UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

AJDA DEMŠAR

## VPLIV MAGNETNIH NANODELCEV NA ŽIVOST CELIČNE LINIJE RAKA DOJKE IN AKTIVACIJO TRANSKRIPCIJSKEGA DEJAVNIKA HIF-1 IMPACT OF MAGNETIC NANOPARTICLES ON VIABILITY OF BREAST CANCER CELL LINE AND ACTIVATION OF TRANSCRIPTION FACTOR HIF-1

INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala v okviru ARRS projekta J3-6794 (nosilka doc. dr. Mojca Pavlin) in programa P3-0043 (vodja: prof. dr. Matej Podbregar, koordinator na Inštitutu za patološko fiziologijo: doc. dr. Sergej Pirkmajer). Laboratorijsko delo je potekalo v laboratoriju Skupine za nano in biotehnološke aplikacije na Fakulteti za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani in na Inštitutu za patološko fiziologijo na Medicinski fakulteti, Univerza v Ljubljani. Magistrska naloga je narejena pod mentorstvom izr. prof. dr. Petre Kocbek in somentorstvom doc. dr. Sergeja Pirkmajerja.

#### ZAHVALA

Zahvaljujem se izr. prof. dr. Petri Kocbek za možnost opravljanja magistrske naloge pod njenim mentorstvom in doc. dr. Sergeju Pirkmajerju za somentorstvo. Hvala za vso pomoč, prijaznost in dostopnost med pisanjem magistrske naloge. Hvala asist. dr. Jasni Lojk za pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela in za vso posredovano znanje. Hvala dr. Klemenu Strojanu za pripravo nanodelcev. Hvala dr. Vladimiru Boštjanu Bregarju za karakterizacijo nanodelcev. Zahvaljujem se tudi neformalni mentorici doc. dr. Mojci Pavlin, hvala za usmerjanje tekom mojega dela. Hvala kolegom iz Fakultete za elektrotehniko in Inštituta za patološko fiziologijo za prijaznost in pomoč med izdelavo moje magistrske naloge.

Zahvaljujem se družini in fantu Jerneju za podporo in spodbudo med izdelavo magistrske naloge in tekom celega študija.

#### IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Petre Kocbek in somentorstvom doc. dr. Sergeja Pirkmajerja.

Ajda Demšar

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Tomaž Vovk, mag. farm.

Mentorica: izr. prof. dr. Petra Kocbek, mag. farm.

Somentor: doc. dr. Sergej Pirkmajer

Član komisije: izr. prof. dr. Janez Mravljak, mag. farm.

## Kazalo vsebine

| Pov  | zet      | ek   | 9       |
|------|----------|--|---------|
| Abs  | tra      | ct   | 0       |
| Klju | ične     | e besede   | 1       |
| Sez  | nan      | n okrajšav   | 1       |
| 1.   | יט       | vod  | 2       |
| 1    | .1 F     | Rak dojke  | 2       |
| 1    | 2 ł      | Hipoksija  | 13      |
| 1    | 3 9      | S hipoksijo inducirani dejavnik - 1  | 4       |
| 1    | 4 [      | Dejavniki, ki vplivajo na aktivacijo HIF-1   | 15      |
| 1    | 5 1      | Nanodelci železovega oksida  | 17      |
|      | 1.       | 5.1 Uporaba v biomedicini  | 8       |
|      | 1.       | .5.2 Toksičnost magnetnih nanodelcev2  | 22      |
| 2.   | Na       | amen   | 25      |
| 3.   | Μ        | lateriali in metode  | 26      |
| 3    | 8.1      | Materiali  | 26      |
| 3    | 5.2.     | Metode   | 30      |
|      | 3.       | 2.1 Celice MDA-MB-231  | 30      |
|      | 3.       | 2.2 Nanodelci železovih oksidov  | 31      |
|      | 3.       | .2.3 Živost celic  | 32      |
|      | 3.       | .2.4 Izražanje proteina HIF-1a   | 33      |
|      | 3.       | .2.5 Statistična analiza   | 37      |
| 4.   | Re       | ezultati   | 38      |
| 4    | .1       | Živost celic MDA-MB-231 pri izpostavitvi MND   | 38      |
|      | 4.       | 1.1 Neoplaščeni maghemitni nanodelci   | 38      |
|      | 4.       | 1.2 Neoplaščeni kobalt feritni nanodelci4  | 10      |
|      | 4.       | 1.3 Maghemitni nanodelci oplaščeni s PAA   | 12      |
|      | 4.       | 1.4 Kobalt feritni nanodelci oplaščeni s PAA   | 14      |
| 4    | .2       | Vpliv kobalt feritnih in maghemitnih nanodelcev na izražanje proteina HIF-1 $lpha$ 4                                 | 16      |
|      | 4.       | .2.1 Vpliv različnih vrst MND na izražanje proteina HIF-1 $lpha$   | 16      |
|      | 4.<br>op | .2.2 Časovna odvisnost izražanja proteina HIF-1 $\alpha$ pri izpostavitvi kobalt feritnim nanodelce plaščenimi s PAA | m<br>19 |

|    | 4.2.3 Vpliv kobalt feritnih nanodelcev oplaščenih s PAA na izražanje proteina HIF-1α: zakasnjeni<br>učinek  |
|----|---|
|    | 4.2.4 Vpliv kobalt feritnih nanodelcev oplaščenih s PAA in maghemitnih nanodelcev oplaščenih s<br>PAA na izražanje proteina HIF-1α: priprava nanodelcev51 |
|    | 4.2.5 Vpliv kobalt feritnih nanodelcev oplaščenih s PAA na izražanje proteina HIF-1α: združeni<br>rezultati   |
| 5. | Razprava  |
| 6. | Sklep   |
| 7. | Reference   |
|    |   |

#### Kazalo slik

Slika 8: Princip detekcije iskanega proteina s kemiluminiscenco. Na sekundarno protitelo je vezan encim (v našem primeru hrenova peroksidaza (HRP)), ki ob inkubaciji s

kemiluminiscenčnimsubstratomoddajasvetlobo.(prirejenopo:http://www.novusbio.com/support/support-by-application/western-blot/illustrated-assay.html;dostop: 30.3.2018)36

Slika 16: Celice, inkubirane s kobalt fertinimi nanodelci oplaščenimi s PAA v različnih koncentracijah, prikazane z različnimi barvanji. Prikazani so fazni kontrast (Fc), kjer je vidna morfologija celic, s Hoechstom so obarvana jedra živih in mrtvih celic (H), s

Slika 20: Relativno izražanje proteina HIF-1 $\alpha$  v celicah MDA-MB-231 po izpostavitvi kobalt feritnim nanodelcem oplaščenimi s PAA in maghemitnim nanodelcem oplaščenimi s PAA pripravljenih po različnih postopkih, CoCl<sub>2</sub> ali FeCl<sub>2</sub>. Inkubacija celic z nanodelci je potekala 24 h, pri koncentraciji nanodelcev 50 µg/mL. Vzorci označeni kot »dializirani« so bili dodatno dializirani do 24 ur pred pričetkom priprave vzorcev. Inkubacija celic s CoCl<sub>2</sub> in FeCl<sub>2</sub> je potekala 6 h, pri koncentraciji CoCl<sub>2</sub> 250 µM in FeCl<sub>2</sub> 300 µM. A: Imunodetekcija proteina HIF-1 $\alpha$  in aktina. Prikazano je povprečje dveh bioloških paralelk. Vsaka biološka paralelka je bila narejena v duplikatu. B: Nespecifično barvanje proteinov na PVDF membrani z barvilom Ponceau S. Na levem in desnem robu se nahaja označevalec

### Kazalo preglednic

| Preglednica I: Laboratorijska oprema                                    | 26 |
|---|----|
| Preglednica II: Biološki material                                       | 27 |
| Preglednica III: Material   | 28 |
| Preglednica IV: Pufri   | 29 |
| Preglednica V: Hidrodinamski premer pripravljenih nanodelcev            | 31 |
| Preglednica VI: Priprava suspenzije nanodelcev s koncentracijo 50 µg/mL | 33 |

## Kazalo enačb

| Enačba 1 |  |
|----------|--|
| Enačba 2 |  |
| Enačba 3 |  |
| Enačba 4 |  |
| Enačba 5 |  |

## Povzetek

Rak dojke je pogosta oblika tumorja, za katero letno zboli milijon žensk. Značilnost celic raka dojke je zmanjšana raven kisika, t.i. hipoksija, ki sproži izražanje transkripcijskega dejavnika HIF-1. HIF-1 je odgovoren za tvorbo novih krvnih žil, metastaziranje in preklop metabolizma celic, kar rakavim celicam omogoča preživetje. Je heterodimer sestavljen iz proteinov HIF-1a in HIF-1 $\beta$ . Raven kisika neposredno vpliva na stabilnost proteina HIF-1a preko encima prolil hidroksilaza, ki uravnava njegovo razgradnjo. Encim za delovanje potrebuje kisik. V katalitičnem centru ima železov ion. Kobaltovi ioni encim zavirajo, kar vodi do stabilizacije proteina HIF-1a, ki se posledično ne razgradi in skupaj s HIF-1 $\beta$  tvori transkripcijski dejavnik HIF-1, kar vodi do preskrbe rakavih celic s kisikom in hranili. Kobaltovi ioni se lahko sproščajo iz nanodelcev železovih oksidov, ki so v biomedicini zaradi svojih superparamagnetnih lastnosti, ki omogočajo njihovo nadzorovano porazdeljevanje in usmerjanje v organizmu s pomočjo magnetnega polja, vedno bolj aktualni.

V magistrski nalogi smo ovrednotili toksičnost izbranih magnetnih nanodelcev s preizkušanjem njihovega vpliva na živost celic raka dojke. Raziskovali smo tudi, ali lahko nanodelci železovega oksida aktivirajo oziroma zavrejo aktivacijo transkripcijskega dejavnika HIF-1, preko stabilizacije proteina HIF-1a. Ugotovili smo, da izbrani nanodelci nimajo statistično pomembnega vpliva na živost rakavih celic dojke. Na podlagi rezultatov smo zaključili, da imajo maghemitni nanodelci večji vpliv na živost celic kot kobalt feritni nanodelci. Oplaščenje različno vpliva na toksičnost nanodelcev. Glede na rezultate magistrske naloge smo zaključili, da imajo maghemitni in kobalt feritni nanodelci majhen, skorajda zanemarljiv vpliv na živost celic. Iz vidika vpliva na živost celic, so varni za uporabo. Pri vrednotenju izražanja proteina HIF-1a smo ugotovili, da imajo statistično pomemben vpliv le kobalt feritni nanodelci oplaščeni s poliakrilno kislino. Ugotovili smo, da je izražanje proteina HIF-1a največje po 24 h inkubaciji z oplaščenimi kobalt feritnimi nanodelci. Naši rezultati nakazujejo, da do zakasnjenega učinka izražanja proteina HIF-1a ne pride. Zanimal nas je vpliv priprave nanodelcev ter prostih ionov, ki se potencialno sproščajo iz nanodelcev. Ugotovili smo, da dodatna dializa ne zmanjša izražanja proteina HIF-1a.

Zaključili smo, da so vsi izbrani nanodelci varni za uporabo iz vidika vpliva na živost celic. Za uporabo v biomedicinske namene kobalt feritni nanodelci oplaščeni s poliakrilno kislino niso najbolj primerni oziroma bi morali ponovno oceniti razmerje med njihovo koristjo in škodo.

#### Abstract

One of the most common malignant tumors is breast cancer. One million women develop the disease every year. Characteristic of breast cancer cells is low oxygen level named hypoxia which activates transcription factor HIF-1. HIF-1 is responsible for formation of new blood vessels, metastasis and for the metabolic shift of cells. HIF-1 is a heterodimer. It consists of protein HIF-1a and HIF-1 $\beta$ . Oxygen level directly influences the HIF-1a protein. It is hydroxylated by prolyl hydroxylase enzyme which needs oxygen to function. This causes proteasomal degradation of the protein. Prolyl hydroxylase has iron ion for catalytic center. Cobalt ions inhibit the enzyme activity. Consequently, protein HIF-1a is not degraded. Together with HIF-1 $\beta$  it forms transcription factor HIF-1. This leads to survival of cancer cells in hypoxic environment. Iron and cobalt ions can be released from magnetic nanoparticles. Magnetic nanoparticles are widely used in biomedicine as they can be monitored because of their ability of possessing magnetic properties under magnetic field.

The goal of our work was to determine toxicity of chosen magnetic nanoparticles. Toxicity evaluation was made by viability test on breast cancer cell line. Further research was focused on evaluation of nanoparticles, used as contrast agents or drug carriers, to activate or suppress transcription factor HIF-1 by stabilizing protein HIF-1a. Our results show that chosen nanoparticles do not significantly influence viability of cells. To sum up, maghemite nanoparticles have bigger impact on cell viability than cobalt ferrite nanoparticles. Results show that nanoparticle coating has different effects on toxicity. Based on our results we concluded that, according to viability, used nanoparticles are safe. Evaluating activation of protein HIF-1a, we determined that only coated cobalt ferrite nanoparticles have statistically significant impact on stabilization of the protein. The results show activation of protein HIF-1a was at its peak at 24 h. Delayed activation was excluded. We evaluated the impact of nanoparticles preparation by evaluating free ions that can be potentially present. The results show that additional dialysis has no significant impact on activation of protein HIF-1a.

We concluded that tested nanoparticles are safe for use by viability aspect. Cobalt ferrite nanoparticles coated with polyacrylic acid might not be optimal for biomedical use or at least their usage should be re-evaluated.

## Ključne besede

Magnetni nanodelci, živost celične linije, HIF-1 Magnetic nanoparticles, cell line viability, HIF-1

## Seznam okrajšav

| BK   | celice v bazalnem stanju; bazalna kontrola                                    |
|------|---|
| FBS  | fetusni serum goveda  |
| HIF  | s hipoksijo inducirani dejavnik (ang. hypoxia inducible factor)               |
| HRE  | promotor transkripcije (angl. hypoxia responsive elements)                    |
| IARC | mednarodna agencija za raziskave rakavih obolenj (angl. International Agency  |
|      | for Research of Cancer)   |
| MND  | magnetni nanodelci  |
| MRI  | magnetno resonančno slikanje  |
| NK   | negativna kontrola  |
| PAA  | poliakrilna kislina   |
| PAGE | poliakrilamidna gelska elektroforeza  |
| PHD  | domena prolil hidroksilaze (angl. prolyl hydroxylase domain protein)          |
| PI   | propidijev jodid  |
| PVDF | poliviniliden difluorid   |
| ROS  | angl. <i>reactive oxygen species</i> – reaktivne kisikove zvrsti              |
| SDS  | natrijev lavrilsulfat (angl. sodium dodecyl sulfate)                          |
| TBST | puferska raztopina trisa z dodanim Tweenom (angl. Tris Buffered Saline with   |
|      | Tween)  |
| VEGF | žilni endotelijski rastni dejavnik (angl. vascular endothelial growth factor) |
| VHL  | von Hippel-Lindau tumor supresorski protein                                   |

## 1. Uvod

#### 1.1 Rak dojke

Tumor nastane z nenormalno in nenadzorovano rastjo tkiva. Tumorska tvorba je lahko maligna ali benigna. Kadar je tvorba maligna, torej poseduje sposobnost metastaziranja in lokalne destruktivnosti, govorimo o raku.

Rak dojke pri ženskah predstavlja kar 18 % vseh malignih tumorjev. Na svetu letno za rakom dojke zboli približno milijon žensk (1). V Sloveniji letno za rakom dojke zboli približno 1000 žensk, približno 1 % vseh obolelih pa so moški (2). Pojavnost bolezni narašča z leti. Najpogosteje zbolijo ženske starejše od 50 let. Kadar se pojavi že pri mlajših bolnicah, je oblika tumorja agresivnejša. Dejavniki tveganja, ki povečajo možnost nastanka raka dojke, so pozna menopavza pri ženskah, daljše uživanje hormonskih zdravil, prekomerna teža, uživanje alkohola in kajenje. Manj kot 5 % rakavih obolenj dojke je genetskega izvora. Pri bolnicah z dokazanim povečanim izražanjem mutiranega gena odgovornega za razvoj raka (BRCA1/BRCA2) je možnost razvoja raka dojke med 40 % in 85 % (3).

Diagnosticiranje raka dojke poteka slikovno (magnetno resonančno slikanje, rentgensko slikanje, računalniška tomografija itn.), s preiskavo krvi ter z biopsijo. Rakavo tkivo najpogosteje vznikne iz epitelija izvodil mlečnih žlez. Zaradi invazivnosti rakavih celic, le-te s časoma prehajajo v bezgavke, kar omogoča nadaljnje metastaziranje (3). Metastaze predstavljajo zasevke tumorskih celic v oddaljenih tkivih in organih (4). Za rakave celice dojke je značilna tvorba zasevkov v kostnem mozgu, možganih, jetrih in pljučih.

Značilnost rakavih celic sta povečana in od običajnih zunanjih signalov (skoraj) neodvisna celična delitev ter zmanjšana celična umrljivost. Celice so podvržene številnim genetskim mutacijam (5). Nesorazmerje med rastjo tumorja in rastjo tumorskega žilja vodi do zmanjšane ravni kisika v tkivu in vzpostavitve t.i. hipoksičnega okolja (6). Hipoksija se v rakavih celicah dojke razvije zelo zgodaj (5).

#### 1.2 Hipoksija

Pomembna lastnost evkariontskih celic je regulacija koncentracije kisika, s čimer celica uravnava ravnovesje med tvorbo energije in tvorbo reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS). Celica proizvaja energijo v obliki adenozin trifosfata z reakcijo oksidativne fosforilacije. Elektroni prisotni v mitohondrijski dihalni verigi lahko reagirajo s kisikom, ki se posledično ne reducira do konca. Nastane superoksidni anion, ki se s pomočjo encima superoksid dismutaze pretvarja v vodikov peroksid. Nastajanje ROS povzroča oksidacijo lipidov, nukleinskih kislin in proteinov. Zaradi opisanih učinkov celica raven kisika zelo natančno uravnava (7).

Delež kisika v tkivu podajamo kot parcialni tlak (1% = 1,013 kPa). V normalnih pogojih je raven kisika v različnih tkivih med 1,5 % in 7 %. Patološka hipoksija nastopi, ko je raven kisika pod 1% (8). Odziv zdrave celice na hipoksično okolje poteka v treh smereh:

a) zmanjšana celična delitev prepreči nastanek novih celic, ki bi porabljale kisik;

b) poveča se raven glikolize in zmanjša raven oksidativne fosforilacije, saj se kisik pri glikolizi ne porablja in

c) poveča se nastajanje dejavnikov angiogeneze, kar posredno omogoča povečano dostavo kisika.

Mutacije rakavih celic vodijo do napačnega uravnavanja celične delitve in metabolizma med hipoksijo (9). Hipoksija je zaznavna v približno polovici naprednih tumorjev in predstavlja prognostični dejavnik za različne vrste tumorskih obolenj (6). Značilnost malignih tumorskih celic je prilagoditev na hipoksično okolje (10).

#### 1.3 S hipoksijo inducirani dejavnik - 1

Odziv sesalskih celic na hipoksično okolje je izražanje transkripcijskega s hipoksijo induciranega dejavnika - 1 (HIF-1). HIF-1 je eden izmed ključnih dejavnikov uravnavanja homeostaze kisika v organizmu, saj nadzira izražanje več tisoč različnih genov (9). Je heterodimer sestavljen iz podenote HIF-1α, katere raven izražanja je uravnava s koncentracijo kisika v celici in podenote HIF-1β, ki se izraža konstantno (5).

Protein HIF-1a se v normalnih pogojih neprestano izraža in razgrajuje (slika 1A). Raven kisika neposredno vpliva na izražanje HIF-1a preko hidroksiliranja dveh prolinskih ostankov. Hidroksiliranje poteče pod vplivom encima prolil hidroksilaze (PHD), ki za svoje encimsko delovanje potrebuje kisik (11). Posttranslacijska modifikacija povzroči ubikvitinizacijo s pomočjo von Hippel-Lindau tumor supresorskega proteina (VHL). Protein HIF-1a je tako tarča proteasoma, kjer se razgradi (12). V hipoksičnih pogojih je njegova razgradnja zavrta in protein dimerizira s podenoto HIF-1 $\beta$  (slika 1B). Tvori se transkripcijski dejavnik HIF-1, ki se translocira v jedro, kjer se skupaj s transkripcijskim kofaktorjem p300 veže na promotor transkripcije (HRE) (12).



Slika 1: Prikaz življenjskega cikla proteina HIF-1α v normalnih pogojih (A) in v hipoksičnem okolju (B) (povzeto po: https://www.novusbio.com/support/hypoxia-and-hif-faqs; dostop: 10.01.2018).

Protein HIF-1a ima dva paraloga- HIF-2a in HIF-3a. Izražanje prvega je, ravno tako kot pri proteinu HIF-1a, regulirano s koncentracijo kisika. Povzroči aktivacijo drugih genov, ki imajo podoben učinek kot geni aktivirani s podenoto HIF-1a. Protein HIF-3a deluje kot inhibitor proteina HIF-1a. Odkritje njihovih specifičnih vlog pri homeostazi kisika in mehanizmov delovanja je velik izziv za znanost še danes (7).

Povečano izražanje proteina HIF-1a v tumorskih celicah je povezano z večjo umrljivostjo bolnikov zbolelih za rakom (9). Transkripcijski dejavnik HIF-1, ki se aktivira kot posledica stabilizacije in izražanja proteina HIF-1a, predstavlja odgovor na hipoksično okolje. Stimulira izražanje drugih genov in transkripcijskih dejavnikov, ki omogočajo funkcioniranje celice v anaerobnih pogojih (13). Stimulira izražanje glikolitičnih encimov, žilnega endotelijskega rastnega dejavnika (VEGF) in transkripcijo genov, ki nosijo zapis za glukozne prenašalce (14).

Eden glavnih vplivov HIF-1 v rakavih celicah dojke je stimulacija angiogeneze preko aktivacije izražanja VEGF; natančneje podskupine VEGF-A. VEGF-A je odgovoren za angiogenezo in povečano prepustnost žil, ki hitro rastočim rakavim celicam priskrbi potrebne velike količine kisika in hranil (15). Nenormalna rast prekomerno prepustnih žil in hipoksično okolje, ki ga žile ohranjajo, pripomorejo k nastanku metastaz (16).

Zmanjšana raven kisika ima močan vpliv na celični metabolizem. Glukoza in glutamin sta glavna metabolna substrata, katerih izkoriščanje je v rakavih celicah drugačno od zdravega tkiva. S stimulacijo glikolitičnih encimov in glukoznih prenašalcev HIF-1 preusmeri metabolizem glukoze iz oksidativne fosforilacije v anaerobno glikolizo (17).

#### 1.4 Dejavniki, ki vplivajo na aktivacijo HIF-1

Čeprav je hipoksija eden glavnih razlogov za aktivacijo transkripcijskega dejavnika HIF-1, je vedno več dokazov in raziskav namenjenih aktivaciji zaradi ne-hipoksičnih dejavnikov. Med takšne dejavnike spadajo rastni dejavniki, citokini, hormoni in virusni proteini. Njihov glavni vpliv na aktivacijo proteina HIF-1a je preko pospešene translacije in s tem vpliv na kopičenje proteina HIF-1a (18).

Posebno vlogo pri aktivaciji transkripcijskega dejavnika HIF-1 imajo kovinski ioni. Lastnost nekaterih kovin je kancerogenost, toda zelo malo je znano o njihovem mehanizmu delovanja na rakave celice. Ena izmed možnih razlag je indukcija kancerogeneze z vplivom na signalno pot hipoksije (19).

V signalni poti hipoksije je eden izmed pomembnih encimov encim PHD2, ki v normalnih pogojih encimsko katalizira razgradnjo HIF-1a (slika 2A). PHD2 ima za katalitični center železov ion (Fe<sup>2+</sup>), ki katalizira redukcijo kisika. Odgovoren je za hidroksiliranje dveh prolinskih ostankov proteina HIF-1a (Pro-405 in Pro-531). V reakcijo kot substrat vstopa 2-

oksoglutarat, ki se pretvarja v sukcinat. Hidroksiliran HIF-1a je podvržen razgradnji v proteasomu (20). V primeru hipoksije je delovanje encima PHD2 zavrto, HIF-1a ostane v stabilni obliki (slika 2B). Posledično se ne razgradi. Skupaj s HIF-1 $\beta$  tvori transkripcijski dejavnik HIF-1, kar vodi do preživetja celic v hipoksičnem okolju (21). Zaviranje encima PHD2 je povzročeno tudi s kobaltovimi ioni (Co<sup>2+</sup>) v normalnih pogojih. Kobalt posnema učinek hipoksije na protein HIF-1a preko njegove stabilizacije. V encimu se veže na vezavno mesto železovega iona (Fe<sup>2+</sup>) ter s tem zavira hidroksilacijo proteina HIF-1a (22).

Znani aktivatorji transkripcijskega dejavnika HIF-1 so tudi desferoksamin (21), ki kelira železove ione, nikljevi (Ni<sup>2+</sup>) in cinkovi (Zn<sup>2+</sup>) ioni (23). Mehanizem aktivacije pri desferoksaminu je podoben kot pri kobaltovih ionih (21), medtem ko nikljevi in cinkovi ioni vplivajo na ubikvitinacijo že hidroksiliranega proteina HIF-1 $\alpha$  in s tem preprečijo njegovo razgradnjo v proteasomu (23).



Slika 2: Slika A prikazuje normalno delovanje encima PDH2. Slika B prikazuje zaviranje encima PDH2 zaradi tvorbe kisikovih radikalov in dušikovega oksida, ki vplivata na prisotnost kisika v reakciji, ter kobaltovih ionov in desferoksamina, ki vplivata na prisotnost železovih ionov v katalitičnem centru encima (povzeto po: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1043661816311604; dostop: 23.02.2018).

#### 1.5 Nanodelci železovega oksida

Nanotehnologija je pretežno mlado področje znanosti. Je veda, ki se ukvarja z delci, katerih glavna lastnost je vsaj ena dimenzija nanovelikosti (1 nm =  $10^{-9}$  m) (24). Fizikalno-kemijske lastnosti nanodelcev, kot so velika površina, izredna mehanska trdnost, optična aktivnost in kemična reaktivnost, omogočajo njihovo uporabo na številnih področjih (25).

Zanimiva podskupina nanodelcev z jedrom iz kovin so magnetni nanodelci (MND). Sestavljajo jih magnetni elementi (železo, nikelj, kobalt) in njihovi oksidi (25).

Na površju zemlje so naravno prisotni železovi nanodelci, ki se pojavljajo v obliki magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) in maghemita ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Nahajajo se v obliki nanokristalov, ki nastanejo ob vulkanskih izbruhih, požarih, industrijskih emisijah in kot posledica prometa. Pridobivamo jih tudi sintezno, kot industrijski produkt (26). Sintezne metode pridobivanja nanodelcev lahko razdelimo v dve skupini: *»bottom-up*« in *»top-down*« metode. Pri prvem postopku iz osnovnih gradnikov pod nadzorovanimi pogoji zrastejo koloidni delci. Pri drugem postopku pa so velike kovinske delce razbije na manjše (27).

Nanodelci železovega oksida imajo magnetne lastnosti in so primerljive velikosti z biološkimi makromolekulami. To jim omogoča interakcijo s celicami preko celicam lastnih mehanizmov ter njihovo detekcijo z diagnostičnimi tehnikami. Njihove magnetne lastnosti so posledica neenakomerne razporeditve elektronov. Odvisne so od sinteznega postopka, ki je lahko koprecipitacija, termalna dekompozicija ali sinteza z razprševanjem v plamen (25). Njihove magnetne lastnosti opišemo kot superparamagnetne, kar pomeni, da po odstranitvi magnetnega polja sami po sebi ne posedujejo nobenih magnetnih lastnosti (28) (slika 3).



Slika 3: Slikovni prikaz lastnosti superparamagnetnih delcev. Na desni sliki je prikazana ureditev magnetnih domen MND v zunanjem magnetnem polju (povzeto po: S. Bucak, B. Yavuzturk, A.D. Sezer: Magnetic nanoparticles: synthesis, surface modifications and application in drug delivery. InTech; 2012; 7: 165).

#### 1.5.1 Uporaba v biomedicini

Pomembne lastnosti magnetnih nanodelcev železovega oksida, ki omogočajo uporabo v biomedicinske namene, so netoksičnost, biokompatibilnost, možnost intravenske uporabe ter velik delež nalaganja v ciljanem organu oziroma tkivu.

Nekatere formulacije nanodelcev oksidov magnetita so že v uporabi za zdravljenje anemij ter odobrene s strani Ameriške agencije za hrano in zdravila za uporabo kot negativno kontrastno sredstvo pri magnetno resonančnem slikanju. Nanodelci železovega oksida so del kliničnih raziskav za uporabo pri zdravljenju rakavih obolenj s hipertermijo, pri tkivnem inženiringu ter kot nosilci za ciljano dostavo učinkovin. Prav tako je veliko raziskav usmerjenih v uporabo kobaltovih in nikljevih nanodelcev železovih oksidov (29).

#### Magnetno resonančno slikanje

MRI omogoča visoko prostorsko ločljivost kontrasta med različnimi tkivi. Tehnika temelji na obnašanju atomskih jeder v magnetnem polju. Zaradi te edinstvene lastnosti se je pojavila potreba po učinkovitih kontrastnih sredstvih, ki bi uporabo MRI še dodatno izboljšali in razširili njeno diagnostično korist. Kontrastna sredstva razdelimo v T<sub>1</sub> (pozitivna) in T<sub>2</sub> (negativna) (slika 4). Značilnost kontrastnih sredstev je skrajšanje relaksacije protonov vode (30).

V klinični uporabi je kot pozitivno kontrastno sredstvo gadolinij (Gd). Toda gadolinijevi kompleksi predstavljajo tveganje pri bolnikih z boleznimi ledvic in jeter, saj jih njihov organizem ni zmožen odstraniti iz telesa (30).

Kot negativna kontrastna sredstva so v uporabi železovi MND (v obliki magnetita). Potrebne so majhne koncentracije za doseganje kontrasta. Z zmanjšanjem velikosti delcev in oplaščenjem lahko povečamo njihovo zadrževanje v telesu (29). Nanodelci so funkcionalizirani tako, da se vežejo na rakavo tkivo in delujejo kot kontrastno sredstvo pri zaznavanju rakavih tvorb. V razvoju so monoklonska protitelesa vezana na plašč nanodelcev železovega oksida, ki omogočajo specifično detekcijo tarčnega tkiva (31). Zaradi njihovega nalaganja v jetrih, ledvicah in limfnih vozlih imajo tudi nanodelci železovega oksida omejeno uporabo. V razvoju so železovi MND, ki bi se lahko uporabljali kot pozitivna kontrastna sredstva pri MRI (30).



Slika 4: Diagnosticiranje raka dojke z MRI. Spodnja slika je posneta s pozitivnim kontrastnim sredstvom, zgornja slika je posneta z negativnim kontrastnim sredstvom (povzeto po: https://www.medscape.org/viewarticle/774824; dostop: 23.02.2018).

#### <u>Hipertermija</u>

Hipertermija je obetaven pristop zdravljenja rakavih obolenj. Ni specifično zdravljenje, saj ga lahko uporabimo za uničenje različnih vrst tumorskih celic. S segrevanjem do temperature 42,5–45 °C poškodujemo rakave celice. Tehnični problem hipertermije je vpliv visokih temperatur na sosednja tkiva. Shematski prikaz zdravljenja s hipertermijo je prikazan na sliki 5.

V razvoju je koncept znotrajcelične hipertermije. Magnetni nanodelci se naložijo v rakavem tkivu. Če takšno tkivo izpostavimo izmeničnemu zunanjemu magnetnemu polju MND generirajo toploto. Izmenično magnetno polje povzroči spremembe znotraj nasprotno orientiranih magnetnih domen delca. Posledica je notranje trenje, ki se izraža v sprostitvi toplote (32). Prve uspešne poskuse so izvedli z MND, ki so bili oplaščenimi z dekstranom, na rakavih celicah mlečnih žlez podgan (33).



Slika 5: Shematski prikaz zdravljenja rakavih obolenj s hipertermijo (povzeto po: https://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and-challenges/coating-nanomagnetic-particles-for-biomedical-applications; dostop: 03.01.2018).

#### Tkivni inženiring

Tkivni inženiring predstavlja svetlo prihodnost za transplantacije organov. Zaradi odzivnosti na zunanje magnetno polje predstavljajo MND obetaven pristop k tvorbi novih tkiv, saj usmerjajo rast celic v tkivnem nadomestku. Celice epidermisa (keratinocite) lahko gojimo *in vitro* ter s tem rekonstruiramo kožno tkivo. Keratinocite, ki so označeni z MND, lahko s pomočjo magnetnega polja stimuliramo k 3D rasti (29).

#### Ciljana dostava učinkovin

Dostava in porazdelitev konvencionalnih kemoterapevtikov v telesu je zelo nespecifična. Le-ti posledično delujejo tako na zdrave kot na rakave celice. Potrebni so veliki odmerki zdravila, da le-to v zadostni meri deluje na tarčno mesto. Posledice so resni neželeni učinki. MND predstavljajo alternativni dostavni sistem za vnos kemoterapevtikov. Uporabni so kot diagnostično sredstvo in hkrati kot nosilec učinkovine (34). Glavne lastnosti ciljane dostave učinkovin so dostava učinkovine na prizadeto mesto v telesu, zmanjšanje učinka na okoliška tkiva in nadzor nad sproščanjem učinkovine v izogib prekomernemu/ premajhnemu odmerjanju. MND predstavljajo nosilec z vsemi zgoraj naštetimi lastnostmi (35). Plašč oz. obloga MND omogoča nadzor nad sproščanjem učinkovine in poveča biokompatibilnost delca.

Osnova uporabe MND za ciljan vnos učinkovin je njihova odzivnost na magnetno polje. S pomočjo zunanjega magnetnega polja lahko delec z učinkovino usmerimo na točno določeno anatomsko mesto v telesu (28). Zaradi hipoksije tumorskega okolja je zunajcelični pH nižji (pH 5,8–7,2) od zunajceličnega okolja zdravih celic in plazme (pH 7,4). Znotraj subceličnih struktur rakavih celic, kot so lizosomi in endosomi, je pH še dodatno nižji. To omogoča nadzorovano sprostitev učinkovine izključno v kislem okolju, če je dostavni sistem odziven na spremembo pH-ja. S takšnim načinom dostave učinkovin se izognemo neželenim učinkom, ki pri klasičnem vnosu kemoterapevtikov nastanejo na zdravih celicah (36).

Prve klinične študije s ciljano dostavo MND so izvedli leta 1996. MND so bili funkcionalizirani z epirubicinom in aplicirani pacientom z naprednimi rakavimi obolenji. Dokazali so dobro toleranco telesa na ferofluide. V nadaljnjih kliničnih preiskavah so dokazali uspešno dostavo učinkovine na obolelo anatomsko mesto ter uspešen učinek na 64–91 % tumorskih celic (37).

#### 1.5.2 Toksičnost magnetnih nanodelcev

Uporaba nanotehnologije in nanodelcev je vedno bolj razširjena. Poznavanje toksičnosti samih nanodelcev pa je še zmeraj v fazi raziskav. Pojem toksičnost predstavlja učinke nevarne za ljudi, živali in okolje. Švicarski renesančni znanstvenik Paracelsus, znan kot oče toksikologije, je dejal, da le odmerek loči zdravilo od strupa. V primeru nanodelcev pa je njihova toksičnost odraz ne le odmerka, ampak številnih dejavnikov, kot so koncentracija, površinske lastnosti nanodelcev, velikost in oblika nanodelcev, kemijske sestave, časa izpostavitve itn. (38).

#### Površinske lastnosti

Mehanizmi interakcij nanodelcev z živimi organizmi še niso popolnoma poznani. Kompleksnost razumevanja interakcij je povezana z lastnostmi nanodelcev. Zaradi velike površine v primerjavi z volumnom so nanodelci zelo reaktivni. Zato je eden ključnih dejavnikov povezan z njihovo toksičnostjo njihova površina (38).

Neoplaščeni MND imajo navadno zelo nizko topnost, kar se v vodnem mediju izrazi kot precipitacija. Obarjanje vodi do tvorbe skupkov delcev, ki lahko krvne žile zamašijo. Zaradi velike toksičnosti neoplaščenih MND so v raziskovanju in tudi že v uporabi oplaščeni MND (35).

Oplaščeni nanodelci imajo manjšo toksičnost, saj plašč nanodelca omogoča boljšo biokompatibilnost in manjšo vezavo proteinov, ionov in drugih komponent medija ali iz mikrookolja (39). Površinske lastnosti nanodelcev so torej eden izmed ključnih parametrov, ki vplivajo na toksičnost nanodelcev. Je zelo pomemben dejavnik biokompatibilnosti. Zagotavlja podaljšan razpolovni čas (35). Kot plašč maghemitnih MND se uporabljata polietilenimin-polietilenglikol (PEI-PEG) in polietilenglikol (PEG) (40). Široko uporabo omogočajo tudi MND oplaščeni z dekstranom ali hitosanom (35). Bolj kot so MND skupaj s plaščem kompleksni, manjša je njihova toksičnost v primerjavi z neoplaščenimi MND, saj se lažje izločijo iz telesa (41).

#### Koncentracija

Koncentracija nanodelcev vnešenih v organizem je eden izmed ključnih dejavnikov toksičnosti. Koncentracije potrebne za biomedicinske namene so najpogosteje manjše od meje citotoksičnosti (42).

#### Velikost in sestava nanodelcev

Raven toksičnosti in celični privzem delcev sta odvisna od mnogih dejavnikov, med drugim tudi od velikosti in oblike nanodelcev (35). Manjši kot so delci, večja je verjetnost, da se bodo nalagali v celicah in tkivih ter se s tem posledično kasneje izločili iz telesa (43).

Na toksičnost lahko pomembno vpliva kemijska sestava nanodelca:

- Maghemit in magnetit sta nanodelca železovega oksida. Železo je v organizmu naravno prisotno. Med drugim je železo prisotno v beljakovinah, kot sta hemoglobin in mioglobin. Hemoglobin v rdečih krvnih celicah omogoča vezavo in prenos kisika od pljuč po vsem organizmu, mioglobin v mišičnih celicah pa je odgovoren za vezavo in shranjevanje kisika potrebnega za nemoteno delovanje mišic. Toda ob prekomernem kopičenju je lahko železo zelo toksično. Iz maghemitnih nanodelcev se potencialno sproščajo Fe<sup>3+</sup> ioni. Iz jedra magnetitnih nanodelcev pa se sproščajo Fe<sup>2+</sup> ioni. Generirajo se lahko toksični radikali (43).
- Kobalt feritni nanodelci so veliko manj raziskani kot MND na osnovi železovih oksidov. V zadnjih letih je uporaba kobalta prešla iz industrije na področje medicine. V organizmu je kobalt v majhnih količinah fiziološko prisoten. Podatki o toksičnosti so zelo omejeni. Dokazane so interakcije z nukleinskimi kislinami, sprožitev vnetja in oksidativnega stresa. Kobalt je po IARC klasifikaciji (angl. *International Agency for Research on Cancer*) uvrščen kot možno kancerogen za ljudi (skupina 2B). Kljub temu je njegova uporaba v industrijskih in biomedicinskih aplikacijah široka (44).

#### Mehanizem toksičnosti

Mehanizem toksičnosti nanodelcev je lahko fizikalni ali kemijski (slika 6). Kemijski mehanizem zajema nastajanje reaktivnih kisikovih spojin, sproščanje toksičnih ionov, motnje v membranskem transportu ionov/elektronov, oksidacijo in lipidno peroksidacijo.

Tvorba ROS je eden izmed glavnih kemijskih procesov, ki potečejo med nanodelcem in biološkim okoljem. Vodi do sekundarnih procesov, ki lahko povzročijo poškodbe celic oziroma celično smrt. Povezani so z vnetnimi reakcijami. Razlog fizikalnih interakcij med nanodelci in organizmom so površinske lastnosti delca in njegova velikost. Povzročijo lahko motnje v aktivnosti membrane, transportnih procesih, zvijanju in agregacijo proteinov (38). Eden izmed potencialnih in razmeroma neraziskanih posrednih toksičnih učinkov magnetnih nanodelcev je vpliv na rast in razvoj rakavih celic v telesu preko poseganja v izražanje in stabilizacijo proteina HIF-1a.



Slika 6: Mehanizmi toksičnosti nanodelcev so fizične poškodbe lizosomov, mitohondrijev in membran, poškodbe DNA, lipidna peroksidacija celičnih vezikularnih struktur, napačno zvijanje in oksidacija proteinov (povzeto po: Andreas Elsaesser, C. Vyvyan Howard: Toxicology of nanoparticles. Advanced drug delivery reviews; 2012; 64: 129-137).

#### 2. Namen

Magistrska naloga bo razdeljena na dva dela. V prvem delu bomo ovrednotili toksičnosti neoplaščenih in s poliakrilno kislino oplaščenih maghemitnih in kobalt feritnih nanodelcev. Primerjali bomo vpliv dveh različnih vrst nanodelcev železovega oksida in vpliv plašča poliakrilne kisline na živost celic. Določili bomo tudi odvisnost toksičnosti od koncentracije nanodelcev. Toksičnost bomo vrednotili z vplivom delcev na živost celic raka dojke MDA MB-231.

V drugem delu magistrske naloge bomo raziskovali, ali lahko nanodelci uporabljeni za biomedicinske namene, spodbudijo oziroma zavrejo aktivacijo transkripcijskega dejavnika HIF-1 preko stabilizacije HIF-1a podenote. Zanimalo nas bo, ali imajo uporabljeni nanodelci neželeni vpliv na signalizacijo celic. To je relevantno, ker lahko z nanodelci, ki jih uporabimo kot diagnostično sredstvo ali kot nosilec protirakave učinkovine, vplivamo na razvoj oz. potek rakavega obolenja. Ovrednotili bomo tudi vpliv površinskih lastnosti (tj. plašča) nanodelca na izražanje HIF-1a. Pripravili bomo vzorce celic, ki jih bomo inkubirali z MND. Uporabili bomo celično linijo raka dojke (MDA-MB-231). Za raka dojke je namreč značilen zgodnji pojav hipoksije in večje izražanje transkripcijskega dejavnika HIF-1. Na podlagi rezultatov določanja živosti se bomo odločili za koncentracijo, brez značilnega učinka na živost celic, s katero bomo nadaljevali poskuse izražanja proteina HIF-1a. Kot kontrolo bomo uporabili celice v bazalnih razmerah. Pripravili bomo tudi dve dodatni kontroli. Kot prvo bomo uporabili CoCl<sub>2</sub>, ki dokazano aktivira izražanje proteina HIF-1a.

#### Hipoteze:

- Nanodelci z nespremenjeno površino (tj. neoplaščeni) so bolj toksični kot oplaščeni nanodelci.
- 2. Kobalt feritni nanodelci so bolj toksični kot maghemitni nanodelci.
- 3. Magnetni nanodelci vplivajo na izražanje proteina HIF-1a.

## 3. Materiali in metode

## 3.1 Materiali

Preglednica I: Laboratorijska oprema

| Laboratorijska oprema                        | Model                                   | Proizvajalec, država porekla                      |
|--|---|---|
| Avtoklav                                     | A-21CA                                  | Kambič laboratorijska oprema<br>d.o.o., Slovenija |
| Aseptična komora z laminarnim pretokom zraka | MC 18-2                                 | Iskra PIO, Slovenija                              |
| Inkubator                                    | 1-CO2-150 SH                            | Kambič laboratorijska oprema<br>d.o.o., Slovenija |
| Aspirator                                    | Aspeed professional                     | SA Healthcare, Južna Afrika                       |
| Svetlobni mikroskop                          | AE 2000                                 | Motic, Kitajska                                   |
| Fluorescenčni mikroskop                      | Zeiss Axiovert 200                      | Carl Zeiss d.o.o., Slovenija                      |
| Sonikator                                    | UP50H                                   | Hielscher, Nemčija                                |
| Spektrofotometer                             | Tecan Infinite 200, program<br>Magellan | Tecan, Švica                                      |
| Stresalnik                                   | /                                       | Ependorf, Nemčija                                 |
| Gojitvena posoda                             | $T75 - 75 \text{ cm}^2$                 | Techno Plastic Products AG,<br>Nemčija            |
| Mikrotiterska plošča                         | 24 jamic, 6 jamic                       | Techno Plastic Products AG,<br>Nemčija            |
| Pipeta                                       | Reference 2                             | Eppendorf, Nemčija                                |
| Hemocitometer                                | /                                       | Blaubrand, Nemčija                                |
| Mikrocentrifugirke                           | 0,5 mL; 1,5 mL; 2 mL                    | Sarstedt, Nemčija                                 |
| Plastično strgalo                            | Cell scrapper, 28 cm lenght             | Greiner BioOne, Nemčija                           |
| Oprema za SDS - PAGE                         | BioRad Criterion Cell                   | BioRad Laboratories Inc., ZDA                     |
| Oprema za prenos western                     | BioRad Criterion Blotter                | BioRad Laboratories Inc., ZDA                     |
| Naprava za razvijanje<br>rentgenskih filmov  | Curix 600                               | Agfa Healthcare, Belgija                          |
| Rentgenski film                              | CP-BU new, Medical X-ray film blue      | Agfa Healthcare, Belgija                          |

| Denzitometer         | Denzitometer GS-800 | BioRad, ZDA   |
|----------------------|---------------------|---|
| Vodna kopel          | Uniterm             | Uniequip Laborgerätebau- und<br>Vertriebs GmbH, Nemčija |
| Pipetor              | /                   | Gilson SAS, Francija                                    |
| Mini centrifuga      | /                   | Eppendorf, Nemčija                                      |
| Vibracijski mešalnik | /                   | IKA, Nemčija  |

## Preglednica II: Biološki material

| Biološki material  | Proizvajalec, država porekla |
|--|------------------------------|
| Celice MDA-MB 231  | ATCC, ZDA                    |
| Primarna protitelesa: kunčja primarna protitelesa<br>proti HIF-1α, redčitev 1 : 1000   | Novus Biologicals, ZDA       |
| Sekundarna protitelesa: kozja protitelesa proti<br>kunčjim protitelesom konjugirana s hrenovo<br>peroksidazo (170 – 6515), redčitev 1 : 20 000 | BioRad, Hercules, ZDA        |

## Preglednica III: Material

| Material  | Proizvajalec, država porekla                      |
|---|---|
| Kobalt feritni nanodelci  | Nanotesla Inštitut Ljubljana, Slovenija           |
| Maghemitni nanodelci  | Fakulteta za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani |
| Poliakrilna kislina (PAA)   | Sigma-Aldrich                                     |
| Membrana za dializo: MWCO 20 kDa  | Spectrum Laboratories, USA                        |
| Celulozni filter: 0,2 µm  | Sartorious AG, Goettingen, Germany                |
| 70 % Denaturiran etanol   | Itrij kemični inženiring d.o.o., Slovenija        |
| 0,25 % Tripsin EDTA   | Gibco, ZDA  |
| RPMI gojišče (500 mL)   | Genaxxon Bioscience, Nemčija                      |
| Glukoza (1 M)   | Sigma-Aldrich, Nemčija                            |
| L-glutamin (200 mM)   | Sigma-Aldrich, Nemčija                            |
| Fetusni serum goveda (FBS) (10 %)   | Gibco, ZDA  |
| NaCl  | B. Brown, Germany                                 |
| Prečiščena voda   | B. Brown, Germany                                 |
| Barvilo Hoechst: 33342  | Molecular Probes, ZDA                             |
| Propidijev jodid  | Sigma-Aldrich, Nemčija                            |
| Pierce 660 nm Protein Assay kit   | Thermo Scientific, ZDA                            |
| Metanol   | Alkaloid AD, Makedonija                           |
| <u>SDS – PAGE:</u> gel Criterion XP   | BioRad Laboratories Inc., ZDA                     |
| Prenos western: poliviniliden difluoridna (PVDF)<br>membrana Immobilon-P      | Millipore Corporation, ZDA                        |
| Označevalec velikosti Full Range Rainbow <sup>TM</sup><br>Recombinant protein | GE Healthcare, ZDA                                |
| Barvilo Ponceau S   | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija                |
| Mleko v prahu   | Pomurske mlekarne, Slovenija                      |
| Ocetna kislina (5 %)  | Sigma-Aldrich, Nemčija                            |
| Pierce Enhanced Chemiluminescence (ECL)<br>Western Blotting Substrate         | Thermo scientific, ZDA                            |

## Preglednica IV: Pufri

| Pufer  | Proizvajalec, država porekla                                  |
|--|---|
| <u>Fosfatni pufer z NaCl (PBS):</u><br>Fosfatni pufer<br>NaCl  | Priprava na Fakulteti za elektrotehniko, Univerza v Ljubljani |
| Pufer Laemmeli za pripravo vzorcev (LB):Destilirana vodaTris-HCl (pH = 6,8)Bromofenolno modroNatrijev dodecil sulfat (SDS) $\beta$ -merkaptoetanolGlicerol | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija                            |
| Pufer za SDS - PAGE: XT MES Running Buffer   | BioRad Laboratories Inc., ZDA                                 |
| <u>Tris glicinski pufer za prenos:</u><br>Destilirana voda<br>Glicin<br>Tris baza  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija                            |
| <u>TBST (angl. Tris Buffered Saline with Tween):</u><br>Destilirana voda<br>NaCl<br>HCl, 1 M<br>Tris baza  | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Nemčija                            |

#### 3.2. Metode

#### 3.2.1 Celice MDA-MB-231

Kot eksperimentalni model smo uporabili človeške MDA-MB-231 celice, ki so celice adenokarcinoma dojke.

#### Celični medij

Za celični medij smo uporabili RPMI gojišče proizvajalca Genaxxon Bioscience. Dodali smo mu 12,5 mL glukoze, 50 mL fetusnega govejega seruma in 5,0 mL L-glutamina. Antibiotikov nismo dodali.

#### Gojenje celic

Celice smo gojili v 5 % CO<sub>2</sub> atmosferi pri 37 °C in 100 % vlažnosti v celičnem mediju. Vsi poskusi so bili narejeni 24 h po nasajanju, ko so bile celice v fazi eksponentne rasti.

#### Presajanje celic

Celice smo presajali pri 80–90 % konfluentnosti. Iz gojitvene posode smo odsesali medij in celice sprali z raztopino natrijevega klorida. Dodali smo jim segreto raztopino tripsina ter jih inkubirali 2 – 4 min, da so se ločile od podlage. Ko so se celice odlepile od podlage, smo tripsinizacijo ustavili z dodatkom pripravljenega celičnega medija. Število celic smo določili s hemocitometrom. 10  $\mu$ L suspenzije celic smo prenesli na hemocitometer ter pod mikroskopom prešteli število celic v štirih velikih kvadratih (slika 7). Z enačbo *I* smo izračunali koncentracijo celic v 1 mL suspenzije ter jih naprej presajali v želenih koncentracijah.



Slika 7: Štetje celic s pomočjo hemocitometra. Štejejo se celice v štirih velikih kvadratih in njihovih zunanjih robovih.

Koncentracija živih celic/mL 
$$=rac{ extsf{Stevilo prestetih celic}}{4} imes 10^4$$

Enačba 1

#### 3.2.2 Nanodelci železovih oksidov

Maghemitni in kobalt feritni nanodelci so bili pripravljeni z metodo koprecipitacije železovih soli. Priprava maghemitnih jeder in oplaščenje nanodelcev sta potekala na Fakulteti za elektrotehniko. Priprava kobalt feritnih nanodelcev in vrednotenje nanodelcev s fotonsko korelacijsko spektroskopijo sta bila opravljena na Nanotesla Inštitutu v Ljubljani (Nanotesla institut - razvojni center Nanotehnologij na področju magnetnih materialov in kompozitov, Ljubljana, Slovenia). Nanodelci so bili oplaščeni z vodno raztopino natrijeve soli poliakrilne kisline. Velikost pripravljenih nanodelcev je prikazana v preglednici V.

| Vrsta nanodelcev                         | Povprečna velikost nanodelcev |
|--|-------------------------------|
| Kobalt feritni nanodelci                 | 15 nm                         |
| Kobalt feritni nanodelci oplaščeni s PAA | 33 nm                         |
| Maghemitni nanodelci                     | 30 nm                         |
| Maghemitni nanodelci oplaščeni s PAA     | 200 nm                        |

Preglednica V: Hidrodinamski premer pripravljenih nanodelcev.

#### 3.2.3 Živost celic

Celice smo nasadili v mikrotitrsko ploščo s 24 jamicami. Število nasajenih celic je bilo 40.000 celic na jamico. Z enačbo (enačba 2) smo izračunali volumen suspenzije celic, ki smo ga prenesli iz gojitvene posode v centrifugirko. Dodali smo izračunan volumen celičnega medija (enačba 3). V vsako jamico smo prenesli 0,5 mL pripravljene suspenzije celic.

| Volumon susnenzije colic — | Število celic na mikrotiterski plošči × število jamic |
|----------------------------|---|
| volumen suspenzije celic – | Koncentracija živih celic (v gojitveni posodi)/mL     |

Enačba 2

```
Volumen \ cel.medija = (\check{S}tevilo \ jamic \ \times Volumen \ jamice) - Volumen \ susp.celic
```

Enačba 3

Poskus smo izvedli po 24-urnem gojenju celic v 5 % CO<sub>2</sub> atmosferi pri 37 °C. Celicam smo zamenjali medij ter jim dodali nanodelce s koncentracijami od 2  $\mu$ g/mL do 200  $\mu$ g/mL. Kot negativno kontrolo smo uporabili celice brez dodatka nanodelcev. Po 24-urni inkubaciji celic z nanodelci smo celicam nanodelce odstranili tako, da smo jih sprali s celičnim medijem. Celice smo 15 minut barvali z barvilom Hoechst (2  $\mu$ g/mL) in nato 5 minut s propidijevim jodidom (0,15 mM). Barvili smo redčili s celičnim medijem. Prvo barvilo je obarvalo jedra živih in mrtvih celic, saj se veže na DNA. Drugo barvilo je obarvalo le mrtve celice, saj prehaja samo poškodovane membrane mrtvih celic. Celice smo slikali s fluorescenčnim mikroskopom ter prešteli celice obarvane z enim in drugim barvilom. Slikali smo tudi fazni kontrast, kjer sta vidna morfologija celic in prisotnost nanodelcev. Vsak poskus je bil opravljen v dveh tehničnih paralelah.

Živost celic inkubiranih z nanodelci smo izračunali po enačbi 4.

| Odstotek živosti glede na kontrolo [%] = | Število živih celic v vzorcu x 100 |
|--|------------------------------------|
|  | Število vseh celic v kontroli      |

Enačba 4

#### 3.2.4 Izražanje proteina HIF-1a

#### Priprava vzorcev

Celice smo nasadili v mikrotitrsko ploščo s 6 jamicami. Število nasajenih celic je bilo 500.000 celic na jamico. Z enačbo (enačba 2) smo izračunali volumen suspenzije celic, ki smo ga prenesli iz gojitvene posode v centrifugirko. Dodali smo izračunan volumen celičnega medija (enačba 3). V vsako jamico smo prenesli 2,5 mL pripravljene suspenzije celic. Po 24-urnem gojenju celic v 5 % CO<sub>2</sub> atmosferi pri 37 °C smo celicam zamenjali celični medij.

Glede na vrsto poskusa smo celicam dodali izbrane nanodelce tako, da je bila končna koncentracija nanodelcev v jamici 50  $\mu$ g/mL. Nanodelce smo redčili s celičnim medijem. Primer izračuna in priprave ustreznih koncentracij nanodelcev je prikazan v enačbi 5 in v preglednici VI.

| $V_{osnovne\ red \check{c}itve}$ = | Končna koncentracija $	imes$ Vjamice |
|------------------------------------|--------------------------------------|
|                                    | Koncentracija osnovne redčitve       |

Enačba 5

|                                      | Začetna<br>koncentracija<br>pripravljenih<br>nanodelcev | Koncentracija<br>osnovne<br>redčitve | Priprava<br>osnovne<br>redčitve                 | Končna<br>koncentracija | V <sub>osnovne</sub><br>redčitve | Vceličnega<br>medija |
|--------------------------------------|---|--------------------------------------|---|-------------------------|----------------------------------|----------------------|
| Kobalt<br>ferit                      | 30 mg/mL  | 200 µg/mL                            | 20 μL (ND)<br>+ 2980 μL (<br>cel. medija)       | 50 μg/mL                | 0,625 mL                         | 1,875 mL             |
| Maghemit                             | 100 mg/mL   | 200 μg/mL                            | 6 μL (ND)<br>+ 2994 μL<br>(cel.<br>medija)      | 50 μg/mL                | 0,625 mL                         | 1,875 mL             |
| Kobalt<br>ferit<br>oplaščen s<br>PAA | 6 mg/mL   | 200 μg/mL                            | 100 μL<br>(ND) +<br>2900 μL<br>(cel.<br>medija) | 50 μg/mL                | 0,625 mL                         | 1,875 mL             |
| Maghemit<br>oplaščen s<br>PAA        | 2,9 mg/mL   | 200 μg/mL                            | 207 μL<br>(ND) +<br>2793 μL<br>(cel.<br>medija) | 50 μg/mL                | 0,625 mL                         | 1,875 mL             |

Preglednica VI: Priprava suspenzije nanodelcev s koncentracijo 50 µg/mL.

Naredili smo štiri različne poskuse. Celicam smo dodali:

- I. Različne vrste nanodelcev (kobalt feritne nanodelce, kobalt feritne nanodelce oplaščene s PAA, maghemitne nanodelce, maghemitne nanodelce oplaščene s PAA);
- II. Kobalt feritne nanodelce oplaščene s PAA v različnih časovnih točkah (24 h, 6 h, 2 h, 1 h in 0,5 h);
- III. Kobalt feritne nanodelce oplaščene s PAA. Prvi vzorec inkubiranih celic smo sprali in lizirali po 24 h, drugi vzorec inkubiranih celic smo sprali po 24 h, jim zamenjali gojišče ter jih lizirali po 72 h od začetka inkubacije;
- IV. Kobalt feritne nanodelce oplaščene s PAA in maghemitne nanodelce oplaščene s PAA. Uporabili smo nanodelce, ki so bili dializirani do 24 h pred inkubacijo celic in nanodelce, ki so bili pripravljeni vsaj pred enim mesecem.

Celice smo z nanodelci inkubirali 24 ur (razen v II. poskusu). Kot kontrolo smo uporabili celice v bazalnih razmerah – nasajene na mikrotitersko ploščo v celičnem mediju brez dodanih nanodelcev. Uporabili smo dve dodatni kontroli. Kot prvo kontrolo smo uporabili 250  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>, ki dokazno aktivira HIF-1a. Kot drugo kontrolo smo uporabili 300  $\mu$ M FeCl<sub>2</sub>, ki dokazano zniža aktivacijo HIF-1a. Obe kontroli smo redčili s celičnim medijem. Inkubacija je potekala 6 ur.

#### Meritev koncentracije proteinov

Celice MDA smo po inkubaciji z nanodelci sprali z ledeno mrzlim PBS ter jih lizirali z 1x Laemmlijevim pufrom. Prenesli smo jih iz mikrotiterskih plošč v mikrocentrifugirke ter jih sonicirali. Sledila je meritev koncentracije proteinov. Uporabili smo Pierce 660 nm Protein Assay kit. Na mikrotitersko ploščo s 96 jamicami smo vnesli 10  $\mu$ L vzorca in 10  $\mu$ L standardov. Nanešenim vzorcem in standardom smo dodali 150  $\mu$ L pripravljenega reagenta. Standardi in reagent so bili del Pierce 660 nm Protein Assay kit-a. S spektrofotometrom Tecan 200 smo pomerili absorbanco pri valovni dolžini 660 nm. S pomočjo meritev standardov smo narisali umeritveno krivuljo. Iz enačbe krivulje smo izračunali koncentracije proteinov v vzorcih.

Pripravili smo vzorce z enakimi koncentracijami proteinov. Sledilo je mešanje z vibracijskim mešalnikom in denaturacija 20 min pri 56 °C.

#### Poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega dodecil sulfata (SDS – PAGE)

SDS - PAGE je metoda ločevanja proteinov na osnovi njihove velikosti. Nanešeni vzorci potujejo pod vplivom električnega polja v gelu, ki deluje kot molekulsko sito. SDS je anionska površinsko aktivna snov, ki se nespecifično veže na proteine in jih denaturira. Zaradi vezave na molekule proteinov imajo proteini naboj sorazmeren masi. Endogeni naboj tako ne vpliva na mobilnost v električnem polju.

Pripravljene vzorce (opisani pod točkami od I. do V.) smo nanesli na elektroforezni gel. Količina nanosa vzorca na gel je odvisna od števila jamic v gelu. V gel z 18 jamicami smo nanesli 25  $\mu$ L vzorca, v gel z 12 jamicami pa 45  $\mu$ L vzorca. Uporabili smo 4 - 12 % gradientni gel (NuPage novex Bis Tris gel). Elektroforeza je potekala 40 min pri napetosti 200 V.

#### Western Blot

Po končani elektroforezi smo sestavili kaseto za prenos western. Ker protitelesa, ki jih uporabimo za imunodetekcijo proteinov, ne prehajajo v elektroforezni gel, smo proteine prenesli na membrano. Uporabili smo poliviniliden difluoridno (PVDF) membrano. Prenos je potekal 60 min pri napetosti 100 V.

#### Barvanje z barvilom Ponceau S

Po prenosu smo membrano obarvali z barvilom Ponceau S. Barvilo Ponceau S je natrijeva sol diazo barvila, ki se reverzibilno veže na proteine ter jih obarva rdeče. Membrano smo z barvilom barvali 5 minut na nihajoči mizici. Tako smo preverili uspešnost prenosa. Razrezali smo jo na dva pasova, kjer sta bila iskana proteina HIF-1a in aktin. Membrano smo razbarvali s pomočjo spiranja v pufru TBST.

Glede na uporabljeni marker (Full Range Rainbow) je navidezna velikost proteina HIF-1a med 102 kDa in 150 kDa, velikost aktina pa med 38 kDa in 52 kDa. Aktin smo izbrali kot endogeno kontrolo, saj je kot pomembna komponenta citoskeleta v celicah prisoten v velikih koncentracijah. Služi kot pokazatelj uspešnega in enakomernega nanosa vzorca na gel.

#### Blokiranje membrane in inkubacija s protitelesi

Sledilo je blokiranje membrane s 5 % posnetim mlekom v prahu, raztopljenim v TBST pufru. S tem smo preprečili vezavo drugih proteinov na nezasedena mesta membrane. Nato smo membrano inkubirali s primarnimi kunčjimi protitelesi, ki so se vezala na iskani protein. Sledilo je inkubiranje s sekundarnimi kozjimi protitelesi proti kunčjim primarnim protitelesom. Sekundarna protitelesa smo redčili z blokirnim mlekom (5 % mleko razredčeno v TBST pufru) v razmerju 1:10 000. Označena so bila z encimom hrenovo peroksidazo. Proteine smo detektirali na rentgenskem filmu (v temnici) z uporabo metode ojačane kemiluminiscence. Na mestu, kjer je iskani protein, je zaradi kemiluminiscence na rentgenskem filmu vidna lisa (slika 8).



Slika 8: Princip detekcije iskanega proteina s kemiluminiscenco. Na sekundarno protitelo je vezan encim (v našem primeru hrenova peroksidaza (HRP)), ki ob inkubaciji s kemiluminiscenčnim substratom oddaja svetlobo (prirejeno po: http://www.novusbio.com/support/support-by-application/western-blot/illustrated-assay.html; dostop: 30.3.2018).

#### Denzitometrija

Po ekspoziciji membrane v temnici smo s pomočjo denzitometrije določili intenziteto odzivov različnih vzorcev. Uporabili smo denzitometer (Denzitometer GS-800) in kvantificirali inteziteto odzivov s programom Quantity One.

#### 3.2.5 Statistična analiza

Rezultate smo statistično analizirali s programom GraphPad Prism 6. Predstavljeni so kot povprečna vrednost bioloških paralelk s standardno napako povprečja. Uporabili smo enosmerno analizo variance (ANOVA), ki ji je sledil Dunnetov *post hoc* test, ali Friedmanov test, ki mu je sledil Dunnov *post hoc* test. Vsak vzorec smo primerjali s kontrolo in določili statistično značilne razlike, ki so označene z zvezdico (\*). Kot mejo statistične značilnosti smo upoštevali P < 0,05. Oznaka n pomeni število bioloških ponovitev.

## 4. Rezultati

#### 4.1 Živost celic MDA-MB-231 pri izpostavitvi MND

Vpliv na preživetje celic MDA-MB-231 po izpostavitvi naraščajočim koncentracijam nanodelcev smo določili z diferencialnim barvanjem za žive in mrtve celice. Uporabili smo neoplaščene maghemitne in kobalt feritne nanodelce ter oplaščene maghemitne in kobalt feritne nanodelce. S tem poskusom smo želeli določiti koncentracijo, pri kateri nanodelci nimajo signifikantnega vpliva na živost celic.

#### 4.1.1 Neoplaščeni maghemitni nanodelci

Najprej smo preverili toksičnost neoplaščenih maghemitnih nanodelcev. Rezultati treh bioloških paralelk so prikazani na sliki 9. Najmanjša živost celic je bila pri koncentraciji 50 µg/mL, kjer je prišlo do statistično značilnega zmanjšanja živosti celic v primerjavi s kontrolo. Povprečna živost pri tej koncentraciji je znašala le 70,5 %. Pri ostalih koncentracijah zmanjšanje živosti ni statistično značilno. Na slikah faznega kontrasta so pri koncentracijah 100 µg/mL in 200 µg/mL dobro vidni majhni črni skupki maghemitnih nanodelcev (slika 10).



Slika 9: Živosti celic po 24-urni inkubaciji z neoplaščenimi maghemitnimi nanodelci v različnih koncentracijah. Živost smo ugotavljali s testom Hoechst/PI. Prikazano je povprečje treh bioloških paralelk in njihova standardna deviacija (n = 3). Do statistično pomembne razlike je prišlo pri koncentraciji 50  $\mu$ g/mL (\*P < 0,05).



Slika 10: Celice, inkubirane z neoplaščenimi maghemitnimi nanodelci v različnih koncentracijah, prikazane z različnimi barvanji. Prikazani so fazni kontrast (Fc), kjer je vidna morfologija celic, s Hoechstom so obarvana jedra živih in mrtvih celice (H), s propidijevim jodidom so obarvane mrtve celice (PI) in prekrivanje fluorescenčnih slik (Composite).

#### 4.1.2 Neoplaščeni kobalt feritni nanodelci

Poskuse živosti smo nadaljevali z drugo vrsto MND – neoplaščenimi kobalt feritnimi nanodelci. Po 24-urni izpostavitvi celic MDA-MB-231 različnim koncentracijam neoplaščenih kobalt feritnih nanodelcev se živost celic ni izrazito spremenila. Živost celic je pri izpostavitvi MND v vseh primerih primerljiva s kontrolo. Odstotek živosti ni bil pri nobeni koncentraciji manjši od 94 %. Rezultati štirih bioloških paralelk so prikazani na sliki 11. Na slikah faznega kontrasta so zelo dobro vidni črni skupki nanodelcev (slika 12). Opazimo jih že pri koncentraciji 50 µg/mL.



Slika 11: Živosti celic po 24-urni inkubaciji z neoplaščenimi kobalt feritnimi nanodelci v različnih koncentracijah. Živost smo ugotavljali s testom Hoechst/PI. Prikazano je povprečje štirih bioloških paralelk in njihova standardna deviacija (n = 4). Statistično značilnih razlik v živosti med kontrolno skupino in z nanodelci tretiranimi skupinami ni bilo (P = 0,41).



Slika 12: Celice, inkubirane z neoplaščenimi kobalt feritnimi nanodelci v različnih koncentracijah, prikazane z različnimi barvanji. Prikazani so fazni kontrast (Fc), kjer je vidna morfologija celic, s Hoechstom so obarvana jedra živih in mrtvih celic (H), s propidijevim jodidom so obarvane mrtve celice (PI) in prekrivanje fluorescenčnih slik (Composite).

#### 4.1.3 Maghemitni nanodelci oplaščeni s PAA

Zanimal nas je vpliv oplaščenja nanodelcev na živost celic. Celice smo najprej inkubirali z oplaščenimi maghemitnimi nanodelci. Plašč nanodelca je predstavljala poliakrilna kislina. Rezultati inkubacije celic raka dojke z maghemitnimi nanodelci oplaščenimi s PAA so podobni rezultatom neoplaščenih kobalt feritnih nanodelcev. Odstotek živosti celic inkubiranih z nanodelci ne odstopa od odstotka živosti celic v kontroli. Najmanjša živost celic je bila pri koncentraciji 100  $\mu$ g/mL, kjer je odstotek živosti znašal 88,5 %. Rezultati treh bioloških paralelk so prikazani na sliki 13. Na slikah faznega kontrasta so rahlo vidni črni skupki nanodelcev pri koncentraciji 200  $\mu$ g/mL (slika 14).



Slika 13: Živosti celic po 24-urni inkubaciji z maghemitnimi nanodelci oplaščenimi s PAA v različnih koncentracijah. Plašč nanodelcev je predstavljala poliakrilna kislina. Živost smo ugotavljali s testom Hoechst/PI. Prikazano je povprečje treh bioloških paralelk in njihova standardna deviacija (n = 3). Statistično značilnih razlik v živosti med kontrolno skupino in z nanodelci tretiranimi skupinami ni bilo (P = 0,39).



Slika 14: Celice, inkubirane z maghemitnimi nanodelci oplaščenimi s PAA v različnih koncentracijah, prikazane z različnimi barvanji. Prikazani so fazni kontrast (Fc), kjer je vidna morfologija celic, s Hoechstom so obarvana jedra živih in mrtvih celic (H), s propidijevim jodidom so obarvane mrtve celice (PI) in prekrivanje fluorescenčnih slik (Composite).

#### 4.1.4 Kobalt feritni nanodelci oplaščeni s PAA

Poskuse smo nadaljevali z oplaščenimi kobalt feritnimi nanodelci. Tudi pri tej vrsti nanodelcev je plašč predstavljala poliakrilna kislina. Pri izpostavitvi celic MDA-MB-231 oplaščenim kobalt feritnim nanodelcem je bil nakazan padec v živosti celic, vendar zmanjšanje ni bilo statistično značilno. Rezultati treh bioloških paralelk so prikazani na sliki 15. Nanodelci so na slikah faznega kontrasta vidni že pri koncentraciji 10 µg/mL kot črni skupki (slika 16). Pri višjih koncentracijah so vidni kot večje črne lise.



Slika 15: Živosti celic po 24-urni inkubaciji s kobalt feritnimi nanodelci oplaščenimi s **PAA v različnih koncentracijah.** Plašč nanodelcev predstavlja poliakrilna kislina. Živost smo ugotavljali s testom Hoechst/PI. Prikazano je povprečje treh bioloških paralelk in njihova standardna deviacija (n = 3). Statistično značilnih razlik v živosti med kontrolno skupino in z nanodelci tretiranimi skupinami ni bilo (P = 0,15).



Slika 16: Celice, inkubirane s kobalt feritnimi nanodelci oplaščenimi s PAA v različnih koncentracijah, prikazane z različnimi barvanji. Prikazani so fazni kontrast (Fc), kjer je vidna morfologija celic, s Hoechstom so obarvana jedra živih in mrtvih celic (H), s propidijevim jodidom so obarvane mrtve celice (PI) in prekrivanje fluorescenčnih slik (Composite).

# 4.2 Vpliv kobalt feritnih in maghemitnih nanodelcev na izražanje proteina HIF-1α

Da bi preverili, ali kobalt feritni in maghemitni nanodelci vplivajo na aktivacijo transkripcijskega dejavnika HIF-1, smo v celicah MDA-MB-231 merili izražanje njegove inducibilne od kisika odvisne podenote HIF-1α. Celice raka dojke MDA-MB-231 smo inkubirali z izbranimi magnetnimi nanodelci. Z metodo prenosa po westernu smo določili vpliv nanodelcev na izražanje proteina HIF-1α. S tem poskusom smo želeli določiti, ali lahko MND, ki so namenjeni uporabi v biomedicini, vplivajo na aktivacijo transkripcijskega dejavnika HIF-1, ki omogoča rakavim celicam zadostno preskrbo s kisikom in hranili.

#### 4.2.1 Vpliv različnih vrst MND na izražanje proteina HIF-1α

V prvi seriji poskusov smo primerjali učinek različnih nanodelcev na izražanje proteina HIFla (slika 17). Celice MDA-MB-231 smo za 24 ur izpostavili različnim nanodelcem v koncentraciji 50 µg/mL. Za kontrolo smo uporabili CoCl<sub>2</sub> (250 µM, 6 h). Najprej smo preverili, kakšna je tehnična ponovljivost meritev izražanja HIF-1a in aktina. Izražanje HIF-1a in aktina smo ugotavljali z odtisom western v triplikatu (slika 17 A in B). Ker smo opazili manjše razlike v rezultatih, ki smo jih dobili v posameznih tehničnih ponovitvah, smo v vseh nadaljnjih poskusih izražanje HIF-1a in aktina ugotavljali v duplikatu ali triplikatu, za nadaljnjo analizo pa smo uporabili povprečno vrednost meritev (slika 17 C). Za dodatno kontrolo enakomernosti nanosa beljakovinskih vzorcev na gel smo uporabili barvanje po Ponceauju (slika 17 D).

Po analizi izražanja proteina HIF-1a v celicah v bazalnih razmerah brez tretiranja z nanodelci (na grafih označeno kot BK) lahko povzamemo, da se nakazuje trend indukcije proteina HIF-1a pri inkubaciji celic s kobalt feritnimi nanodelci oplaščenimi s PAA. Minimalen trend je zaznaven tudi pri inkubaciji celic z maghemitnimi nanodelci oplaščenimi s PAA. Statistična obdelava podatkov je pokazala statistično značilno izražanje le pri inkubaciji s CoCl<sub>2</sub>. Rezultati so prikazani na sliki 17 C.



Slika 17: Relativno izražanje proteina HIF-1 $\alpha$  v celicah MDA-MB-231 pri izpostavitvi različnim nanodelcem ali CoCl<sub>2</sub>. Inkubacija celic z nanodelci je potekala 24 h, pri koncentraciji nanodelcev 50 µg/mL. Inkubacija celic s CoCl<sub>2</sub> je potekala 6 h, pri koncentraciji 250 µM. A: Primerjava med tehničnimi in biološkimi ponovitvami. B: Primerjava med dvema biološkima ponovitvama. C: Imunodetekcija proteina HIF-1 $\alpha$  in aktina. Prikazano je povprečje štirih bioloških paralelk. Vsaka biološka paralelka je povprečje več tehničnih

ponovitev. (n = 4, \*P < 0,05 v primerjavi z bazalno kontrolo (BK)) **D**: Nespecifično barvanje proteinov na PVDF membrani z barvilom Ponceau S. Na levem in desnem robu se nahaja označevalec molekulske mase beljakovin. Protein HIF-1a se nahaja v velikostnem razredu med 150 in 102 kDa; aktin se nahaja med 52 in 38 kDa (označeno s puščicami).

## 4.2.2 Časovna odvisnost izražanja proteina HIF-1α pri izpostavitvi kobalt feritnim nanodelcem oplaščenimi s PAA

Glede na rezultate prve serije poskusov inkubacije celic z različnimi vrstami nanodelcev smo se odločili, da poskuse nadaljujemo z oplaščenimi kobalt feritnimi nanodelci, saj so bili edini pri katerih je bilo izražanje proteina HIF-1a povečano. Primerjali smo časovno odvisnost izražanja proteina HIF-1a. Celice smo z nanodelci inkubirali 0,5 h, 1 h, 2 h, 6 h in 24 h. Po 24-urni inkubaciji je bilo izražanje HIF-1a povečano, vendar razlika ni dosegla statistične značilnosti. Rezultati so prikazani na sliki 18.



Slika 18: Relativno izražanje proteina HIF-1 $\alpha$  v celicah MDA-MB-231 v različnih časovnih točkah inkubacije z oplaščenimi kobalt feritnimi nanodelci ali CoCl<sub>2</sub>. Inkubacija celic z nanodelci je potekala 24 h, 6 h, 2 h, 1 h in 0,5 h pri koncentraciji nanodelcev 50 µg/mL. Inkubacija celic s CoCl<sub>2</sub> je potekala 6 h, pri koncentraciji 250 µM. A: Imunodetekcija proteina HIF-1 $\alpha$  in aktina. Prikazano je povprečje dveh bioloških paralelk. Vsaka biološka paralelka je bila narejena v duplikatu. B: Nespecifično barvanje proteinov na PVDF membrani z barvilom Ponceau S. Na levem in desnem robu se nahaja označevalec molekulske mase beljakovin. Protein HIF-1 $\alpha$  is nahaja v velikostnem razredu med 150 in 102 kDa; aktin se nahaja med 52 in 38 kDa (označeno s puščicami).

(n = 2, \*P < 0,05 v primerjavi z bazalno kontrolo (BK))

## 4.2.3 Vpliv kobalt feritnih nanodelcev oplaščenih s PAA na izražanje proteina HIF-1α: zakasnjeni učinek

Ker celice MDA-MB-231 privzamejo MND, nas je zanimalo, ali se izražanje HIF-1a spremeni po njihovi odstranitvi iz celičnega gojišča. Pripravili smo celice v bazalnih razmerah in vzorce, ki smo jih po 24 h lizirali ter vzorce katerim smo po 24 h sprali nanodelce ter jim dodali sveže gojišče. Lizirali smo jih po 72 h. Zakasnjenega učinka aktivacije po 72 h po rezultatih sodeč ni bilo. Do statistično pomembnega povečanja izražanja proteina HIF-1a je prišlo pri inkubaciji s CoCl<sub>2</sub>. Z inkubacijo celic z FeCl<sub>2</sub> smo dosegli utišanje izražanja proteina HIF-1a. Rezultati so prikazani na sliki 19.



Slika 19: Relativno izražanje proteina HIF-1 $\alpha$  v celicah MDA-MB-231 po izpostavitvi kobalt feritnim nanodelcem oplaščenimi s PAA, CoCl<sub>2</sub> ali FeCl<sub>2</sub>. Inkubacija celic z nanodelci je v obeh primerih potekala 24 h, pri koncentraciji nanodelcev 50 µg/mL. V primeru 24-urne izpostavitve smo celice po 24. urah lizirali. V primeru 72-urne izpostavitve smo celice po 24 h sprali s celičnim gojiščem in postavili nazaj v inkubator. Celice smo lizirali po 72 h od začetka inkubacije. Inkubacija celic s CoCl<sub>2</sub> in FeCl<sub>2</sub> je potekala 6 h, pri koncentraciji CoCl<sub>2</sub> 250 µM in FeCl<sub>2</sub> 300 µM. A: Imunodetekcija proteina HIF-1 $\alpha$  in aktina. Prikazano je povprečje dveh bioloških paralelk. Vsaka biološka paralelka je bila narejena v duplikatu. B: Nespecifično barvanje proteinov na PVDF membrani z barvilom Ponceau S. Na levem in desnem robu se nahaja označevalec molekulske mase beljakovin. Protein HIF-1 $\alpha$  se nahaja v velikostnem razredu med 150 in 102 kDa; aktin se nahaja med 52 in 38 kDa (označeno s puščicami).

(n = 2, \*P < 0,05 v primerjavi z bazalno kontrolo (BK)).

## 4.2.4 Vpliv kobalt feritnih nanodelcev oplaščenih s PAA in maghemitnih nanodelcev oplaščenih s PAA na izražanje proteina HIF-1α: priprava nanodelcev

Zanimal nas je vpliv postopka dialize pri pripravi nanodelcev na njihove lastnosti. S tem poskusom smo želeli preveriti vpliv prostih ionov, ki se potencialno sproščajo iz nanodelcev. Vzorci poimenovani kot »dializirani« so bili dodatno dializirani do 24 h pred pričetkom priprave vzorcev. Zaznali smo razliko v izražanju proteina HIF-1a in sicer izražanje je bilo večje pri inkubaciji z nedializiranimi kot z dializiranimi MND. Trend nakazuje večje izražanje HIF-1a pri kobalt feritnih MND kot pri maghemitnih MND. Do statistično pomembne razlike je prišlo pri inkubaciji s CoCl<sub>2</sub>. Z inkubacijo celic z FeCl<sub>2</sub> smo dosegli utišanje izražanja proteina HIF-1a. Rezultati so prikazani na sliki 20.



Slika 20: Relativno izražanje proteina HIF-1 $\alpha$  v celicah MDA-MB-231 po izpostavitvi kobalt feritnim nanodelcem oplaščenimi s PAA in maghemitnim nanodelcem oplaščenimi s PAA pripravljenih po različnih postopkih, CoCl<sub>2</sub> ali FeCl<sub>2</sub>. Inkubacija celic z nanodelci je potekala 24 h, pri koncentraciji nanodelcev 50 µg/mL. Vzorci označeni kot »dializirani« so bili dodatno dializirani do 24 ur pred pričetkom priprave vzorcev. Inkubacija celic s CoCl<sub>2</sub> in FeCl<sub>2</sub> je potekala 6 h, pri koncentraciji CoCl<sub>2</sub> 250 µM in FeCl<sub>2</sub> 300 µM. A: Imunodetekcija proteina HIF-1 $\alpha$  in aktina. Prikazano je povprečje dveh bioloških paralelk. Vsaka biološka paralelka je bila narejena v duplikatu. B: Nespecifično barvanje proteinov na PVDF membrani z barvilom Ponceau S. Na levem in desnem robu se nahaja označevalec molekulske mase beljakovin. Protein HIF-1 $\alpha$  se nahaja v velikostnem razredu med 150 in 102 kDa; aktin se nahaja med 52 in 38 kDa (označeno s puščicami). (n = 2, \*P < 0,05 v primerjavi z bazalno kontrolo (BK))

## 4.2.5 Vpliv kobalt feritnih nanodelcev oplaščenih s PAA na izražanje proteina HIF-1α: združeni rezultati

V večini poskusov se je raven HIF-1a pri 24-urni inkubaciji s kobalt feritnimi nanodelci oplaščenimi s PAA povečala. Da bi preverili, ali je povečanje statistično značilno, smo združili rezultate vseh neodvisnih poskusov 24-urne inkubacije celic MDA-MB-231 z oplaščenimi kobalt feritnimi nanodelci. V graf so vključene tri vrste vzorcev: celice v bazalnem stanju (BK), celice inkubirane s kobalt feritnimi nanodelci oplaščenimi s PAA in celice inkubirane s CoCl<sub>2</sub>. Priprava vseh treh vrst vzorcev je bila pri vseh poskusih enaka. Rezultati predstavljajo skupaj 10 bioloških ponovitev (slika 21). Ugotovili smo, da je izražanje proteina HIF-1a povzročeno z inkubacijo celic z oplaščenimi kobalt feritnimi nanodelci statistično pomembno.



Slika 21: Relativno izražanje proteina HIF-1 $\alpha$  v celicah MDA-MB-231 po izpostavitvi kobalt feritnim nanodelcem oplaščenih s PAA ali CoCl<sub>2</sub>. Inkubacija celic z nanodelci je potekala 24 h, pri koncentraciji 50 µg/mL. Inkubacija celic s CoCl<sub>2</sub> je potekala 6 h, pri koncentraciji 250 µM. Prikazano je povprečje desetih bioloških paralelk detekcije proteina HIF-1 $\alpha$  in aktina (n = 10, \*P < 0,05 v primerjavi z bazalno kontrolo (BK)).

#### 5. Razprava

V magistrski nalogi smo ovrednotili toksičnost magnetnih nanodelcev na celično linijo raka dojke ter njihov vpliv na izražanje proteina HIF-1a. Poskusi so potekali na celični liniji raka dojke MDA-MB-231, ki smo jih izbrali kot reprezentativne rakave celice. Njihova lastnost je velika agresivnost in s tem povezano večje izražanje proteina HIF-1a (3). Količina aktiviranega HIF-1 je namreč odvisna od celične linije. Kot poskusne magnetne nanodelce smo izbrali kobalt feritne in maghemitne nanodelce. Uporabili smo neoplaščene nanodelce in nanodelce oplaščene s poliakrilno kislino (PAA). Oplaščenje s PAA omogoča stabilizacijo delcev, dodatno funkcionalizacijo in predstavlja dobro kompatibilnost s fiziološkim okoljem (48).

#### Vpliv na živost celične linije

Toksičnost magnetnih nanodelcev smo ovrednotili z njihovim vplivom na živost rakavih celic. Za vsako vrsto nanodelcev smo naredili poskus inkubacije celic z nanodelci koncentracij 2  $\mu$ g/mL, 10  $\mu$ g/mL, 50  $\mu$ g/mL, 100  $\mu$ g/mL in 200  $\mu$ g/mL.

Prva postavljena hipoteza je bila, da imajo neoplaščeni nanodelci večji vpliv na živost celic kot oplaščeni nanodelci. Predvidevali smo, da bodo, zaradi manjše velikosti, neoplaščeni nanodelci veliko bolje prehajali v celico in celične organele ter s tem vplivali na živost, kot oplaščeni delci. Prav tako plašč nanodelcu omogoča boljšo biokompatibilnost (39). V drugi hipotezi smo predpostavljali, da imajo kobalt feritni nanodelci večji vpliv na živost celične linije kot maghemitni nanodelci. Hipotezo smo postavili na podlagi dejstva, da imajo kobaltovi ioni, ki potencialno izstopajo iz jedra kobalt feritnih nanodelcev, toksični učinek na celico (44). Iz maghemitnih nanodelcev se potencialno sprošča Fe<sup>3+</sup> ion. Iz kobalt feritnih nanodelcev (magnetitni nanodelci) pa se sprošča Fe<sup>2+</sup> ion. Fe<sup>2+</sup> ion je bolj toksičen, saj lahko neposredno vstopa v reakcije, kjer se tvorijo ROS. (43).

Izkazalo se je, da imajo le neoplaščeni maghemitni nanodelci pri koncentraciji 50 μg/mL večji vpliv na živost celic. Povprečje živosti pri tej koncentraciji je 70,5 %. Nobena druga vrsta uporabljenih nanodelcev ni imela statistično pomembnega vpliva na živost celične linije MDA-MB-231. Vsi deleži živosti so primerljivi s kontrolo. Pri inkubaciji celic z oplaščenimi kobalt feritnimi nanodelci bi morali povečati število poskusov za natančnejšo oceno živosti, saj trend nakazuje rahel padec živosti kljub statistično nepomembnemu rezultatu. Večji odkloni živosti povzročeni z dodatkom nanodelcev niso zaznavni. Menimo, da so neoplaščeni maghemitni nanodelci pri koncentraciji 50 μg/mL primerno stabilni in primerno veliki, da v

zadostni meri vstopajo v celico, kjer negativno vplivajo na celično živost. Hidrodinamski premer pripravljenih neoplaščenih maghemitnih delcev je bil 30 nm. Večji skupki neoplaščenih maghemitnih delcev so na slikah faznega kontrasta vidni pri koncentracijah 100  $\mu$ g/mL in 200  $\mu$ g/mL. Pri drugih uporabljenih nanodelcih so opazni že od 10  $\mu$ g/mL naprej.

Kljub statistično nepomembnemu vplivu nanodelcev na živost celic smo ocenili vpliv oplaščenja nanodelcev na toksičnost izbranih nanodelcev. Opazili smo razliko v vplivu plašča PAA pri maghemitnih in kobalt feritnih nanodelcih. V primeru maghemitnih nanodelcev, je plašč toksičnost zmanjšal. Oplaščeni maghemitni nanodelci so bili manj toksični kot neoplaščeni maghemitni nanodelci. Predvidevamo, da je temu tako, zaradi znatnega povečanja hidrodinamskega premera delcev. Maghemitni delci oplaščeni s PAA so bili veliki 200 nm. Predpostavljamo, da imajo večji nanodelci manjši vpliv na živost celic, saj slabše prehajajo v celične organele. Manjši delci lažje povzročijo fizične poškodbe lizosomov, mitohondrijev in celičnih membran (38). V primeru kobalt feritnih nanodelcev je plašč PAA toksičnost delcev povečal. Predvidevamo, da so neoplaščeni kobalt feritni nanodelci slabo stabilni, kar se izraža kot precipitacija. Celice večje skupke delcev težje endocitirajo. Sklepamo, da je plašč PAA kobalt feritne nanodelce stabiliziral in s tem omogočil privzem v celico in vpliv delcev na živost celic. Prav tako ne izključujemo dejstva, da so bili lahko v plašču nanodelca ujeti ioni sproščeni iz jedra delca.

Zaključimo lahko, da imajo maghemitni MND, neoplaščeni ali oplaščeni, večji vpliv na živost celic kot kobalt feritni MND. S tem drugo hipotezo ovržemo. Ovrednotili smo vpliv plašča PAA. Plašč je nanodelce stabiliziral. Kljub zaščitnemu učinku, je vpliv plašča PAA na toksičnost nanodelcev odvisen od vrste nanodelcev. Prvo hipotezo smo tako le delno potrdili.

Dosedanje študije živosti celic različnih celičnih linij (jetra, črevesje, pljuča, nevroni) ob dodatku neoplaščenih kobalt feritnih MND so pokazale majhno zmanjšanje živosti celic pri koncentracijah MND do 100 µg/mL. Pri koncentracijah višjih od 100 µg/mL je bilo opazno povišanje živosti celic. To so razložili z obarjanjem MND pri velikih koncentracijah, kar preprečuje njihov privzem v celice (19). Raziskave na celični liniji T3 so dokazale živost večjo od 95 % pri koncentracijah do 117,3 µg/mL kobalt feritnih MND in zmanjšanje živosti na 80 % pri koncentraciji 234,6 µg/mL (45). Raziskave živosti na celični liniji glioblastoma pri koncentracijah 58 µg/mL in 235 µg/mL so pokazale pojav belega roba okoli jedra celic, kar nakazuje na celični stres (46).

Na podlagi primerjave dosedanjih študij z našimi rezultati, smo se odločili, da nadaljnje poskuse izražanja proteina HIF-1a nadaljujemo s koncentracijo 50 µg/mL.

#### Izražanje proteina HIF-1a

Značilnost nekaterih kovinskih ionov je vpliv na aktivacijo transkripcijskega dejavnika HIF-1. HIF-1 je eden izmed ključnih dejavnikov, ki rakavim celicam omogoča angiogenezo, metastaziranje in preklop metabolizma iz oksidativne fosforilacije na anaerobno glikolizo. Zanimalo nas je, ali se lahko iz magnetnih nanodelcev sproščajo kovinski ioni, ki imajo vpliv na indukcijo proteina HIF-1a. Postavili smo hipotezo, ki predpostavlja, da magnetni nanodelci, ki se uporabljajo kot diagnostično sredstvo ali kot nosilec protirakavih učinkovin, vplivajo na izražanje proteina HIF-1a.

Izražanje proteina HIF-1a smo preverili z inkubacijo celic raka dojke z oplaščenimi in neoplaščenimi kobalt feritnimi in maghemitnimi MND. Kot kontrolo smo uporabili netretirane celice v bazalnih razmerah. Dodatni kontroli smo imeli dve- kobaltov diklorid in železov diklorid. Kobaltov diklorid dokazano aktivira izražanje proteina HIF-1a. Je znana kemijska snov, ki povzroči biokemijski in molekulski odziv podoben odzivu, ki se zgodi pri hipoksiji. Kobaltovi ioni (Co<sup>2+</sup>) inhibirajo encim PHD, ki je pomemben v kaskadi reakcij potrebni za razgradnjo proteina HIF-1a v proteasomu. Železov diklorid dokazano utiša izražanje proteina HIF-1a (22). Preverili smo tudi izražanje aktina, ki je služil kot endogena kontrola. Enakomernost lis aktina pri prenosu western je služila kot zagotovilo enakomernosti nanosa vzorcev na elektroforezni gel.

Izkazalo se je, da le oplaščeni kobalt feritni nanodelci statistično pomembno inducirajo izražanje proteina HIF-1a. Kot smo pričakovali, je do izražanja proteina prišlo pri inkubaciji z nanodelci, ki vsebujejo kobalt. Maghemitni MND vpliva na izražanje proteina niso imeli. Različen vpliv na izražanje proteina je imel plašč nanodelca. Do izražanja proteina ni prišlo pri neoplaščenih MND. Kot že omenjeno pri oceni živosti celic predvidevamo, da nanodelci niso bili dovolj stabilni oziroma niso v zadostni meri prehajali v celice.

Na podlagi rezultatov primerjave vpliva različnih MND na izražanje proteina HIF-1a smo se odločili za dodatne poskuse z oplaščenimi kobalt feritnimi MND. Zanimala nas je časovna odvisnost aktivacije. Celice smo z nanodelci inkubirali različno dolgo (0,5 h, 1 h, 2 h, 6 h in 24 h). V hipoksičnem okolju naj bi aktivacija proteina HIF-1a trajala od dveh do štiriindvajset ur (49). Trend nakazuje viden odziv le pri časovni točki 24 h. Predvidevamo, da je odziv celic na prisotnost kobalt feritnih in maghemitnih nanodelcev kasnejši kot odziv na celično

hipoksijo. S poskusom 72-urne izpostavitve celic nanodelcem smo preverili vpliv zakasnjenega učinka. Rezultati niso pokazali zakasnelega izražanja proteina HIF-1a iz česar sklepamo, da se celice vrnejo v prvotno stanje.

Vpliv na izražanje/ utišanje proteina HIF-1a imajo kobaltovi in železovi ioni. Zato nas je zanimal vpliv prostih ionov, ki se lahko sproščajo iz nanodelcev. Uporabili smo oplaščene kobalt feritne in oplaščene maghemitne nanodelce, ki so bili dializirani tik pred inkubacijo celic z MND (do 24 h pred poskusom). Ugotovili smo, da izražanje proteina HIF-1a ni odvisno od priprave nanodelcev oziroma njihove dialize in s tem izključili vpliv prostih ionov. Predvidevamo, da se v obeh primerih priprave nanodelcev; z dializo nanodelcev tik pred poskusom ter pri nanodelcih, katerih dializa je bila narejena vsaj en mesec prej; določen delež ionov sprosti iz nanodelcev ali pa se že med samo pripravo ujamejo v plašč MND od koder se postopoma sproščajo.

Dosedanje študije aktivacije transkripcijskega dejavnika HIF-1 preučujejo vpliv kobaltovih ionov. V študiji L. Feng *et al.* so preučevali vpliv kobaltovih nanodelcev na aktivacijo HIF-1a v mišjih embrionalnih fibroblastih. Ugotovili so veliko nalaganje proteina HIF-1a v celicah že po 6 urni izpostavljenosti koncentracijam 1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL in 10 µg/mL kobaltovih nanodelcev. Dokazali so tudi časovno odvisnost aktivacije. Izražanje proteina je bilo največje pri dvanajstih urah inkubacije celic z nanodelci (47). V primerjavi z našimi rezultati, je bila aktivacija proteina HIF-1a časovno odvisna in prisotna že pri krajšem času izpostavitve nanodelcem. Predvidevamo, da je do razlik prišlo zaradi uporabe različnih celičnih linij in različno pripravljenih nanodelcev.

Povzamemo lahko, da različne vrste nanodelcev različno vplivajo na izražanje proteina HIF-1a v različnih vrstah celic. Na celice MDA-MB-231 imajo izmed štirih vrst preizkušanih nanodelcev statistično pomemben vpliv le oplaščeni kobalt feritni nanodelci (slika 21). To smo dokazali z desetimi biološkimi ponovitvami inkubacije celic z omenjenimi MND. Statistični rezultat odseva prikaz intenzivnosti lis poskusa prenosa western. S tem smo tretjo hipotezo delno potrdili. Do minimalne indukcije izražanja je prišlo tudi pri oplaščenih maghemitnih nanodelcih. Za natančnejšo opredelitev vpliva oplaščenih maghemitnih nanodelcev bi morali povečati število poskusov. Preverili smo izražanje proteina HIF-1a pri inkubaciji z oplaščenimi kobalt feritnimi MND v različnih časovnih točkah. Izražanja pri aktivacije po 72 h. Učinek prostih ionov smo izključili s poskusom, kjer smo MND dializirali do 24 h pred inkubacijo s celicami.

#### Vrednotenje rezultatov prenosa western

Ob vsakem poskusu prenosa western smo naredili barvanje membrane z barvilom Ponceau S. S tem smo preveril variabilnost nanosa vzorcev. Razlike v obarvanju membrane so nam pomagale razložiti razlike v intenzivnosti lis, kjer se je nahajal iskani protein. V rezultatih so prikazane reprezentativne membrane obarvane z barvilom Ponceau S. Večjih variabilnosti med nanešenimi vzorci ni bilo.

Preverili smo tudi ponovljivost med različnimi biološkimi paralelkami in tehničnimi ponovitvami poskusa prenosa western (slika 17A). Med dvema biološkima paralelkama prvega poskusa inkubacije celic z različnimi vrstami nanodelcev je prišlo do razlik v intenziteti izražanja proteina HIF-1a pri vzorcih celic inkubiranih s kobalt feritnimi nanodelci oplaščenimi s PAA in s kobaltovim kloridom. Kobaltov klorid je signifikantno vplival na izražanje proteina. Prav tako trend rezultatov nakazuje izražanje pri inkubaciji z oplaščenimi kobalt feritnimi nanodelci. Prišlo je torej le do razlik v intenziteti lis in ne tudi do razlik vpliva na izražanje. Predpostavljamo, da so imeli vpliv na intenziteto izražanja proteina HIF-1a različni dejavniki, kot so vpliv nanodelcev na živost celic, privzem delcev v celice in drugi zunanji dejavniki. Koncentraciji proteinov v vzorcih sta bili namreč zelo primerljivi (230 µg/mL in 221 µg/mL).

Primerjava tehničnih ponovitev prve biološke paralelke kaže očitno ponovljivost. Če intenziteto lis proteina HIF-1a uravnamo z intenziteto endogene kontrole, je ponovljivost poskusa zelo dobra. Pri drugi biološki ponovitvi le druga tehnična ponovitev rahlo odstopa od ostalih rezultatov.

Iz primerjave membran obarvanih z barvilom Ponceau S lahko povzamemo, da je bil nanos vzorcev po ustaljenem postopku enakomeren. Prav tako je bila enakomerna razporeditev količine proteinov med različnimi vzorci. S primerjavo bioloških in tehničnih paralelk smo dokazali majhno variabilnost in ponovljivost prenosa western.

## 6. Sklep

V magistrski nalogi smo ovrednotili toksični potencial nanodelcev železovega oksida na živost celic raka dojke ter njihov vpliv na izražanje transkripcijskega dejavnika HIF-1 preko stabilizacije njegove podenote HIF-1a. Primerjali smo vpliv štirih vrst nanodelcev: kobalt feritnih nanodelcev, kobalt feritnih nanodelcev oplaščenih s PAA, maghemitnih nanodelcev in maghemitnih nanodelcev oplaščenih s PAA.

Prva hipoteza je bila, da bodo imeli neoplaščeni nanodelci večji vpliv na živost celic kot oplaščeni nanodelci. Hipotezo smo delno potrdili. Toksičnost je bila namreč odvisna tudi od vrste nanodelcev. V primeru kobalt feritnih nanodelcev je plašč PAA povečal njihovo toksičnost. V primeru maghemitnih nanodelcev je plašč PAA zmanjšal njihovo toksičnost.

Glede na znane literaturne podatke o toksičnosti nanodelcev železovega oksida smo predvidevali, da bodo imeli kobalt feritni MND večjo toksičnost kot maghemitni nanodelci. To hipotezo smo ovrgli, saj so imeli maghemitni MND večji vpliv na zmanjšanje živosti celic kot kobalt feritni MND.

Tretja hipoteza je bila, da imajo nanodelci železovega oksida, ki se lahko uporabljajo kot diagnostično sredstvo ali kot nosilec protirakavih učinkovin, vpliv na izražanje proteina HIF-1a. Hipotezo smo delno potrdili, saj so imeli izmed štirih različnih vrst MND le oplaščeni kobalt feritni nanodelci vpliv na izražanje proteina HIF-1a. To smo dokazali z desetimi biološkimi ponovitvami.

MND so zaradi svojih ugodnih lastnosti primerni za uporabo v diagnostiki rakavih obolenj ter uporabni kot nosilec za zdravilne učinkovine. Njihova biomedicinska uporaba je vedno širša. Glede na rezultate magistrske naloge in literaturne podatke lahko zaključimo, da imajo maghemitni in kobalt feritni magnetni nanodelci majhen, skorajda zanemarljiv vpliv na živost celic. Iz vidika vpliva na živost celic, so varni za uporabo.

Kobalt feritni nanodelci oplaščeni s PAA predstavljajo potencialni aktivator dejavnikov, ki rakavim celicam pomagajo pri angiogenezi in metastaziranju. Iz vidika uporabe za diagnosticiranje oziroma zdravljenja raka dojke, torej niso varni. Menimo, da bi morali pred uporabo kobalt feritnih nanodelcev oplaščenih s PAA v biomedicinske namene, oceniti razmerje med njihovo koristjo ter škodo.

#### 7. **Reference**

1. Mc Pherson K., Steel CM, Dixon JM: Breast cancer- epidemiology, risk factors and genetics. ABC of breast diseas; 2000; 321:624-628

2. https://www.onko-i.si/za\_javnost\_in\_bolnike/vrste\_raka/rak\_dojk/; Dostop 21.02.2018

3. Eleri Lloyd Davies: Breast cancer. Medicine; 2015; 44:1

4. Eccles SA, Welch DR: Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. Lancet; 2007; 369: 1742-1757

5. Luana Schito, Gregg L. Semenza: Hypoxia and breast cancer metastasis. Hypoxia and cancer; 2013; 3 – 19

6. Vaupel P: Prognostic potential of the pre-therapeutic tumor oxygenation status. Adv Exp Med Biol; 2009; 645: 241-246

7. Gregg L. Semenza: Life with oxygen. Science; 2007; 318: 62 - 64

8. K. S. Kimbro, J. W. Simons: Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer; Endocrine related cancer; 2006; 13: 739-749

9. Gregg L. Semenza: HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. The Journal of Clinical Investigation; 2014; 123: 3664-3671

10. Vaupel P.: The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. Oncologist; 2004; 9: 10–17

11. Chowdhury R., McDonough M.A., Mecinovic J.: Structural basis for binding of hypoxiainducible factor to the oxygen –sensing prolyl hydroxylase. Structure; 2009; 17: 981-989

12. Kaelin W. G., Ratchliffe P.J.: Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. Mol Cell; 2008; 30: 393-402

13. Cheng Y.L., Park J.S., Manzanero S.: Evidence that collaboration between HIF-1a and Notch-q promotes neutral cell death in ishemic stroke. Neurobiol Dis; 2014; 62: 286-295

14. Wetzel G., Relja B., Klarner A., Henrich D.: Myeloid knocout of HIF-1a does not markedly affect hemorrhage/resuscitation-induced inflammation in hepatic injury. Mediators Inflamm; 2014

15. Eum S. Y., Lee Y. W.: VEGF regulates PCB 104-mediated stimulation of permeability and transmigration of breast cancer cells in human microvascular endothelial cells. Exp Cells Res; 2004; 296: 231-244

16. Gregg L. Semenza: Molecular mechanisms mediating metastasis of hypoxic breast cancer cells. Trends Mol. Med.; 2012; 18(9): 534 - 543

17. Amar J., Majmundar, Waihay J. Wong, M. Celeste Simon: Hypoxia inducible factors and the response to hypoxia. Mol. Cell; 2010; 40: 294-309

18. Marc-Andre C. Dery, Maude D. Michaud, Darren E. Richard: Hypoxia inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. The Int. Journal of biochemistry & cell biology; 2005; 37: 535-540

19. Mahmoud Abudayyak, Tuba Altincekic Gurkaynak, Gul Ozhan: In vitro toxicological assessment of cobalt ferrite nanoparticles in several mammalian cell types. Biological trace element research; 2016

20. Ming Yang, Hiuzhong Su et. al.: Prolyl hydroxylase domain enzymes: important regulators of cancer metabolism. Hypoxia; 2014; 2: 127 - 142

21. Wang G. L., Semeneza G. L.: Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. Blood; 1993; 82: 3610-3615

22. Yong Yuan, George Hilliard, Tsuneo Ferguson, David E. Millhorn: Cobalt inhibits the interaction between Hypoxia-inducible factor-a and von Hippel-Lindau protein by direct binding to Hypoxia-inducible factor-a. The journal of biological chemistry; 2003; 278 (18): 15911 – 15916

23. Jiyoung Kim, Daeho So, Hyun-Woo Shin, Yang-Sook Chun, Jong-Wan Park: HIF-1a upregulation due to depletion of the free ubiquitin pool. J Korean Med Sci; 2015; 30: 1388 - 1395

24. Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vander Elst A., Muller R.N.: Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. Chem. Rev.; 2008; 108: 2064-2110

25. Ibrahim Khan, Khalid Saeed, Idrees Khan: Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian journal of chemistry; 2017

26. Chrysa Taze, Ioannis Panetas, Stavros Kalogiannis: Toxicity assessment and comparison between two types of iron oxide nanopraticles in Mytilus galloprovincialis. Aquatic toxicology; 2016; 172:9-20

27. Wang Y., Xia Y.: Bottom-up and top-down approaches to the synthesis of monodispersal spherical colloids of low melting point metals. Nano Lett.; 2004; 4: 2047-2050

28. S. Bucak, B. Yavuzturk, A.D. Sezer: Magnetic nanoparticles: synthesis, surface modifications and application in drug delivery. InTech; 2012; 7: 165

29. Akira Ito, Masashige Shinkai, Hiroyuki Honda, Takeshi Kobayashi: Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. Journal of bioscience and bioengeneering; 2005; 100: 1-11

30. Y. Bao, J. A. Sherwood, Z. Sun: Magnetic iron oxide nanoparticles as  $T_1$  contrast agents for magnetic resonance imaging. Journal of materials chemistry C; 2018; 6: 1280 - 1290

31. Suzuki M., Honda H., kobayashi T, Wakabayashi T., Yoshida J, Takahashi M.: Development of a target-directed magnetic resonance contrast agent using monoclonal antibody-conjugated magnetic particles. Brain Tumor Pathol.; 1996; 13: 174-178

32. Jordan A., Wust P., Fahling H., John W.: Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia. Int. J. Hyperthermia; 1993; 9: 51-68

33. Gordon R. T., Hines J. R., Gordon D.: Intracellular hyperthemia. A biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations. Med. Hypothesis; 1979; 5: 83-102

34. O. Veiseh, J.W. Gunn, M. Zhang: Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging. Advanced drug delivery; 2010; 62: 284-304

35. Xianbo Mou, Zeeshan Ali, Song Li, Nongyue He: Applications of magnetic nanoparticles in targeted drug delivery systems. Journal of nanoscience and nanotechnology;2015; 15:54-62

36. Baisong Chang, Xianyi Sha, Jia Guo, Yunfeng Jiao, Changchun Wanga, Wuli Yang: Thermo and pH dual responsive, polymer shell coated, magnetic mesoporous silica nanoparticles for controlled drug release. Journal of material chemistry; 2011; 25

37. Ângela Andrade, Roberta Ferreira, José Fabris3,Rosana Domingues: Coating Nanomagnetic Particles for Biomedical Applications. InTech; 2011

38. Andreas Elsaesser, C. Vyvyan Howard: Toxicology of nanoparticles. Advanced drug delivery reviews; 2012; 64: 129-137

39. M. Mahmoudi, A. Simchi, M. Imani: A new approach for the invitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. Colloids Surf B Biointerfaces; 2010; 75

40. C. Schweiger, C: Pietzonka, J. Heverhagen: Novel magnetic iron oxide nanoparticles coated with poly(ethylene imine)-g-poly(ethylene glycol) for potential biomedical application: synthesis, stability, cytotoxicity and MR imaging. Int J Pharm; 2011; 408

41. A. Chen, X. Lin, S. Wang, L. Li, Y. Liu, Y. Ye, G. Wang: Biological evaluation of Fe3O4–poly(l-lactide)–poly(ethylene glycol)–poly(l-lactide) magnetic microspheres prepared in supercritical CO2. Toxicology letters; 2012; 212: 75-82

42. H. L. Karlsson, P. Cronholm, J. Gustafsson: Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. Chem. Res. Toicol.; 2008; 9

43. P.R. Gil, D. Huehn, L. L. D. Mercato, D. Sasse, W. J. Parak: Nanopharmacy: Inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds.

44. Ruth Magaye, Jinshun Zhao, Linda Bowman, Min Ding: Genotoxicity and carcinogenicity of cobalt-, nickel- and copper-based nanoparticles. Experimental and therapeutic medicine; 2012; 4: 551-561

45. Marmoarto P., Ceccone G., Gianoncelli A.: Cellular distribution and degradation of cobalt ferrite nanoparticles in Balb/3 T3 mouse fibroblasts. Toxicol. Lett.; 2011; 207: 128-136

46. Gianoncelli A., Marmorato P.: Interaction of magnetic nanoparticles with 87MG cells studied by synchrotron radiation X-ray fluorescence techniques. X-Ray Spectrom; 2013; 42: 316-320

47. L. Feng, Y. Zhang, M. Jiang: Up-regulation of GADD45a after exposure to metal nanoparticles: the role of hypoxia inducible factor 1a. Environmental toxicology; 2013; 490 - 499

48. V. Bregar, J. Lojk, V. Šuštar, P. Veranič, M. Pavlin: Visualization of internalization of functionalized cobal ferrite nanoparticles and their intracellular fate. Int. Journal of nanomedicine; 2013; 8: 919-931

49. Wang G.L., Jiang B.H., Rue E.A., Semenza G.L.:Hypoxia-inducible factor 1 is a basic helix-loop-helix PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. Proc Natl Acad Sci USA; 1995; 92: 5510-5514