glutation ND. S puščico so
označeni ND na površini celic. Celice CHO so bile 24 ur izpostavljene 8 µg/ml PEI-
glutation ND. Celice smo fiksirali 24 ur po izpostavitvi. Merilo predstavlja 500 nm.37
Slika 19: Predvidoma s klatrini posredovana endocitoza (puščica). celice CHO so bile 24 ur
izpostavljene 8 µg/ml PEI-glutation ND. Celice smo fiksirali 24 ur po izpostavitvi.
Merilo predstavlja 500 nm

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

СНО	angl. Chinese hamster ovary cell – celice iz ovarija kitajskega hrčka		
DLS	angl. Dynamic light scattering –dinamično sipanje laserske svetlobe		
EDTA	etilendiamintetra ocetna kislina		
FBS	fetusni serum goveda		
HAM F12	hranilni medij		
HBSS	angl. Hank's balanced salt solution – uravnotežena raztopina soli		
IL-12	interlevkin 12		
LC ₅₀	angl. Lethal concentration – koncentracija, ki ubije 50 % celic		
MRI	slikanje z magnetno resonanco		
MTS test	kolorimetrični test metabolne aktivnosti		
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfat		
ND	nanodelci		
NK	negativna kontrola		
PAA	poliakrilna kislina		
PBS	fosfatni pufer s soljo		
PEG	polietilen glikol		
PEI	polietilen imin		
PEI ND	magnetni nanodelci s plaščem iz polietilen imina		
PEI-glutation	magnetni nanodelci s plaščem iz polietilen imina, dodatno oplaščeni z glutationom		
PI	propidijev jodid		
РК	pozitivna kontrola		

PMMA	polimetilmetakrilat
PVA	polivinil alkohol
ROS	angl. Reactive oxygen species – reaktivne kisikove zvrsti
SE	angl. Standard error – standardna napaka
TEM	presevna elektronska mikroskopija

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Nanotehnologija je veda, ki proučuje različne zvrsti in oblike materialov velikostnega reda med 1 in 1000 nm. Nanodelci (ND) so v vsaj eni dimenziji manjši od 100 nm. Bistvena razlika med delci večjih dimenzij in ND je razmerje med njihovo površino in prostornino. Pri ND se to razmerje prevesi krepko na stran površine, kar omogoča drugačne fizikalno-kemijske lastnosti, prav tako pa vpliva na interakcijo z biološkimi sistemi. Zaradi svojih lastnosti so ND izkazali izredno uporabnost v različnih biotehnoloških aplikacijah, npr: pri dostavi cepiv in učinkovitejšem vnosu kemoterapevtikov v rakave celice. Ena izmed podskupin ND so magnetni ND. Le ti se uporabljajo kot dostavni sistemi za zdravilne učinkovine, kot kontrastna sredstva pri slikanju z magnetno resonanco, za ločevanje molekul in pri hipertermiji. Vendar pa lastnosti ND v bioloških sistemih nimajo samo pozitivnih učinkov. Zaradi svoje majhnosti lahko prehajajo membrane, vstopajo v tkiva, celice in celične organele, se tam kopičijo ter kažejo različne toksične učinke. Problematična je tudi stabilnost magnetnih ND v vodnih okoljih. Magnetne ND za stabilizacijo in zmanjševanje toksičnosti oplaščimo z različnimi molekulami. Poleg zmanjšane toksičnosti in večje stabilnosti nam oplaščenje omogoča tudi možnost povezovanja z različnimi molekulami preko prostih funkcionalnih skupin, ki se nahajajo na površini zunanje plasti. Izkaže se, da tudi modificirani (oplaščeni) ND kažejo določeno stopnjo toksičnosti. Vzroki toksičnosti teh so relativno velika potencialno reaktivna površina, njihova sposobnost prečenja bioloških pregrad in slaba biorazgradljivost. Posledica je povečan oksidativni stres, ki lahko nadalje vodi v apoptozo in genotoksičnost.

Raziskovalno delo je bilo osredotočeno na analizo vpliva magnetnih ND, oplaščenih s polietileniminom (PEI-ND), na sesalske celice CHO v poskusih *in vitro*. PEI je polimer s številnimi amino skupinami in nosi presežek pozitivnega naboja. Na PEI-ND lahko elektrostatsko vežemo različne negativno nabite molekule, kar omogoča izredno uporabnost kot npr. magnetofekcijo. Pri marsikateri aplikaciji so potrebne relativno velike koncentracije PEI-ND, kar lahko omeji njihovo uporabo. Da bi ocenili povezave med koncentracijo PEI-ND

in škodljivimi učinki in le te zmanjšali, je potrebno podrobno poznavanje mehanizmov toksičnosti in metod, s katerimi le te ocenjujemo.

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Cilj magistrske naloge je bil preveriti različne mehanizme toksičnosti PEI-ND *in vitro* na sesalski celični liniji CHO. Nadalje smo preverjali ali bi lahko z dodatnim oplaščenjem z antioksidanti, ki bi lahko izkazali pozitiven vpliv, zmanjšali toksičnost PEI-ND v pogojih *in vitro*.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

Oblikovali smo naslednje hipoteze:

- Toksičnost PEI-ND je posledica nastanka reaktivnih kisikovih zvrsti, zato dodatno oplaščenje z antioksidanti zmanjša toksičnost le teh.
- Toksičnost PEI-ND je posledica velikega pozitivnega zeta potenciala (presežka pozitivno nabitih skupin na površini ND), zato lahko dodatno oplaščenje z negativno nabitimi molekulami zmanjša toksičnost le teh.

2 PREGLED OBJAV

2.1 NANODELCI (ND)

ND imajo zaradi svojih specifičnih lastnosti izjemen potencial v bioloških aplikacijah. Vzrok teh lastnosti leži v velikem razmerju med volumnom in površino ND, različnih optičnih in magnetnih lastnostih ter v številnih možnostih površinskih sprememb. Zaradi teh lastnosti so se ND v biomedicini in biotehnologiji izkazali uporabni v metodah ločevanja celic, pri vnosu nukleinskih kislin v celice, kot nosilni sistemi za dostavo učinkovin (npr. pri terapijah raka) in kot ojačevalci signala pri slikanju z magnetno resonanco (Gao in Xu, 2009).

Zanimiva podskupina so magnetni ND, ki so odzivni na zunanje magnetno polje. Sestavljajo jih magnetni elementi (železo, nikelj, kobalt) in njihovi oksidi. Tovrstni ND so se že izkazali uporabni pri slikanju z magnetno resonanco, tarčni dostavi zdravil, transfekciji (magnetofekciji), bioseparaciji in v tkivnem inženirstvu (Gupta A.K. in Gupta M., 2005; Gupta in sod., 2007).

Biomedicinske aplikacije zahtevajo magnetne ND velikosti do cca. 100 nm, lahko tudi več. Velikost mora biti čim bolj enotna (porazdelitev po velikosti mora biti čim ožja), biti morajo oplaščeni, hkrati pa ne smejo biti toksični in imunogeni (Chastellain in sod., 2004).

Pri magnetnih ND naletimo na pojav superparamagnetizma. Superparamagnetni delci kažejo magnetne lastnosti samo v prisotnosti magnetnega polja. Ob odsotnosti zunanjega magnetnega polja med delci ni magnetnih sil, ki bi jih sprijele skupaj. Ta lastnost še poveča primernost za uporabo v bioloških aplikacijah (Ozdemir in sod., 2006; Prijic in sod., 2012).

Magnetni ND se lahko razlikujejo v sestavi, obliki, velikosti in ne nazadnje tudi v oplaščenosti. Dokler govorimo o uporabnosti magnetnih ND, lahko na njih gledamo kot na neko celoto. Toksičnost in razporejanje ND po tkivih pri aplikacijah *in vitro* ter *in vivo* pa izpostavi razlike znotraj te velike skupine (Shubayev in sod., 2009).

2.1.1 Jedra

Osnova magnetnih ND je magnetno jedro. Jedra so različni oksidi magnetnih elementov. Primeri takšnih oksidov so magnetit (Fe₃O₄), maghemit (γ -Fe₂O₃) in kobalt ferit (CoFe₂O₄). Kemijske metode za sintezo magnetnih ND, uporabljenih v biomedicinskih aplikacijah, so: koprecipitacija, emulgiranje, sol-gel sinteza, sonokemična sinteza in sinteza z ionizacijo. Ne glede na uporabljeno metodo je potrebno za uspešno sintezo zagotoviti prave pogoje, treba je dosegati ponovljive rezultate ter se izogniti zahtevnim procesom čiščenja. Kljub širokemu izboru metod je najpogosteje izbrana metoda kemične koprecipitacije železovih soli. Ta omogoča sintezo velikih količin ND, vendar delci nimajo tako enotne velikosti, kot pri nekaterih drugih metodah. Na velikost in obliko ND lahko vplivamo s spreminjanjem pH, ionske moči, temperature, uporabljenih soli in z razmerjem Fe²⁺/ Fe³⁺ (Salazar-Alvarez in sod., 2006).

Gola jedra iz železovih oksidov oksidirajo, sprožajo nastanek reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) in so nagnjeni k agregaciji. Jedra lahko napravimo funkcionalna z nanašanjem dodatnih plasti, oplaščenjem. (Kayal in sod., 2010).

2.1.2 Oplaščenje

Oplaščenje magnetnih ND z različnimi molekulami (npr. z nabitim polimerom) stabilizira delce, jih naredi topne v vodnem okolju, skrije magnetna jedra pred neželenimi interakcijami in omogoči učinkovitejšo dostavo molekul v celico (Roohi in sod., 2012).

Stabilizacija z oplaščenjem je ključni korak sinteze magnetnih ND, saj onemogoči tvorbo agregatov pod vplivom zunanjega magnetnega polja ter agregacijo v bioloških okoljih. Laurent in sod. (2008) omenjajo dva glavna mehanizma stabilizacije: elektrostatski odboj in sterično oviranje (Slika 1).





Oplaščenje tudi poveča stabilnost magnetnih ND pri večji ionski moči (Pavlin in Bregar, 2012).

Plašč okoli jedra lahko še dodatno oplaščimo s karboksilnimi skupinami, karbodiimidom, biotinom, avidinom in z drugimi molekulami ter tako spet spremenimo funkcijo magnetnega nanodelca. Te skupine lahko nadalje služijo kot tarčna mesta za vezavo citostatikov, protiteles, nukleinskih kislin in podobno (Mahmoudi in sod., 2011).

Poleg povečane temperaturne in kemične stabilnosti se oplaščenim ND zmanjša toksičnost, izboljšajo se možnosti za konjugacijo, ND postanejo bolj kompatibilni z biološkimi sistemi (Liu in sod., 2010).

Chatterjee in sod. (2014) navajajo več različnih polimerov, primernih za oplaščenje magnetnih ND: hitosan, polietilen glikol (PEG), polietilen imin (PEI), polimetilmetakrilat (PMMA) in poliakrilna kislina (PAA). Laurent in sod. (2008) kot najpogosteje uporabljene materiale omenjajo dekstran, škrob, arabinogalaktan, polietilen glikol (PEG) in polivinil alkohol (PVA).

PEI je pozitivno nabit polimer, ki se pri biotehnoloških in biomedicinskih aplikacijah uporablja kot dostavni sistem za negativno nabite molekule (Benjaminsen in sod., 2012). Vsak tretji atom makromolekule PEI se lahko protonira, zato ima ta ogromno pufersko kapaciteto pri kateremkoli pH. Zaradi svojih lastnosti je primeren za uporabo v genski terapiji (Boussif in sod., 1995). Kot navajajo Laurent in sod. (2008), lahko magnetne nanodelce oplaščimo s PEI. PEI tvori kationske komplekse, ki nespecifično reagirajo z negativno nabitimi molekulami,

npr. z DNA. S PEI oplaščeni ND so stabilni pri visokih koncentracijah soli v širokem območju pH.

Glutation je tiolni tripeptid, prisoten v vseh sesalskih celicah. Sestoji iz glutaminske kisline, cisteina in glicina. Funkcionalno je endogeni antioksidant, ki kot substrat glutationperoksidaze omogoči odstranitev reaktivnih kisikovih zvrsti v celici. Superoksid-dismutaza je encim, ki superoksidni radikal pretvori v vodikov peroksid. Glutation-peroksidaza s povezavo dveh molekul glutationa z disulfidnim mostičkom reducira vodikov peroksid, nastane voda. Encim glutation-reduktaza je odgovoren za recikliranje reduciranega glutationa v celicah ob hkratni oksidaciji NADPH (Noctor in sod., 2012; Meister, 1985). Morris in sod. (2013) trdijo, da lahko reducirano obliko glutationa vnašamo kot terapevtsko učinkovino. Kot primer navajajo direkten vnos glutationa na respiratorni epitelij v obliki aerosola.

2.1.3 Karakterizacija ND

Nanodelcem moramo določiti velikost in zeta potencial, ki omogočata primerjanje različnih ND in potrjevanje ponovljivosti sinteze. Tudi magnetne lastnosti so odvisne od velikosti in oblike delcev ter njihove mikrostrukture. Obnašanje ND v bioloških okoljih je prav tako odvisno od velikosti in oblike, pomembna pa sta tudi naboj in narava plašča, ki obdaja jedro. Kompleksnost karakterizacije ND lahko ponazorimo na primeru velikosti: ko govorimo o enem nanodelcu lahko izmerimo velikost kristaliničnega dela jedra, velikost celega jedra, velikost oplaščenega jedra ali hidrodinamski premer nanodelca (Kobayashi in sod., 2005).

2.1.3.1 Zeta potencial

Nabit delec se v raztopini elektrolita pod vplivom električnega polja giblje. Med nabitim delcem in raztopino elektrolita se ustvari strižna ploskev, potencial na tej ploskvi imenujemo zeta potencial. Površina nabitega delca je prekrita z nasprotno nabitimi ioni (Sternova plast), sledi še zunanja, difuzna plast ionov. Ti dve plasti sestavljata t.i. električni dvosloj. Merimo hitrost nabitega delca skozi elektrolit proti elektrodi, v prisotnosti zunanjega električnega polja. Velja, da so delci z zeta potencialom večjim od +30 mV ali manjšim od -30 mV stabilni,

delci z zeta potencialom okoli 0 mV pa so nagnjeni k agregaciji in posedanju (Pons in sod., 2006).

2.1.3.2 Dinamično sipanje laserske svetlobe (DLS)

Z metodo dinamičnega sipanja laserske svetlobe merimo sipanje svetlobe laserskega žarka skozi kiveto, ki vsebuje suspenzijo ND. Temelji na sipanju laserske svetlobe na delcih v tekoči fazi, kar poznamo tudi pod imenom Rayleighjevo sipanje. Sipanje je posledica Brownovega gibanja delcev, ki so precej manjši od valovne dolžine laserske svetlobe. S to tehniko lahko določamo različne karakteristike: hidrodinamski premer, obliko, strukturo in stopnjo agregacije. Metoda je uporabna v velikostnem redu ND od 1 nm pa vse do 3 µm. Glavne prednosti so točnost določanja hidrodinamskih premerov, hitrost metode, ne-invazivnost in relativno nizka cena (Pons in sod., 2006; Fillipe in sod., 2010).

2.1.3.3 Presevna elektronska mikroskopija (TEM)

Presevna elektronska mikroskopija je ena izmed najpogosteje uporabljenih tehnik za karakterizacijo ND. V principu spremljamo snop elektronov, ki se obnaša odvisno od vzorca, skozi katerega prehaja. V vzorcu lahko ločimo različne strukture. Rezultat je slika objekta, iz katere lahko določimo obliko in velikost ND ter stopnjo agregacije in disperzije. Ločljivost TEM znaša približno 1 nm in je odvisna od uporabljenega mikroskopa. Prednost TEM je poleg dobre ločljivosti tudi možna sklopitev z drugimi metodami, npr. z rentgensko spektroskopijo. Za analizo mora biti vzorec v visokem vakuumu, ultratanke rezine vzorca morajo biti debele 50 do 70 nm. Analiziran vzorec je tekom priprave izpostavljen razmeram, ki lahko vplivajo na same rezultate karakterizacije in so lahko vzrok za artefakte. Poleg tega celoten proces traja precej dolgo. Dolga izpostavljenost močnim snopom elektronov lahko poškoduje vzorec (Wang in sod., 2011).

2.1.4 Aplikacije

Magnetne ND lahko na več različnih načinov uporabimo tako v biologiji, kot tudi v medicini. Ena izmed najbolj obetavnih uporab magnetnih ND je vsekakor molekularno prikazovanje, kar kažejo tako študije in vitro kot in vivo. Konjugirane magnetne ND lahko specifično dostavljamo do tarče in jih nato detektiramo s slikanjem z magnetno resonanco (MRI). S protitelesi konjugirani ND so bili uspešno tarčno dostavljeni s ciljanjem na različne receptorje na površini celic. Poleg protiteles lahko ND konjugiramo s peptidi in drugimi malimi molekulami, ki se specifično povezujejo z želeno tarčo. Peptide lahko izbiramo iz obsežnih knjižnic naključnih sekvenc s pomočjo predstavitve na fagu. Omejitev predstavlja iskanje molekul, ki specifično ciljajo posamezne tarče in meja detekcije ND z MRI (Gupta A.K. in Gupta M., 2005). Gao in Xu (2008) omenjata magnetne ND kot kontrastno sredstvo za MRI. Magnetne lastnosti omogočajo specifično usmerjanje ND z zunanjim magnetnim poljem, kar omogoča koncentriranje magnetnih ND samo na izbranem delu telesa, tkivu ali celo celici. Na ND lahko vežemo fluorescentna barvila in tako spremljamo njihovo lokacijo (Gao in sod., 2008). Dai in sod. (2014) poročajo o uspešni aplikaciji s PEG oplaščenimi magnetnimi ND. ND so intravenozno vbrizgali v miši in pokazali, da so takšni magnetni ND uporabni kot ojačevalci signala za MRI.

Laurent in sod. (2008) kot drugo najpomembnejšo aplikacijo navajajo ločevanje celic ali proteinov s pomočjo dodatno oplaščenih magnetnih ND. Primer uporabe je dodatno oplaščenje z biotinom, ki omogoča izolacijo avidina ob pomoči magnetnega polja.

Možna je tudi uporaba magnetnih ND za magnetofekcijo. Prijič in sod. (2012) so pokazali uspešno magnetofekcijo celične linije B16F1 z magnetnimi ND, dvojno oplaščenimi s PAA in PEI in dodatno oplaščenimi s plazmidno DNA za zeleni fluorescirajoči protein. Vnos plazmidne DNA z magnetofekcijo je bil primerljiv vnosu z elektroporacijo. V isti študiji je opisana magnetofekcija plazmidne DNA v tumor mišjega adenokarcinoma in zdravljenje adenokarcinoma s tarčno dostavo gena za IL-12 z magnetnimi ND in usmerjanjem z zunanjim magnetnim poljem.

Več avtorjev navaja uporabo magnetnih nanosistemov za tarčno dostavljanje zdravilnih učinkovin (Prijič in sod., 2012; Gao in Xu 2009; Laurent in sod., 2008). Jalalian in sod. (2013) poročajo o učinkovitem zmanjšanju volumnov tumorjev rakavih celic debelega črevesja *in vivo* na miših. Tarčno ciljanje so dosegli z aptameri, specifičnimi za tumorske celice. Celotni kompleks so sestavljali aptamer kot sonda, epirubicin kot zdravilna učinkovina (citostatik) in magnetni ND kot nosilna molekula.

Hipertermija je ena izmed metod za uničevanje tumorskih celic z malo stranskimi učinki, kadar je aplicirana lokalno. Magnetne ND lahko lokalno vbrizgamo v tumor, tega izpostavimo zunanjemu magnetnemu polju, kar povzroči premikanje ND in segrevanje njihove okolice. Takšna metoda zdravljenja se uporablja v klinični praksi za zdravljenje multiformnega glioblastoma (Thiesen in Jordan, 2008).

2.2 CELIČNA LINIJA CHO

Celice CHO so trajna celična linija pridobljena iz ovarija kitajskega hrčka (Puck in sod., 1958). Celična linija je že bila uporabljena za spremljanje internalizacije oplaščenih ND (Pavlin in sod., 2013).

2.3 POTI VSTOPA ND V CELICO

V večini primerov morajo ND vstopiti v celico, da lahko opravijo želeno funkcijo. Glavni mehanizem vstopa ND v celico je endocitoza. Povečan vnos v tarčne celice lahko dosežemo tudi z usmerjanjem z magnetnim poljem ali s tarčnim ciljanjem (Sahay in sod., 2010; Prijic in sod., 2012). Vstopanje ND v celico je odvisno od različnih dejavnikov, med njimi so najpomembnejši dejavniki: tip celice v katere ND vstopajo in velikost ter naboj ND. Pozitivno nabiti ND zaradi elektrostatskih interakcij z membrano bolje prehajajo skoznjo, kot nevtralni oz. negativno nabiti ND iste velikosti. Pri vnosu ND v tumorje je potrebno upoštevati njihovo heterogeno celično sestavo. Pogosto pozabljamo, da je vstopanje ND v celico odvisno tudi od celične gostote (Iversen in sod., 2011). Iversen in sod. (2011) kot glavni mehanizem vstopanja ND v celico opisujejo endocitozo. Gre za proces vstopanja snovi v celico s pomočjo uvihanja membrane. V grobem lahko endocitozo razdelimo na fagocitozo in pinocitozo. Pinocitozo delimo na s klatrini posredovano endocitozo, s kaveolini posredovano endocitozo, makropinocitozo in druge, manj raziskane poti vstopanja v celico (Sudha Kumari in Mayor, 2010; Lojk in sod., 2013). Bregar in sod. (2013) poročajo o dveh različnih načinih vstopanja s PAA oplaščenih magnetnih ND v celice CHO. ND vstopajo v celice z makropinocitozo in s klatrini posredovano endocitozo. Pogostejša je makropinocitoza, s katero v celico vstopajo večje količine ND.

V pregledu objav smo se v prvi in drugi točki osredotočali na magnetne nanodelce v širšem smislu. V točkah, ki sledijo, bo poudarek na specifičnih magnetnih ND, oplaščenih s PEI (PEI-ND), ki so osnova vsem poskusom, predstavljenim v nadaljnjih poglavjih te naloge.

2.4 MEHANIZMI TOKSIČNOSTI ND, OPLAŠČENIH S PEI

Pri nekaterih aplikacijah *in vitro* in *in vivo* so potrebne visoke koncentracije s PEI oplaščenih magnetnih ND, kar povzroči toksične učinke v bioloških sistemih. Hoskins in sod. (2012) navajajo dva mehanizma toksičnosti PEI-ND; oksidativni stres in poškodbe membrane. Calatayud in sod. (2013) so pokazali, da je citotoksičnost PEI-ND odvisna od koncentracije in časa inkubacije. V isti študiji so pokazali, da PEI-ND povzročajo poškodbe celične membrane in da vstopajo v citosol. Hunter (2006) kot možne citotoksične učinke PEI navaja poškodbe membrane in sprožanje apoptoze. Ta je lahko posledica lizosomskega pobega, saj se ob poškodbi lizosomov v citoplazmo sproščajo tudi lizosomske proteaze, ki dokazano sprožajo apoptozo (Roberg in sod., 2002).

2.4.1 Reaktivne kisikove zvrsti

Izraz reaktivne kisikove zvrsti (ROS) je v biomedicinski literaturi uporabljen za proste kisikove radikale in nekatere druge molekule, ki vsebujejo kisik (Preglednica 1). Običajno se elektroni v molekulah nahajajo v parih. Prosti radikal je katerakoli molekula, ki lahko obstoja z enim ali več prostimi elektroni. Pri kisikovih radikalih se prosti elektron nahaja na kisiku. Primer takšnih radikalov sta superoksidni radikal $(O_2^- \cdot)$ in hidroksilni radikal $(OH \cdot)$. Pri dušikovem oksidu $(NO \cdot)$ se prosti elektron nahaja med dvema atomoma. Proste radikale označujemo s piko (\cdot) . Če se povežeta dva radikala nastane manj reaktivna spojina, vendar obstajajo izjeme. Če radikal reagira z molekulo brez prostih elektronov nastane nov prosti radikal. V bioloških sistemih lahko reaktivni kisikov radikal sproži peroksidacijo lipidov, nastali radikali lahko poškodujejo membranske proteine. Hidroksilni radikal lahko reagira z gvaninom v DNA, nastane nov radikal 8-hidroksi gvanin, ki je odgovoren za transverzijo GC \rightarrow TA (Halliwell, 2005).

Radikali	Formula	Spojine brez prostega elektrona	Formula
Superoksidni radikal	O_2 .	Vodikov peroksid	H_2O_2
Hidroksilni radikal	OH·	Hipoklorit	HOC1
Peroksilni radikal	RO ₂ ·	Hipobromid	HOBr
Aloksilni radikal	RO	Ozon	O ₃
Hidroperoksilni radikal	HO ₂ ·	Kisik v singletnem stanju	O ₂ *
Dušikov oksid	NO·	Dušikova(III) kislina	HNO ₂

Preglednica 1: Reaktivne kisikove zvrsti in spojine brez prostega elektrona (Halliwell, 2005: 2)

2.4.2 Oksidativni stres

V bioloških sistemih so prosti radikali stalno prisotni. Izvor prostih radikalov je "puščanje" elektronskih prenašalcev v verigi celičnega dihanja in izpostavljenost ionizacijskemu sevanju. Prosti radikali reagirajo na mestu nastanka z lipidi, proteini in nukleinskimi kislinami. Nekateri prosti radikali samo škodijo ($OH \cdot$), medtem ko imajo drugi tudi svojo namembnost - $NO \cdot$ ima pomembno vlogo v imunskem odzivu. V stabilnem biološkem sistemu so prosti radikali in antioksidanti, njihovi antagonisti, v približnem ravnotežju. Poškodbe, ki nastanejo ob neuravnoteženem stanju, odpravijo popravljalni mehanizmi celice. Oksidativni stres je posledica porušenja ravnotežja med ROS in antioksidanti. Do porušitve pride zaradi:

- zmanjšane aktivnosti encimov, ki sodelujejo pri pretvorbi prostih radikalov (mutacije, toksini z neposrednim vplivom na encim),
- povečanega nastanka ROS zaradi vnosa prekurzorjev za nastanek ROS ali zaradi povečane aktivacije endogenih sistemov nastanka ROS (kronično vnetje) (Halliwell, 2005).

Organizem se lahko ob kronični izpostavljenosti povečanim koncentracijam ROS prilagodi z večjo aktivnostjo antioksidativnih sistemov. Ob akutni izpostavljenosti pride do poškodb DNA, proteinov in lipidov, ki se lahko končajo tudi s celično smrtjo. V primeru celične smrti

preko nekroze, ko celica nabrekne in poči, se oksidativni stres v okolju še poveča (Halliwell, 2005).

Gonzalez in sod. (2008) navajajo nastanek ROS kot pomemben mehanizem toksičnosti ND, ki vodi v oksidativni stres. Nastanek ROS je odvisen od materiala, iz katerega izhajajo ND. Wang (2011) in Liu (2013) poročata o toksičnosti golih ND železovega oksida preko mehanizmov ROS.

2.4.3 Sprostitev ND v citoplazmo

Ena izmed glavnih prednosti uporabe PEI za oplaščenje ND je njegova sposobnost prehajanja iz veziklov, s katerimi vstopa v celico, v citoplazmo. Mehanizem se izkorišča za transfekcijo in dostavo zdravilnih učinkovin v citoplazmo (Boussif in sod., 1995). Kako PEI zapusti lizosom je bilo in še vedno je tema različnih hipotez. Behr je leta 1997 predstavil hipotezo lizosomskega pobega (angl. proton-sponge hypothesis), ki pravi, da kompleksi PEI z DNA v celico vstopajo z endocitozo, zaradi presežka pozitivnih nabojev interagirajo s celično membrano in se posledično nakopičijo v lizosomih. Notranjost teh organelov je kisla, kar omogoča učinkovito delovanje lizosomskih encimov. Velika puferska kapaciteta PEI dvigne pH lizosoma, kar spodbudi prečrpavanje protonov v njegovo notranjost. Ob aktivnem vnosu protonov vstopajo v lizosom tudi kloridni ioni in voda, kar ob nadaljnji puferski aktivnosti PEI povzroči povečanje pritiska, ki vodi do poškodb membrane organela. PEI preko poškodovane lizosomske membrane vstopa v citoplazmo. Benjaminsen in sod. (2012) so pokazali, da se PEI po transfekciji nahaja v lizosomih, manjša količina pa tudi prosto v citoplazmi. V isti študiji so potrdili hipotezo lizosomskega pobega, hkrati navajajo še druge, kot trdijo, bolj verjetne mehanizme sproščanja PEI v citoplazmo. Zaradi zelo majhnega deleža PEI v citoplazmi v primerjavi z deležem v lizosomih predpostavljajo, da PEI uhaja v citoplazmo med zlivanjem endosoma z lizosomom. Tretja možnost izhajanja PEI so mikro poškodbe membrane (pore), ki nastanejo kot rezultat interakcije PEI z membrano.

2.5 ZMANJŠEVANJE TOKSIČNOSTI

Toksičnost ND železovega oksida se, kot je opisano zgoraj, zmanjšuje z oplaščenjem. S tem dosežemo popolno inertnost železovega oksida, pojavi pa se lahko toksičnost, ki jo inducira polimer plašča. V literaturi je na to temo zapisanega zelo malo.

Nimesh in sod. (2006) so uspeli popolnoma zmanjšati toksičnost PEI ND s kovaletnim dodajanjem PEG na njegovo površino. Hkrati so ohranili sposobnost transfekcije. Parhamifar in sod. (2010) ugotavljajo, da je v bodočih študijah za celovito razumevanje toksičnosti polikationov potreben bolj sistematičen pristop.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Celična linija

Vsi poskusi so bili izvedeni s celično linijo CHO (Chinese Hamster Ovary Cells).

3.1.2 Hranilni medij

- Hranilni medij HAM F12 (Ham's tissue culture medium for mammalian cells; HAM) z dodatkom 10 % fetalnega govejega seruma (FBS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Nemčija), 0,5 % L-glutamina (Sigma-Aldrich), 0,1 % gentamicina (PAA Laboratories, Pasching, Austria) in 0,01 % penicilina (PAA Laboratories);
- hranilni medij HAM F12 z dodatkom različnih koncentracij glutationa (0,05 mM, 0,5 mM in 5 mM) (L-glutathione reduced, Sigma-Aldrich).

3.1.3 Oprema

Preglednica 2: Pregled uporabljene opreme

Oprema	Proizvajalec
Malvern Zetasizer Nano	Malvern Industries
Flourescenčni mikroskop Zeiss Axiovert 200	Zeiss
Presevni elektronski mikroskop JEM-100 CX	JEOL
Tecan Infinite 200	Tecan Group
Zeta meter (Nanosizer)	Malvern Industries
Sonifikator	Hielscher
Tehtnica za merjenje koncentracije ND	Radwag

3.2 METODE

3.2.1 Sinteza ND

Kobalt feritna jedra (CoFe₂O₄) so bila pripravljena s koprecipitacijo, kot je opisano v člankih Bregar in sod. (2013) ter Pavlin in Bregar (2012). ND smo oplaščili s PEI. ND so bili ustrezno karakterizirani z metodo DLS in z metodo merjenja površinskega naboja z zeta metrom.

3.2.2 Gojenje celic

Vsi poskusi so bili izvedeni *in vitro* na celični liniji CHO. Celice smo gojili v gojitvenih stekleničkah in mikrotiterskih ploščah s 24 in 96 jamicami (Corning Inc., NY, ZDA), v CO₂ inkubatorju pri temperaturi 37 °C v 5 % CO₂. Vse poskuse smo izvedli v hranilnem mediju HAM F12 z 10 % FBS, z začetno koncentracijo celic 1 x 10⁵ celic/ml. Nasajene celice smo po 24 urah gojenja izpostavili različnim koncentracijam ND za nadaljnjih 24 ur. Po inkubaciji smo medij z ND odsesali in izvedli spodaj opisane analize.

Celice smo presajali, ko so dosegle 80-90 % konfluentnost. Celicam smo odsesali medij, jih sprali s fiziološko raztopino in dodali segreto raztopino tripsina ter inkubirali dve minuti. Po inkubaciji smo tripsinizacijo ustavili s hranilnim medijem HAM F12, ki je vseboval 10 % FBS. Celice smo šteli s hemocitometrom in jih presajali v želenih koncentracijah.

3.2.3 Določanje viabilnosti z diferencialnim barvanjem

Celice smo gojili v mikrotiterskih ploščah s 24 jamicami (Corning Inc., NY, ZDA) in jih 24 ur inkubirali z PEI ND in PEI-glutation ND v različnih koncentracijah (1-20 μ g/ml). Po inkubaciji smo odsesali medij z ND. Za določanje viabilnosti smo celice barvali z barvilom Hoechst (30 minut) in barvilom propidijev jodid (PI) (5 minut). S fluorescenčnim mikroskopom smo zajeli po 20 slik vsakega vzorca. Barvilo Hoechst flourescira po vezavi na DNA, iz posnetih slik lahko določimo število vseh celic. Barvilo propidijev jodid po petih minutah preide samo poškodovane membrane mrtvih celic, zato nam da podatek o deležu mrtvih celic na slikah (Jones in Senft, 1985). Viabilnost smo določili z razmerjem števila celic med tretiranimi vzorci in kontrolo, ki ni bila izpostavljena ND.

3.2.4 Določanje metabolne aktivnosti celic s testom MTS

Metabolno aktivne celice reducirajo tetrazolijevo bavilo (reagent MTS) v obarvan formazan. Večja metabolna aktivnost pomeni več netopnega formazana in večjo izmerjeno absorbanco (Cory in sod., 1991).

Celice z začetno koncentracijo 1 x 10^5 celic/ml smo gojili v mikrotiterski plošči s 96 jamicami (Corning Inc., NY, USA) in jih 24 ur inkubirali z različnimi koncentracijami ND (2-10 µg/ml). V vsaki jamici je bilo 100 µl medija s celicami. Po inkubaciji smo odsesali medij z ND. V jamice smo dodali po 100 µl svežega medija. Uporabili smo kit za določanje viabilnosti celic s kolorimetrično metodo (Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, USA) in delali po navodilih proizvajalca. Absorbanco smo merili po 90 in 120 minutah, pri 490 nm z napravo Tecan Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Switzerland). Negativna kontrola ni bila izpostavljena ND. Rezultate smo predstavili kot odstotek relativne absorbance v primerjavi z negativno kontrolo.

3.2.5 Določanje reaktivnih kisikovih zvrsti

Prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti smo določali s standardnim kitom (CM-H₂DCFDA, Invitrogen), ki vsebuje CM-H₂DCFDA reagent. CM-H₂DCFDA difundira v celico, kjer reagira z znotrajceličnimi esterazami, kar prepreči difuzijo nazaj v celično zunanjost. CM-H₂DCFDA je znotraj celice tarča oksidacije s strani reaktivnih kisikovih zvrsti, nastane fluorescirajoči DCF, ki ga detektiramo z merjenjem fluorescence. Valovna dolžina eksitacijske svetlobe je 492 nm, emisijo svetlobe merimo pri 527 nm.

Celice z začetno koncentracijo 1 x 10^5 celic/ml smo gojili v mikrotiterski plošči s 96 jamicami (Corning Inc., NY, USA) in jih 24 ur inkubirali z različnimi koncentracijami ND (2-10 µg/ml). V vsaki jamici je bilo 100 µl medija s celicami. Po inkubaciji smo odsesali medij z ND in uporabili CM-H₂DCFDA po navodilih proizvajalca. Celice smo z barvilom inkubirali 45 min, fluorescenco smo merili pri 527 nm z napravo Tecan Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Switzerland). Negativna kontrola ni bila izpostavljena ND. Kot pozitivno kontrolo smo namesto ND uporabili 1 mM vodikov peroksid v PBS in ga dodali celicam v enakem volumnu

kot ND ter izvedli vse postopke enako. Rezultate smo predstavili kot odstotek relativne fluorescence v primerjavi z negativno kontrolo.

3.2.6 Določanje načinov internalizacije ND s pomočjo TEM

S presevno elektronsko mikroskopijo smo natančno določili, v katerih predelih celice se nahajajo ND in poskušali določiti poti internalizacije. Celice smo 24 ur inkubirali z ND ter jih fiksirali z mešanico formaldehida in glutaraldehida. Sledilo je vklapljanje vzorcev v smolo Epon 812 (Electron microscopy sciences, Hatfield, PA, ZDA). Ultratanke rezine smo barvali z uranil acetatom in svinčevim citratom, da smo dosegli ustrezen kontrast, ter jih opazovali s presevnim elektronskim mikroskopom JEM-100 CX (JEOL, Tokyo, Japonska).

3.2.7 Statistične metode

Izvedli smo dvosmerno analizo variance (dvosmerna ANOVA) za primerjavo razlik med posameznimi skupinami. Uporabili smo Holm-Sidakov test. Rezultati so predstavljeni kot povprečja ± standardna napaka (SE) ali standardni odklon (SD). Statistične analize smo opravili s programom GraphPad Prism 6.

4 REZULTATI

4.1 KARAKTERIZACIJA ND

PEI in PEI-glutation ND so bili karakterizirani z metodo dinamičnega sipanja laserske svetlobe in merjenjem zeta potenciala. Meritev je bila izvedena na ND, suspendiranih v mediju HAM F12 z dodanim 10 % FBS.

Preglednica 3: Zeta potencial ND

ND	Zeta potencial [mV]
PEI ND	50
PEI-glutation ND	40

Z vezavo glutationa na PEI ND (PEI-glutation ND) se je zeta potencial zmanjšal za 10 mV.



Slika 2: Porazdelitev hidrodinamskega premera ND v hranilnem mediju HAM F12 z dodatkom 10 % FBS, določeno z metodo DLS

Iz grafa na Sliki 2 je razvidno, da so PEI in PEI-glutation ND različno veliki, kar posredno potrjuje vezavo glutationa na PEI ND. Razlika v velikosti je posledica različne interakcije ND z molekulami hranilnega medija z 10 % FBS.

4.2 DOLOČANJE DELEŽA ŽIVIH IN MRTVIH CELIC

Delež živih in mrtvih celic smo določali z barvanjem z barviloma Hoechst in PI. Celice CHO smo za 24 ur izpostavili PEI ali PEI-glutation ND, po inkubaciji smo ND odstranili. Sledilo je zajemanje slik s fluorescenčnim mikroskopom. Prešteli smo žive in mrtve celice ter rezultate predstavili v odstotkih celic glede na negativno kontrolo. Negativna kontrola ni bila izpostavljena ND.



Slika 3: Delež živih in mrtvih celic CHO glede na negativno kontrolo (NK) 24 ur po izpostavitvi PEI ND. Diferencialno smo obarvali žive in mrtve celice ter jih prešteli. Prikazana je standardna napaka (N=3).

Na zgornjem grafu (Slika 3) je predstavljena viabilnost celic po 24 urni inkubaciji z naraščajočo koncentracijo PEI ND. Viabilnost celic pada z naraščanjem koncentracije PEI ND. Viabilnost pade že pri najnižjih koncentracijah PEI ND (1-3 μ g/ml). Največji padec viabilnosti med posameznima koncentracijama opazimo pri prehodu iz 4 μ g/ml na 5 μ g/ml, viabilnost pade za približno 20 %. Koncentracija, ki deluje citotoksično na 50 % celic (LC₅₀) je med 5 μ g/ml in 6 μ g/ml. Pri najvišjih koncentracijah PEI ND (8-10 μ g/ml) viabilnost stagnira pri približno 10 % glede na kontrolo. Ustrezno s padanjem števila živih celic narašča število mrtvih.



Slika 4: Delež živih in mrtvih celic CHO glede na negativno kontrolo (NK) 24 ur po izpostavitvi PEIglutation ND. Diferencialno smo obarvali žive in mrtve celice ter jih prešteli. Prikazana je standardna napaka (N=3).

Na Sliki 4 je predstavljena viabilnost celic po 24 urni inkubaciji z naraščajočo koncentracijo PEI-glutation ND. Podobno kot pri PEI ND, tudi tukaj opazimo trend padanja viabilnosti z naraščanjem koncentracije PEI-glutation ND, z izjemama pri koncentracijah 2 µg/ml in 4

 μ g/ml, kjer viabilnost celo naraste. LC₅₀ je med 8 μ g/ml in 10 μ g/ml, med tema dvema koncentracijama zaznamo največji padec viabilnosti. Pri koncentraciji 14 μ g/ml je viabilnost glede na kontrolo 10 %, pri koncentraciji 18 μ g/ml pa le še 5 %.



Slika 5: Delež živih celic CHO 24 ur po izpostavitvi PEI in PEI-glutation ND. Diferencialno smo obarvali žive in mrtve celice ter jih prešteli. Prikazana je standardna napaka (N=3). * p < 0,0001.

Na naslednjem grafu (Slika 5) vidimo primerjavo prej opisanih rezultatov. Lahko rečemo, da je viabilnost celic pri višjih koncentracijah boljša ob izpostavljenosti PEI-glutation ND, pri nižjih pa je primerljiva. Največje razlike v viabilnosti so vidne pri koncentracijah 6 μ g/ml, viabilnost celic izpostavljenih PEI-glutation ND je pri tej koncentraciji še enkrat večja kot pri celicah, ki so bile izpostavljene PEI ND. Pri koncentraciji 8 μ g/ml je viabilnost celic šestkrat večja v korist PEI-glutation ND. Pri koncentracijah 6 in 10 μ g/ml so razlike statistično značilne. Iz tega bi lahko sklepali na zaščitno vlogo glutationa, zato smo preverili vpliv samega glutationa na viabilnost celic.

V naslednjih dveh poskusih (Slika 6, Slika 7) smo preverili vpliv glutationa v hranilnem mediju. Celice smo inkubirali z različnimi koncentracijami prostega glutationa v hranilnem mediju, z dodanimi PEI ND s končno koncentracijo 3 µg/ml (Slika 7) in brez PEI ND (Slika 6). Negativna kontrola (NK) so bile celice v hranilnem mediju brez dodanega glutationa, pozitivna kontrola (PK; Slika 7) pa celice v hranilnem mediju brez dodanega glutationa, z dodanimi PEI ND v končni koncentraciji 3 µg/ml. Prikazane so žive celice.



Slika 6: Delež živih celic CHO glede na negativno kontrolo (NK) 24 ur po izpostavitvi različnim koncentracijam glutationa v hranilnem mediju. Diferencialno smo obarvali žive in mrtve celice ter jih prešteli. Prikazana je standardna napaka (N=3).

Na Sliki 6 je prikazan vpliv različnih koncentracij glutationa na celice. Glutation v vseh treh preverjenih koncentracijah izkaže negativen vpliv na viabilnost celic. Pri 0,05 mM in 0,5 mM koncentraciji pade viabilnost na 75 %, pri 5 mM koncentraciji pa na 55 %.



Slika 7: Delež živih celic CHO glede na negativno kontrolo (NK) 24 ur po izpostavitvi različnim koncentracijam glutationa v hranilnem mediju in v prisotnosti PEI ND s končno koncentracijo 3 μ g/ml. V pozitivni kontroli (PK) so bili PEI ND s končno koncentracijo 3 μ g/ml brez dodatka glutationa. Diferencialno smo obarvali žive in mrtve celice ter jih prešteli. Prikazan je standardni odklon (N=2).

Slika 7 prikazuje vpliv glutationa na celice CHO ob hkratni prisotnosti PEI ND (3 μ g/ml) v hranilnem mediju. Najmanjša koncentracija glutationa v hranilnem mediju (0,05 mM) izkaže toksičen učinek, vendar je ta manjši, kot je toksičen učinek PEI ND. Pri višjih koncentracijah glutationa je toksičen učinek v primerjavi s PEI ND večji. Viabilnost pozitivne kontrole je 75 % glede na kontrolo in je primerljiva z rezultati iz grafa na Sliki 4 pri isti koncentraciji PEI ND (3 μ g/ml).

4.3 DOLOČANJE REAKTIVNIH KISIKOVIH ZVRSTI

Reaktivne kisikove zvrsti smo merili z namenom potrjevanja vzrokov toksičnosti. Prisotnost reaktivnih kisikovih zvrsti smo merili po 24 urni inkubaciji celic z različnimi koncentracijami PEI ND in PEI-glutation ND. Rezultati so predstavljeni kot odstotek ROS glede na količino ROS v negativni kontroli. Negativna kontrola so bile celice v hranilnem mediju HAM F12. Pozitivna kontrola so bile celice v hranilnem mediju HAM F12, z dodanim H₂O₂ v končni koncentraciji 1 mM.



Slika 8: Količina ROS (% glede na negativno kontrolo (NK)) 24 ur po izpostavitvi celic CHO PEI ND. V pozitivno kontrolo (PK) smo dodali H_2O_2 do končne koncentracije 1 mM. Prikazana je standardna napaka (N=3).

Graf na Sliki 8 prikazuje odvisnost nastajanja reaktivnih kisikovih zvrsti od koncentracije PEI ND. Pri nizkih koncentracijah PEI ND (2-4 μ g/ml) nismo izmerili bistvenega povečanja ROS, medtem ko smo pri koncentraciji 6 μ g/ml in še bolj izrazito pri koncentracijah 8 μ g/ml in 10

 μ g/ml zaznali izrazito povečanje količine ROS. Pri slednjih dveh koncentracijah ND je nastalo celo več ROS kot pri pozitivni kontroli, kjer smo zaznali 3,5-kratno povečanje nastanka ROS glede na negativno kontrolo.



Slika 9: Količina ROS (% glede na negativno kontrolo (NK)) 24 ur po izpostavitvi celic CHO PEIglutation ND. V pozitivno kontrolo (PK) smo dodali H_2O_2 do končne koncentracije 1 mM. Prikazana je standardna napaka (N=3).

Podobno kot pri PEI ND, tudi pri inkubaciji celic s PEI-glutation ND nismo zaznali bistvenega povečanja ROS pri nižjih koncentracijah ND (4-6 µg/ml). Pri koncentraciji 10 µg/ml je bil nastanek ROS približno 3-krat večji kot pri negativni kontroli, kar je še vedno manj kot pri pozitivni kontroli.

Vpliv koncentracije ND na nastanek ROS pri izpostavitvi celic različnim ND je prikazan na Sliki 10. Nižje koncentracije so inducirale nastanek ROS, vendar razlike niso bile statistično značilne. Statistično značilne razlike so se pokazale pri višjih koncentracijah, pri 8 µg/ml PEI ND je nastalo skoraj 3-krat več ROS kot pri isti koncentraciji PEI-glutation ND.



Slika 10: Vpliv koncentracije PEI ND in PEI-glutation ND na nastanek ROS glede na negativno kontrolo (NK) 24 ur po izpostavitvi celic CHO ND. V pozitivno kontrolo (PK) smo dodali H_2O_2 do končne koncentracije 1 mM. Prikazana je standardna napaka (N=3). * p < 0,05, **p<0,0001.

4.4 DOLOČANJE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC S TESTOM MTS

S testom MTS smo določali vpliv, ki ga imajo različno oplaščeni ND na metabolno aktivnost celic CHO. Celice smo 24 ur inkubirali z PEI in PEI-glutation ND v različnih koncentracijah. Rezultati so predstavljeni kot odstotek metabolne aktivnosti glede na negativno kontrolo. Negativna kontrola so bile celice v hranilnem mediju HAM F12.



Slika 11: Metabolna aktivnost (% glede na negativno kontrolo (NK)) 24 ur po izpostavitvi PEI ND. Prikazana je standardna napaka (N=3).

Slika 11 prikazuje metabolno aktivnost celic pri različnih koncentracijah PEI ND. Metabolna aktivnost pada z naraščajočo koncentracijo PEI ND. Padec metabolne aktivnosti je najbolj izrazit pri povišanju koncentracije PEI ND iz 2 μ g/ml na 4 μ g/ml, ko ta pade za 30 odstotnih točk. Zmanjšanje metabolne aktivnosti je opazno tudi med 4 μ g/ml in 8 μ g/ml (25 % glede na kontrolo). Pri največji koncentraciji PEI ND je metabolna aktivnost le še 10 %.



Slika 12: Metabolna aktivnost (% glede na negativno kontrolo (NK)) 24 ur po izpostavitvi PEIglutation ND. Prikazana je standardna napaka (N=3).

Graf na Sliki 12 prikazuje metabolno aktivnost celic po inkubaciji celic s PEI-glutation ND. Ta najprej naraste, nato počasi pada, vendar nikoli ne pade pod 60 % (pri najvišji koncentraciji PEI-glutation ND) glede na negativno kontrolo. Pri koncentraciji 2 μ g/ml metabolna aktivnost naraste za 5 odstotnih točk, pri koncentraciji 4 μ g/ml je enaka kontroli.

Primerjava metabolne aktivnosti celic po inkubaciji z različnimi ND je prikazana na Sliki 13. Lepo je vidna razlika med učinki PEI ND in PEI-glutation ND. Pri celicah, izpostavljenih PEI ND, je metabolna aktivnost padla pod 60 % že pri koncentraciji 6 μ g/ml, medtem ko pri celicah, inkubiranih s PEI-glutation ND metabolna aktivnost sploh ni padla pod 60 % glede na kontrolo. Razlika pri koncentracijah 4-10 μ g/ml je statistično značilna.



Slika 13: Vpliv različno oplaščenih ND na metabolno aktivnost celic CHO glede na negativno kontrolo (NK) 24 ur po izpostavitvi ND. Prikazana je standardna napaka (N=3). * p < 0,0001, **p=0,008.

4.5 PREVERJANJE VSTOPANJA ND V CELICE S TEM

Da bi preverili kako ND vstopajo v celice, smo celice izpostavili PEI ND in PEI-glutation ND, pripravili preparate ter jih pregledali s TEM. Celice so bile različno dolgo izpostavljene različnim koncentracijam PEI ND (5 in 10 μ g/ml) in PEI-glutation ND (8 μ g/ml). Po preteku inkubacije so bile fiksirane, sledilo je vklapljanje v smolo, rezanje vzorcev in njihovo kontrastiranje. Vzorce smo opazovali pod presevnim elektronskim mikroskopom JEM-100 CX. TEM slike nam pomagajo razumeti obnašanje ND na površini in znotraj celic, prav tako nam dajo nekaj informacij o odzivu celic na ND.

4.5.1 PEI ND



Slika 14: Agregati PEI ND na površini celice CHO. Celice smo fiksirali 24 ur po izpostavitvi 5 μg/ml PEI ND. Merilo predstavlja 500 nm.

Celice so bile 24 ur inkubirane s PEI ND s koncentracijo 5 μ g/ml (Slika 14). Na sliki vidimo agregate PEI ND na površini in v okolici celice. Na površini vidimo za makropinocitozo značilni membranski izvihek. Predvidevamo, da PEI ND vstopajo v celice CHO z makropinocitozo.



Slika 15: PEI ND v veziklih znotraj celic CHO 24 ur po izpostavitvi 5 µg/ml PEI ND. Celice smo fiksirali 24 ur po izpostavitvi. S puščico je označen večji agregat PEI ND na zunanji strani celice. Merilo predstavlja 500 nm.

Celice so bile 24 ur inkubirane s PEI ND s koncentracijo 5 μ g/ml (Slika 15). Tudi Slika 15 prikazuje agreate PEI ND na površini celic (puščica). PEI ND so vidni tudi znotraj veziklov, verjetno gre za pozne endosome.



Slika 16: PEI ND prosto v citoplazmi (puščica). Celice CHO so bile 1 uro izpostavljene 10 µg/ml PEI ND. Celice smo fiksirali 1 uro po izpostavitvi. Merilo predstavlja 250 nm.

Celice so bile 1 uro inkubirane s PEI ND s koncentracijo 10 μ g/ml (Slika 16). Slika prikazuje PEI ND prosto v citoplazmi.

4.5.2 PEI – glutation ND



Slika 17: Agregati PEI-glutation ND na površini celice CHO. Celice so bile 24 ur izpostavljene 8 μ g/ml PEI-glutation ND, fiksirali smo jih 24 ur po izpostavitvi. Merilo predstavlja 1 μ m.

Celice so bile 24 ur inkubirane s PEI-glutation ND s koncentracijo 8 µg/ml (Slika 17). Na sliki vidimo PEI-glutation ND na površini celice. Predvidevamo, da tudi PEI-glutation ND vstopajo v celico z makropinocitozo.



Slika 18: Z A in B sta označena endosoma, napolnjena s PEI-glutation ND. S puščico so označeni ND na površini celic. Celice CHO so bile 24 ur izpostavljene 8 µg/ml PEI-glutation ND. Celice smo fiksirali 24 ur po izpostavitvi. Merilo predstavlja 500 nm.

Celice CHO so bile 24 ur inkubirane s PEI-glutation ND s koncentracijo 8 µg/ml (Slika 18). PEI-glutation ND so na površini celice (puščica). PEI-glutation ND so prisotni v endosomih (Slika 18, A in B).



Slika 19: Predvidoma s klatrini posredovana endocitoza (puščica). Celice CHO so bile 24 ur izpostavljene 8 μ g/ml PEI-glutation ND. Celice smo fiksirali 24 ur po izpostavitvi. Merilo predstavlja 500 nm.

Celice CHO so bile 24 ur inkubirane s PEI-glutation ND s koncentracijo 8 µg/ml (Slika 19). Na sliki vidimo alternativno pot vstopanja PEI-glutation ND v celico, predvidoma gre za s klatrini posredovano endocitozo.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

V nalogi smo poskušali preveriti vpliv s PEI oplaščenih magnetnih ND na celice CHO *in vitro*, raziskati in potrditi mehanizme toksičnosti ter z dodatnim oplaščenjem z glutationom zmanjšati morebiten negativen vpliv PEI ND na celice.

Uspešno smo pripravili magnetne PEI ND. Sestavljajo jih kobalt-feritno jedro in PEI plašč. Posebna različica teh ND je bila še dodatno oplaščena z glutationom. Po sintezi smo nanodelcem izmerili velikost, določili zeta potencial, preverili njihovo citotoksičnost in vpliv na metabolno aktivnost *in vitro* na celični liniji CHO ter določili kako vstopajo v celice.

Karakterizacija z metodo dinamičnega sipanja laserske svetlobe in meritvami zeta potenciala potrjuje uspešno modifikacijo PEI ND z glutationom. V skladu s pričakovanji se je zeta potencial PEI-glutation ND zmanjšal. Posledica zmanjšanega zeta potenciala je tudi zmanjšan hidrodinamski premer ND v hranilnem mediju. PEI ND privlačijo več molekul vode in nabitih proteinov, temu primerno je večji njihov hidrodinamski premer (Slika 2). Hidrodinamski premer PEI ND je v povprečju velik 130 nm, hidrodinamski premer PEI-glutation ND pa 55 nm. Kljub zmanjšanju zeta potenciala so PEI-glutation ND še vedno stabilni v hranilnem mediju.

Potrdili smo, da toksičnost PEI ND narašča s koncentracijo (Slika 3, Slika 11). Podobne rezultate navajajo Calatayud in sod. (2013). Iz primerjave njihove in naše študije lahko sklepamo, da je viabilnost celic v prisotnosti PEI ND odvisna od časa izpostavljenosti, koncentracije PEI ND, izbrane celične linije in od samih PEI ND. Upoštevati je treba dejstvo, da so pri različnih študijah uporabljeni različni PEI ND, z različnimi lastnostmi in različnim vplivom na celične linije. V naši študiji smo pokazali, da je vrednost LC_{50} za PEI ND po 24 urni izpostavljenosti med 5 µg/ml in 6 µg/ml. Padec viabilnosti (Slika 3) je skladen s padcem metabolne aktivnosti celic (Slika 11).

PEI ND vstopajo v celice (Slika 14, Slika 15, Slika 16). Glavni mehanizem vstopa je endocitoza, predvidevamo da gre za makropinocitozo (Slika 14). Po vstopu v celico se PEI

ND nahajajo v endosomih (Slika 15). Po 1 uri inkubacije celic CHO s PEI ND te najdemo tudi prosto v citoplazmi (Slika 16).

Kot je razvidno na Sliki 8 je eden izmed vzrokov toksičnosti PEI ND vsekakor povečan nastanek ROS, kar kaže bistven porast ROS pri višjih koncentracijah PEI ND (8-10 µg/ml). Gonzalez in sod. (2008) navajajo nastanek ROS kot pomemben vzrok toksičnosti ND, naša študija temu pritrjuje, vendar iz naših rezultatov ne moremo sklepati, ali gre za delovanje ND v smislu neposredne indukcije ROS, ali je morda nastanek ROS posledica ostalih možnih mehanizmov toksičnosti. Zelo velik porast ROS pri višjih koncentracijah ND bi lahko pripisali lizosomskemu pobegu, ki ga opisuje že Behr (1997). Poškodbe lizosomov in sprostitev njihove vsebine v citoplazmo je lahko razlog povečanemu oksidativnemu stresu (Slika 8) in posledičnemu upadu viabilnosti (Slika 3) ter metabolne aktivnosti (Slika 11). Lizosomski pobeg lahko potrdimo tudi s Sliko 16, kjer se prosto v citoplazmi nahaja velika količina PEI ND. Benjaminsen in sod. (2012) potrjujejo, da je lizosomski pobeg ena izmed možnosti sproščanja PEI ND iz membranskih veziklov v citoplazmo, Roberg in sod. (2002) pa so pokazali, da sprostitev vsebine lizosomov lahko vodi v apoptozo.

Vsekakor pa ne gre za edini mehanizem, saj pri nižjih koncentracijah (2-4 μ g/ml) ni bistvenega povečanja nastalih ROS. Pri nižjih koncentracijah lahko sklepamo na ostale mehanizme, ki ne vplivajo bistveno na povečanje ROS oziroma je povečanje ROS pod mejo detekcije naše metode. PEI ND se lahko zaradi pozitivno nabitih skupin na površini preko elektrostatskih interakcij vežejo na celično membrano in motijo normalno delovanje celice. Prav tako lahko povzročajo poškodbe membran celičnih organelov po vstopu v celico. Bieber in sod. (2002) so pokazali, da se PEI po vstopu v celico nahaja v lizosomih, kjer povzroča pore v membrani teh organelov. Preko teh por lahko PEI zapusti lizosome in pride do jedra, kjer se veže na negativno nabito DNA.

Tudi citotoksičnost dodatno oplaščenih PEI ND z glutationom (PEI-glutation ND) narašča z naraščajočo koncentracijo ND (Slika 4), vendar je citotoksičnost v primerjavi s PEI ND (Slika 5) manjša. LC_{50} pri 24 urni izpostavljenosti PEI-glutation ND je med 8-10 µg/ml. Tudi metabolna aktivnost celic pada z naraščajočo koncentracijo PEI-glutation ND (Slika 12).

Primerjava viabilnosti (Slika 5) in metabolne aktivnosti (Slika 13) potrjuje uspešno zmanjšanje toksičnosti PEI ND z dodatnim oplaščenjem z glutationom.

Na Sliki 6 vidimo vpliv različnih koncentracij glutationa, dodanega hranilnemu mediju, na celice CHO. Pri vseh treh preverjenih koncentracijah je vpliv negativen. Ob hkratni inkubaciji celic s PEI ND in glutationom dodanim v celični medij opazimo izboljšano viabilnost glede na pozitivno kontrolo pri najnižji koncentraciji glutationa, medtem ko pri višjih koncentracijah ta kaže negativen vpliv na celice (Slika 7). Boljšo viabilnost bi lahko razložili z naslednjo hipotezo: prost glutation v hranilnem mediju ne vstopa v celice, medtem ko ob prisotnosti PEI ND, nekaj glutationa skupaj z ND vstopi v celico. Glutation mora priti v celico, da izkaže antioksidantsko funkcijo, zato ob inkubaciji celic CHO s prostim glutationom v hranilnem mediju ni povečanja viabilnosti celic (Slika 6). V nadaljnjih študijah bi bilo potrebno preveriti več različnih koncentracij glutationa, ki bi lahko izkazale pozitiven vpliv na viabilnost celic. Prav tako bi bilo potrebno preveriti vstopanje prostega glutationa v celice CHO.

PEI ND in PEI-glutation ND predvidoma vstopajo v celice z makropinocitozo (Slika 17). Pri PEI-glutation ND predvidevamo tudi s klatrini posredovano endocitozo (Slika 19). Na sliki 18 vidimo na celično membrano pritrjene agregate PEI-glutation ND, najdemo jih tudi v veziklih znotraj celice. Rezultati potrjujejo, da kljub modifikaciji, PEI-glutation ND še vedno vstopajo v celico.

Slika 10 prikazuje primerjavo nastalih ROS pri istih koncentracijah različnih ND. Iz grafa na Sliki 10 je razvidno, da se pri večjih koncentracijah ND (8-10 μ g/ml) zmanjša nastanek ROS pri PEI-glutation ND v primerjavi s PEI ND. Zmanjšanje ROS lahko razložimo z antioksidantsko funkcijo glutationa. Ta se lahko sprošča iz ND in kot substrat glutation-peroksidaze deluje na mestu nastanka ROS. Pri nižjih koncentracijah (2-6 μ g/ml) je ta razlika manjša, pri najnižji koncentraciji (2 μ g/ml) je celo obrnjena v prid PEI ND.

Povečana viabilnost (Slika 5) in metabolna aktivnost (Slika 13) celic CHO, izpostavljenim PEI-glutation ND v primerjavi s celicami CHO, izpostavljenimi PEI ND je lahko tudi posledica spremembe površinskega naboja ND. Z vezavo glutationa na ND zmanjšamo

presežek pozitivnega naboja na površini ND. S tem spremenimo način interakcije ND z membrano, kar lahko zmanjša negativen vpliv na celice. Z zmanjševanjem presežka pozitivnega naboja, ki pomeni manjšo pufersko kapaciteto PEI ND, dosežemo tudi manjšo stopnjo lizosomskega pobega, ki je eden izmed mehanizmov toksičnosti PEI ND. Na grafikonu na Sliki 10 lahko veliko razliko nastalih ROS pri koncentraciji 8 µg/ml različnih ND razložimo z manjšo stopnjo lizosomskega pobega.

5.2 SKLEPI

- Toksičnost PEI ND je posledica tako povečanega nastanka ROS kot velikega zeta potenciala, kar se ujema z našima hipotezama.
- Dodatno oplaščenje ND z glutationom uspešno zmanjša toksičnost ND.
- Cilj našega dela je delno izpolnjen uspešno smo zmanjšali toksičnost PEI ND z dodatnim oplaščenjem z glutationom. Za določanje mehanizmov toksičnosti bo potrebna precej bolj obsežna študija.

6 POVZETEK

Pripravili smo magnetne ND oplaščene s PEI. Vpliv oplaščenih ND na celično linijo CHO smo preverjali z določanjem viabilnosti in metabolne aktivnosti celic ter z merjenjem nastanka ROS. Sledila je modifikacija PEI ND – oplaščenje z glutationom. S tako oplaščenimi PEI-glutation ND smo dosegli boljšo viabilnost in večjo metabolno aktivnost celic v primerjavi s PEI ND, zmanjšal se je tudi nastanek ROS. Potrdili smo vzroke toksičnosti PEI ND, ki se pojavljajo v literaturi. S presevno elektronsko mikroskopijo smo primerjali poti vstopa različno oplaščenih ND v celico. Oboji ND verjetno vstopajo v celico z makropinocitozo, po vstopu v celico se oboji nahajajo v veziklih znotraj celice.

7 VIRI

- Behr J.P. 1997. The proton sponge: a trick to enter cells the viruses did not exploit. CHIMIA International Journal for Chemistry, 51, 1-2: 1–2
- Benjaminsen R.V., Mattebjerg M.A., Henriksen J.R., Moghimi S.M., Andresen T.L. 2012.The Possible 'Proton Sponge' Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH. Molecular Therapy, 21, 1: 149–157
- Bergman L., Rosenholm J., Öst A.-B., Duchanoy A., Kankaanpää P., Heino J., Lindén M., 2008. On the Complexity of Electrostatic Suspension Stabilization of Functionalized Silica Nanoparticles for Biotargeting and Imaging Applications. Journal of Nanomaterials, 2008: 1–9
- Bieber T., Meissner W., Kostin S., Niemann A., Elsasser H.P., 2002. Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine–DNA complexes. Journal of Controlled Release, 82: 441–454
- Boussif O., Lezoualc F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B., Behr J.P. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. Proceedings of the National Academy of Sciences, 92, 16: 7297–7301
- Bregar V.B., Pavlin M., Lojk J., Sustar V., Veranic, P. 2013. Visualization of internalization of functionalized cobalt ferrite nanoparticles and their intracellular fate. International Journal of Nanomedicine, 8: 919-931
- Calatayud M.P., Riggio C., Raffa V., Sanz B., Torres T.E., Ibarra M.R., Goya G.F. 2013. Neuronal cells loaded with PEI-coated Fe3O4 nanoparticles for magnetically guided nerve regeneration. Journal of Materials Chemistry B, 1, 29: 3607

- Chastellain M., Petri A., Gupta A., Rao K.V., Hofmann H. 2004. Superparamagnetic Silica-Iron Oxide Nanocomposites for Application in Hyperthermia. Advanced Engineering Materials, 6, 4: 235–241
- Chatterjee K., Sarkar S., Jagajjanani R.K., Paria S. 2014. Core/shell nanoparticles in biomedical applications. Advances in Colloid and Interface Science, 209: 8-39
- Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A., Cory J.G. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Communications, 3, 7: 207-12
- Dai L., Liu Y., Wang Z., Guo F., Shi D., Zhang B. 2014. One-pot facile synthesis of PEGylated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI contrast enhancement. Materials Science and Engineering, 41: 161–167
- Filipe V., Hawe A., Jiskoot W. 2010. Critical evaluation of Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) by NanoSight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. Pharmaceutical research, 27, 5: 796-810
- Gao J., Zhang W., Huang P., Zhang B., Zhang X., Xu B. 2008. Intracellular spatial control of fluorescent magnetic nanoparticles. Journal of the American Chemical Society, 130, 12: 3710-3711
- Gao J., Xu B. 2009. Applications of nanomaterials inside cells. Nano Today, 4, 1: 37–51
- Gonzalez L., Lison D., Kirsch-Volders M. 2008. Genotoxicity of engineered nanomaterials: a critical review. Nanotoxicology, 2: 252–273
- Gupta A.K., Gupta, M. 2005. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. Biomaterials, 26, 13: 1565–1573

- Gupta A.K., Naregalkar R.R., Vaidya V.D., Gupta M. 2007. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. Nanomedicine, 2, 1: 23–39
- Halliwell B. 2005. Free radicals and other reactive species in disease. Wiley Online Library. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1038/npg.els.0003913/full (20. jun. 2014)
- Hoskins C., Cuschieri A., Wang L. 2012. Cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles: Common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism. Journal of Nanobiotechnology, 10: 15
- Hunter A.C. 2006. Molecular hurdles in polyfectin design and mechanistic background to polycation induced cytotoxicity. Advanced Drug Delivery Reviews, 58, 14: 1523–1531
- Iversen T.-G., Skotland T., Sandvig, K. 2011. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. Nano Today, 6, 2: 176– 185
- Jalalian S.H., Taghdisi S.M., Shahidi Hamedani N., Kalat S.A.M., Lavaee P., Zand K.M., Abnous K. 2013. Epirubicin loaded super paramagnetic iron oxide nanoparticleaptamer bioconjugate for combined colon cancer therapy and imaging in vivo. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 50, 2: 191–197
- Liu Y., Li X., Bao S. 2013. Plastic protein microarray to investigate the molecular pathways of magnetic nanoparticle-induced nanotoxicity. Nanotechnology, 24: 175501
- Lojk J., Pavlin M., Erdani Kreft M. 2013. Vloga endocitotskih poti pri razvoju in zdravljenju bolezni. Medicinski Razgledi, 52: 371-385
- Kayal S., Ramanujan RV. 2010. Anti-cancer drug loaded iron-gold core-shell nanoparticles (Fe@Au) for magnetic drug targeting. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 10, 9: 5527-5539

- Kobayashi M., Skarba M., Galletto P., Cakara D., Borkovec M. 2005. Effects of heat treatment on the aggregation and charging of Stöber-type silica. Journal of Colloid and Interface Science, 292, 1: 139–147
- Liu G., Swierczewska M., Lee S., Chen X. 2010. Functional nanoparticles for molecular imaging guided gene delivery. Nano Today, 5, 6: 524–539
- Mahmoudi M., Sant S., Wang B., Laurent S., Sen T. 2011. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. Advanced Drug Delivery Reviews, 63, 1–2: 24–46
- Meister A. 1985. Methods for the selective modification of glutathione metabolism and study of glutathione transport. Methods in Enzymology, 113: 571–585
- Nimesh S., Goyal A., Pawar V., Jayaraman S., Kumar P., Chandra R., Gupta K.C. 2006. Polyethylenimine nanoparticles as efficient transfecting agents for mammalian cells. Journal of Controlled Release, 110, 2: 457–468
- Noctor G., Mhamdi A., Chaouch S., Han Y., Neukermans J., Marquez-Garcia B., Foyer, C.H. 2012. Glutathione in plants: an integrated overview: Glutathione status and functions. Plant, Cell & Environment 35, 2: 454–484
- Ozdemir V., Williams-Jones B., Glatt S.J., Tsuang M.T., Lohr J.B., Reist, C. 2006. Shifting emphasis from pharmacogenomics to theragnostics. Nature, 200, 6: 1
- Panyam J., Labhasetwar V. 2012. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. Advanced Drug Delivery Reviews, 64: 61–71
- Parhamifar L., Larsen A.K., Hunter A.C., Andresen T.L., Moghimi S.M. 2010. Polycation cytotoxicity: a delicate matter for nucleic acid therapy—focus on polyethylenimine. Soft Matterials, 6, 17: 4001

- Pavlin M., Bregar V.B. 2012. Stability of nanoparticle suspensions in different biologically relevant media. Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 7: 1389–1400
- Prijic S., Prosen L., Cemazar M., Scancar J., Romih R., Lavrencak J., Sersa G. 2012. Surface modified magnetic nanoparticles for immuno-gene therapy of murine mammary adenocarcinoma. Biomaterials, 33, 17: 4379–4391
- Pons T., Uyeda H.T., Medintz I.L., Mattoussi H. 2006. Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots. Journal of Physical Chemistry, 110: 20308-20316
- Puck T. T., Cieciura S. J., Robinson A. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. III. Longterm cultivation of euploid cells from human and animal subjects. The Journal of Experimental Medicine, 108, 6: 945-956
- Roberg K., Kågedal K., Öllinger K. 2002. Microinjection of Cathepsin D Induces Caspase-Dependent Apoptosis in Fibroblasts. The American Journal of Pathology, 161, 1: 89– 96
- Roohi F., Lohrke J., Ide A., Schutz G., Dassler K. 2012. Studying the effect of particle size and coating type on the blood kinetics of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. International Journal of Nanomedicine, 7: 4447–4458
- Safi M., Sarrouj H., Sandre O., Mignet N., Berret J.-F. 2010. Interactions between sub-10-nm iron and cerium oxide nanoparticles and 3T3 fibroblasts: the role of the coating and aggregation state. Nanotechnology, 21, 14: 145103
- Salazar-Alvarez G., Muhammed M., Zagorodni A.A. 2006. Novel flow injection synthesis of iron oxide nanoparticles with narrow size distribution. Chemical Engineering Science, 61, 14: 4625–4633

- Sapsford K.E., Tyner K.M., Dair B.J., Deschamps J.R., Medintz I.L. 2011. Analyzing Nanomaterial Bioconjugates: A Review of Current and Emerging Purification and Characterization Techniques. Analytical Chemistry, 83, 12: 4453–4488
- Shubayev V.I., Pisanic T.R., Jin S. 2009. Magnetic nanoparticles for theragnostics. Advanced Drug Delivery Reviews, 61, 6: 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, 5: 446–465
- Sudha Kumari S.M., Mayor S. 2010. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. Cell research, 20, 3: 256–275
- Thiesen B., Jordan A. 2008. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. International Journal of Hyperthermia, 24, 6: 467–474
- Wang T., Sridhar R., Korotcov A., Ting A.H., Francis K., Mitchell J., Wang P.C. 2011. Synthesis of amphiphilic triblock copolymers as multidentate ligands for biocompatible coating of quantum dots. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 375, 1-3: 147–155
- Wang Y., Aker W. G., Hwang H. W. 2011. A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells. Sciene of The Total Environment, 409: 4753–476

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Mojci Narat in somentorici doc. dr. Mojci Pavlin za vodenje in strokovno pomoč pri izdelavi magistrskega dela.

Hvala dr. Vladimirju B. Bregarju za meritve DLS in zeta potenciala, ki dopolnjujejo magistrsko delo.

Hvala Maruši Rajh za pomoč pri zasnovi nekaterih poskusov.

Posebna zahvala gre Jasni Lojk za izvedbo TEM slikanja in za vso drugo pomoč ter nasvete tekom priprave magistrskega dela.

Zahvaljujem se tudi staršem, brez katerih to magistrsko delo ne bi nastalo.

Hvala tudi Lari.