

TOXICITA MAGNETICKÝCH NANOČÁSTIC

LUCIE KUČÍRKOVÁ^a, KAREL KRÁLOVEC^a,
RADIM HAVELEK^a, LENKA BRŮČKOVÁ^a
a MILOŠ SEDLÁK^b

^a Katedra biologických a biochemických věd, ^b Ústav organické chemie a technologie, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Studentská 573, 532 10 Pardubice
kucirkova.lucie@gmail.com, karel.kralovec@upce.cz,
radim.havelek@upce.cz, lenka.bruckova@upce.cz,
milos.sedlak@upce.cz

Došlo 21.4.15, přijato 26.6.15.

Rukopis byl zařazen k tisku v rámci placené služby urychleného publikování.

Klíčová slova: magnetické nanočástice, nanotoxicita, viabilita, oxidační stres

Obsah

1. Úvod
2. Vlastnosti magnetických nanočástic pro biomedicínské aplikace
3. *In vitro* toxicita magnetických nanočástic
4. *In vivo* toxicita magnetických nanočástic
5. Závěr

1. Úvod

Nanotechnologie je multidisciplinární obor, který se zabývá syntézou, charakterizací a aplikací materiálů, jejichž rozměry se pohybují v rozmezí 1–100 nm. Do popředí lidského zájmu se nanotechnologie dostaly v průběhu posledních dvaceti let a nacházejí uplatnění v mnoha odvětvích lidské činnosti, počínaje využitím ve strojírenství, přes elektroniku, až po aplikace v oblasti biologie a medicíny¹. Celkový výčet možného využití nanotechnologií je velice široký. Rozvoj nanotechnologií na poli biomedicíny však bezpochyby patří k těm nejvýznamnějším².

Jako velice slibné se pro využití v biomedicině jeví magnetické nanočástice (MNPs). Velkou výhodou MNPs je jejich velikost, která je menší nebo srovnatelná s buňkami (10–100 μm), viry (20–450 nm), proteiny (5–50 nm) nebo geny (šířka 2 nm, délka 10–100 nm). Takto malá velikost umožňuje dobrou tkáňovou difuzi a zajišťuje distribuci nanočástic co nejbližší k místu biologického zájmu. Magnetické vlastnosti nanočástic poskytují, vzhle-

dem k jejich snadné manipulovatelnosti po aplikaci vnějšího magnetického pole, nové možnosti jejich využití. MNPs tak nacházejí řadu uplatnění v mnoha odvětvích medicíny, jako např. v nanochirurgii, kde se využívají jako „ohřivače“ ke zničení maligních buněk vlivem lokálně zvýšené teploty^{3,4}, jako nanovektory k cílenému transportu léků^{5,6}, nebo jako kontrastní látky při magnetické rezonanci (MRI)^{7,8}. Důležité jsou také povrchové vlastnosti MNPs, které umožňují snadné obalení biokompatibilní látkou, která chrání jádro před degradací a zároveň zvyšuje biokompatibilitu MNPs⁹.

Se vzrůstajícím využitím magnetických nanočástic v biomedicině se čím dál častěji objevují otázky, zda je jejich použití bezpečné pro člověka a jaké koncentrace a velikosti lze ještě považovat za přípustné. V současné době je proto intenzivní pozornost věnována studiu jejich toxicity a možným zdravotním rizikům spojených s jejich používáním.

2. Vlastnosti magnetických nanočástic pro biomedicínské aplikace

MNPs mají značný potenciál využití v biomedicínských aplikacích, a to jak *in vivo*, tak *in vitro*. MNPs jsou v dnešní době používány zejména pro cílenou distribuci léčiv v organismu (DDS – delivery drug system)^{5,6}, pro zesílení kontrastu u principiálně různých zobrazovacích technik MRI, v pozitronové emisní tomografii (PET), počítačové tomografii (CT), aj.^{7,8,10,11} nebo lze využít přeměny magnetické energie na energii tepelnou při hypertermické léčbě nádorových onemocnění^{3,4}. Další využití MNPs představuje separace a analýza buněk¹², magnetické značení buněk¹³, nebo magnetofekce, což je transfekční technologie, která umožňuje vnesení nukleové kyseliny navázané na magnetický nosič do buněk¹⁴. Zároveň magnetické nanočástice používané v biomedicínských aplikacích musí splňovat následující požadavky: netoxické složení, biokompatibilita, monodisperzita, rychlá magnetická odezva v magnetickém poli, žádný zbytkový magnetismus a dobrá stabilita¹⁵.

MNPs obsahují některý z magnetických prvků jako je železo, kobalt, nikl nebo jejich chemické sloučeniny, např. feromagnetické spinely MgFe₂O₄, MnFe₂O₄ a CoFe₂O₄, nebo slitiny CoPt₃ a FePt (cit.¹⁶). Nejčastěji používané jsou však oxidy železa, a to zejména magnetit Fe₃O₄, maghemit γ-Fe₂O₃ a hematit α-Fe₂O₃. Společným názvem se tyto nanočástice označují jako superparamagnetické¹⁷ nanočástice oxidů železa (SPIONs). Vzhledem k jejich dominantnímu postavení v biomedicínských aplikacích budou v dalším textu diskutovány tyto magnetické nanočástice, pokud nebude uvedeno jinak. Jejich velkou výhodou je snadná příprava, nízké náklady na zhotovení, vyso-

ká chemická stabilita a unikátní elektrické, optické, tepelné a magnetické vlastnosti^{9,18}. Během samotného procesu přípravy nanočástic je zapotřebí věnovat pozornost hlavně následujícím fyzikálně-chemickým vlastnostem SPIONs: velikost nanočástic, tvar nanočástic a také povrchové vlastnosti^{18,19}. Nejdůležitějším bodem přípravy SPIONs je stanovení experimentálních podmínek tak, aby vznikala monodisperzní magnetická zrna. Druhým kritickým bodem přípravy je vytvořit takový postup, který bude reprodukovatelný a bez složitého čištění²⁰. Syntéza může probíhat ve vodných roztocích, v nepolárních organických rozpouštědlech nebo bez rozpouštědel „suchou cestou“. Pro přípravu magnetických nanočástic bylo popsáno mnoho metod od mikroemulze²¹, sol-gel syntézy, sonochemické reakce, hydrotermální reakce²⁰, hydrolýzy či termolýzy prekurzorů¹⁶, nebo elektrosprejové syntézy²². Nejběžnějším postupem pro výrobu SPIONs je však koprecipitace solí železa²³.

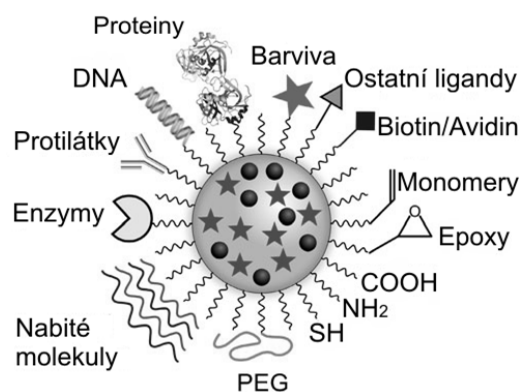
Pro zajištění stability SPIONs během *in vivo* použití musí být tyto částice funkcionalizovány. Funkcionalizace je nutná k prevenci agregace, biokompatibilitě a netoxicity nanočástic používaných v biomedicině. Dalšími důvody pro povrchovou funkcionalizaci SPIONs je zabránění jejich reakce s krevní plazmou, ochrana magnetického jádra před chemickou transformací, potlačení agregace, oxidace a také možnost navázání ligandu na obal SPIONs^{9,24}. Nejběžnějším postupem je obalení magnetického jádra funkcionalizující slupkou. Ideální obalový materiál by měl mít vysokou afinitu k železitému jádru a neměl by být imunogenní ani antigenní²⁵. V praxi jsou k těmto účelům využívány nejrůznější materiály, jako např. polymery, dendrimery, organické kyseliny, přírodní polysacharidy a různé anorganické matrice^{9,24}. Obalování se provádí během nebo po skončení syntézy. Specifickým typem funkcionalizace je uzavření SPIONs do obalu tvořeného nejčastěji lipidovou dvouvrstvou. Potom hovoříme o tzv. liposomech²⁶. V případě jednovrstvého útvaru pak o micelách. Dalším možným postupem pro ochranu magnetického jádra je vyvolání řízené oxidace kovového jádra^{9,16}. Přehled nejčastěji používaných obalových látek SPIONs pro biomedicínské aplikace uvádí tab. I.

Obal nanočástic neslouží pouze pro ochranu magnetického jádra, ale může být také dále použit pro sekundární

navázání funkčních bioaktivních molekul, jako např. nukleových kyselin, proteinů, peptidů, fosfolipidů, enzymů, polysacharidů, fluorochromů atd.^{24,28–31} (obr. 1). Pro navázání dalších funkčních skupin je často využíván obal z oxidu křemičitého^{9,31}. Mírnou nevýhodou oxidu křemičitého je nespecifická sorpce. Té můžeme zčásti zabránit potažením vrstvou polyethylenglykolu (PEG). Pro navázání PEG lze použít adsorpci, afinitní vazbu, nebo kovalentní vazbu. Látky navázané na obal mohou být cíleně dopraveny do místa zájmu. Vzhledem k velkému povrchu částic může být připojeno mnoho různých ligandů, čehož se využívá pro zvýšení afinity k těmto ligandům⁹.

3. *In vitro* toxicita magnetických nanočástic

Možnost toxicity SPIONs dala vzniknout novým studiím, které se zabývají mechanismy interakcí SPIONs s buňkami a snaží se prokázat bezpečné použití nanočástic v biomedicínských aplikacích. K hodnocení *in vitro* cytotoxicity jsou používány různé typy nádorových buněčných linií reprezentující gliové³³, jaterní³⁴, epitelální^{33,35,36}, nervové³⁷ či krevní buňky³⁸. V některých studiích pak byly k hodnocení cytotoxicity použity primární a imortalizované buněčné linie^{33,36–41} či kmenové buňky³⁹.



Obr. 1. Možnosti povrchové modifikace SPIONs³²

Tabulka I

Přehled obalových látek SPIONs pro biomedicínské aplikace^{27,31,35}

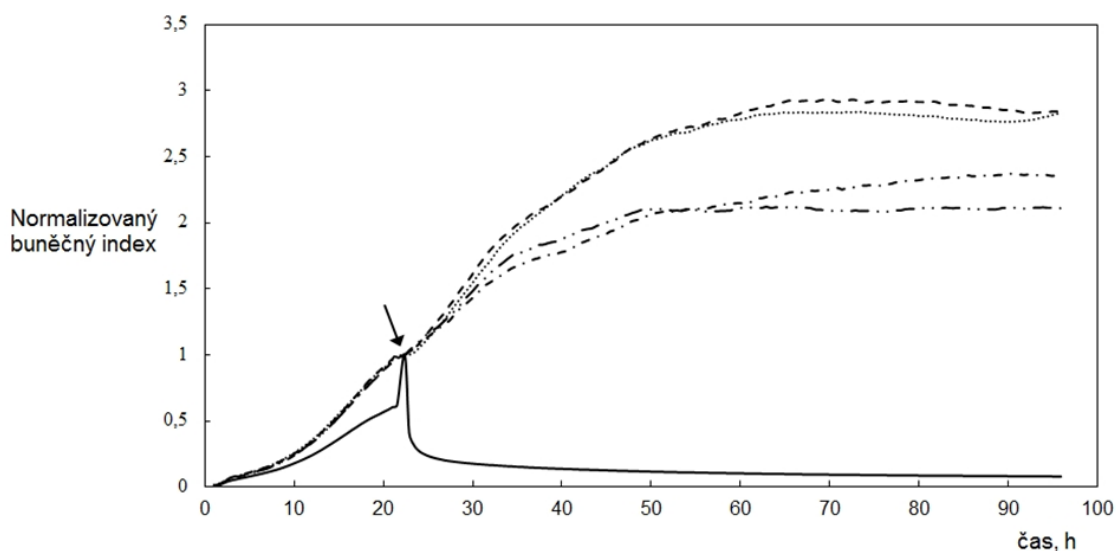
Typ látky	Obal
Anorganické látky	oxid křemičitý, zlato, gadolinium
Přírodní polymery	dextran, chitosan, alginát, želatina, pullulan, arabinogalaktan
Syntetické polymery	polyethylenglykol (PEG), polyvinylpyrolidon (PVP), polyvinylalkohol (PVA), poly(laktidy-co-glykolidy) (PLGA), polyethylenimin (PEI), kyselina polyakrylová (PAA), kyselina polymléčná (PLA), kyselina polymetakrylová, poly(<i>N</i> -isopropylacrylamid)(pNIPAAm), polykaprolakton (PCL)
Monomerní organické látky	kyselina stearová, olejová, palmitová, citronová, 2,3-dimerkaptojantarová (DMSA), dopamin

In vitro testy představují jednoduchý a efektivní způsob, jak získat předběžné údaje o toxicitě SPIONs. Velkou výhodou *in vitro* testů je jejich relativně nízká ekonomická náročnost a eliminace etických problémů spojených s pokusy na zvířatech. K získání spolehlivých a reprodukovatelných výsledků z *in vitro* testů je nutné stanovit adekvátní analytické podmínky, např. výběr buněčné linie, růstové podmínky, nebo přesný postup pro přípravu testu.

K hodnocení *in vitro* cytotoxicity SPIONs jsou používány stejné testy, které se používají také u klasických nanočástic. Tyto testy lze rozdělit do několika hlavních kategorií. Jsou to především testy hodnotící morfologii buněk^{36,38,39}, viabilitu a proliferaci buněk^{35–39,42}, produkci reaktivních forem kyslíku (ROS)^{35,36,38,43}, genotoxicitu^{35,37} a příjem SPIONs buňkami^{35,38,39,43}. Kromě těchto základních kategorií lze hodnotit celou řadu dalších parametrů, jako je lokalizace SPIONs v cytozolu a jejich vliv na jednotlivé buněčné struktury^{36,37,39}, mitochondriální potenciál^{35,36}, vliv na buněčný cyklus a apoptózu³⁶, produkci prozánětlivých cytokinů⁴², změny v expresi genů³⁷, které mohou přispět k hlubšímu pochopení mechanismů účinku SPIONs.

Ke stanovení viability a proliferace buněk se běžně využívají kolorimetrické metody, z nichž nejběžnější je test vylučování trypanové modři^{38,44}, laktát-dehydrogenasový test (LDH)^{35,39,42} a testy využívající redukce tetrazoliových solí jako jsou 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid (MTT), 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfofenyl]-2*H*-tetrazolium-5-karboxanilid (XTT), 4-[3-(4-jodofenyl)-2-(4-nitrofenyl)-2*H*-5-tetrazolio]-1,3-benzen disulfonát (WST) a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-

-(3-karboxymethoxyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2*H*-tetrazolium (MTS)^{35–38,42}. Všechny výše zmíněné testy řadíme mezi tzv. end-point analýzy, pro které je typické, že výsledek testování je znám až v momentě vyhodnocení. Poměrně nedávno však vznikla nová metoda umožňující sledování dynamických procesů v populaci buněk pod vlivem potenciálně cytotoxických agens (proliferaci, viabilitu a buněčnou smrt). Jedná se o metodu xCELLigence, která umožňuje na základě měření elektrické impedance monitorování průběhu experimentu od jeho počátku až po jeho konec. Hodnota impedance je závislá na počtu, adhezi a morfologii buněk. Mění se hodnoty impedance jsou vyhodnocovány systémem xCELLigence v předem stanovených časových intervalech a vyjádřeny jako tzv. „buněčný index“^{43,45}. Výsledkem jsou křivky, jež jsou závislé na čase a buněčném indexu. Z hodnot buněčného indexu lze následně odečítat vliv SPIONs přidaných k buněčné suspenzi a pozorovat tak jejich případný cytotoxický efekt na buňky^{46,47}. V našem experimentu jsme pomocí systému xCELLigence analyzovali vliv jednotlivých koncentrací nanočástic Fe₃O₄@SiO₂ na buňky lidského adenokarcinomu plic A549 (obr. 2). Buňky A549 byly na speciální E-destičku (ve které se kultivují buňky) vysety v koncentraci 7500 buněk na jamku. Po 22 hodinách byly k buňkám přidány jednotlivé koncentrace nanočástic, pozitivní a negativní kontrola. Vliv nanočástic na buňky A549 byl sledován po dobu 72 h, poté byl experiment ukončen. Experimentální podmínky byly stejné jako ve studii Sedlák a spol.⁴⁷. Z růstových křivek (obr. 2) je patrný mírný pokles proliferační aktivity u koncentrací nanočástic 100 a 400 μg ml⁻¹. Tento pokles proliferace (projevující se



Obr. 2. Analýza buněčné proliferace v reálném čase. Křivky znázorňující proliferaci buněk A549 po působení jednotlivých koncentrací nanočástic Fe₃O₄@SiO₂. Jako negativní kontrola byl použit 5% fosfátový pufr (PBS) jako pozitivní kontrola 5% dimethylsulfoxid (DMSO). Změna proliferace A549 buněk je vyjádřena změnou tzv. normalizovaného buněčného indexu zaznamenaného přístrojem xCELLigence. Data křivek znázorňují průměr z triplicátu. Čas přidání jednotlivých koncentrací nanočástic Fe₃O₄@SiO₂, pozitivní a negativní kontroly je označen šipkou, ····· 5% PBS, - - - - 1 μg ml⁻¹, - · - · - 100 μg ml⁻¹, - - - - 400 μg ml⁻¹, — 5% DMSO

snížením hodnot buněčného indexu) vůči negativní kontrole (5% PBS) nastal v čase cca 35 hodin (cca 13 hodin po ovlivnění) a trval až do ukončení experimentu.

Řada autorů prokázala úzký vztah mezi viabilitou a velikostí, koncentrací, nábojem, povrchovými vlastnostmi a funkcionalizací SPIONs. Veškeré tyto parametry mohou ovlivnit příjem nanočástic buňkami a jejich potenčníální cytotoxicitu^{48–50}. Studie Soenena a spol. naznačuje, že rozhodující vliv na viabilitu a proliferaci buněk má právě intracelulární koncentrace SPIONs³⁹. V této studii byly použity celkem čtyři typy funkcionalizovaných SPIONs: Resovit, Endorem, velmi malé organické částice (VSOP) a magnetolipotómy (MLs). U všech těchto typů nanočástic byl pozorován negativní vliv na proliferaci myších neurálních kmenových buněk a lidských krevních endoteliálních buněk, který koreloval s intracelulární koncentrací nanočástic. Zajímavým zjištěním této studie je také fakt, že tento negativní efekt na buněčnou proliferaci byl pouze dočasný a pominul po 8 dnech kultivace, nebo po zředění nanočástic. Studie také naznačuje jeden z mechanismů možného cytotoxického působení SPIONs. Vysoká intracelulární koncentrace nanočástic negativně ovlivnila jak mikrotubulární a aktinový cytoskelet, tak i formování a zrání fokálních adhezí. Současně s ovlivněním těchto struktur došlo také k poklesu exprese fokální adhezni kinasy (FAK). Nižší exprese FAK a menší celková plocha fokálních adhezí může dále negativně ovlivnit aktinový cytoskelet a buněčnou proliferaci. Výsledkem tohoto působení SPIONs je narušení signální dráhy FAK, což může mít velice nepříznivý dopad na migraci a diferenciaci buněk³⁹. Desintegraci mikrotubulárního a aktinového cytoskeletu u lidských endotelových žilních buněk (HUVEC) po působení SPIONs potažených dextranem a SPIONs potažených kyselinou citrónovou popsal také Wu a spol.⁵¹.

Dalším mechanismem cytotoxického působení SPIONs je jejich schopnost indukovat tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS) s následným vznikem oxidativního stresu. Někteří autoři uvádějí, že oxidativní stres je nejvýznamnějším faktorem toxicity nanomateriálů⁵². Schopnost SPIONs indukovat produkci ROS byla popsána celou řadou autorů^{35,36,38,40,41,53–57}. Zvláště v případě SPIONs se předpokládá existence několika mechanismů, kterými dochází ke generování ROS. SPIONs jsou obvykle pohlceny endocytózou a vzniká endocytotický váček obsahující SPIONs. Tento váček následně splývá s lyzozómem, kde je jeho obsah rozložen kyselými lyzozomálními hydrolasami za uvolnění iontů železa⁵⁸. Ionty železa uvolněné z lyzozomů do cytozolu mohou vstupovat do Fentonovy reakce, kterou dochází ke vzniku vysoce reaktivních hydroxylových radikálů⁵⁹. SPIONs mohou indukovat produkci ROS také přímou interakcí s buněčnými organelami. SPIONs tak mohou poškodit mitochondriální membránu⁶⁰ nebo vyvolat produkci ROS interakcí s nikotinamidnukleotidfosfát (NADPH) oxidasou v cytoplazmatické membráně⁶¹. K produkci ROS může docházet také zprostředkovaně, kdy ROS indukované působením SPIONs vyvolávají zánětlivou reakci, která je doprovázena produkcí prozánětlivých

cytokinů, jako je např. interleukin-1 beta (IL-1b), interleukin 6 (IL-6), tumor nekrotizující faktor alfa (TNF- α) a aktivací buněk účastnících se procesu rozvoje zánětu (neutrofilů, makrofágů, eozinofilů), které uvolňují další ROS⁶². Poměrně rozsáhlou studií, jež se snažila objasnit vztah mezi produkcí ROS indukovanou působením nanočástic a cytotoxicitou, je studie Díaze a spol.³⁸. V této studii bylo testováno celkem pět rozdílných typů SPIONs na čtyřech jak nádorových, tak primárních buněčných liniích. Ačkoli tato studie nepotvrdila přímou souvislost mezi produkcí ROS indukovanou působením SPIONs a cytotoxicitou³⁸, řada nedávných studií naznačuje, že ROS indukované působením nanočástic mohou negativně ovlivnit celou řadu buněčných procesů. Vysoká intracelulární koncentrace ROS tak může indukovat apoptózu³⁴, ovlivnit mikrotubulární a aktinový cytoskelet^{40,56}, inhibovat diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk⁵⁵, vyvolat zánětlivou reakci⁵⁴, poškodit mitochondrie³⁴ a genomovou DNA⁵⁷.

Právě produkce ROS byla až doposud považována za hlavní příčinu genotoxicity magnetických nanočástic^{62,63}. Tento vztah mezi ROS a genotoxicitou však vyvrací recentní studie Mesárošové a spol.⁵³. Autoři studovali schopnost tří druhů funkcionalizovaných SPIONs generovat ROS a zároveň také způsobit poškození DNA u buněk lidského adenokarcinomu plic a u lidských embryonálních fibroblastů. Všechny tři druhy funkcionalizovaných SPIONs byly schopny indukovat poškození DNA (detegované pomocí kometového testu) u buněk lidského adenokarcinomu plic, nikoliv však u lidských embryonálních fibroblastů. Pomocí modifikovaného kometového testu autoři následně hledali specifické oxidační poškození DNA vznikající působením ROS, které však nenalezli u žádné ze zkoumaných linií. Tato data tedy naznačují, že poškození DNA nemá u studovaných SPIONs souvislost s oxidativním stresem. Závěrem autoři naznačují, že zásadní roli v genotoxicitě použitých SPIONs může hrát jejich interakce se strukturami buněčného cytoskeletu s následným narušením buněčné homeostázy vedoucím až k poškození DNA a nekróze⁵³.

Jak studie Mesárošové a spol.³⁸, tak i studie Díaze a spol.⁵³ ukazují diametrálně odlišnou citlivost jednotlivých buněčných linií k testovaným nanočásticím. Některé další studie potvrzují tento závěr a jasně dokazují, že různé buněčné linie jsou k působení stejných SPIONs jinak citlivé⁶⁴. Použitý buněčný model je tak dalším z faktorů, který může výrazně ovlivnit výsledek testů toxicity, a může být příčinou často rozporuplných závěrů uváděných v literatuře.

Důležitou vlastností SPIONs jsou také jejich interakce s proteiny. Dostane-li se nanočástice do biologické tekutiny (např. krev, plazma) nebo do kultivačního média, obklopí ji proteiny. Tato vnější vrstva proteinů se nazývá proteinová korona⁶⁵. Proteinová korona představuje primární rozhraní, které je v kontaktu s jednotlivými buňkami a do značné míry ovlivňuje biologický efekt nanočástic. Složení proteinové korony závisí na velikosti^{66,67}, tvaru a drsnosti povrchu⁶⁸, povrchovém náboji⁶⁹ a povrchové modifikaci nanočástic⁶⁷. I přesto, že všechny tyto vlastnos-

ti SPIONs mají významný vliv na složení proteinové korony, doposud nebyl nalezen jednoznačný vztah mezi těmito vlastnostmi SPIONs a složením proteinové korony^{65,70}.

Experimenty se SPIONs odhalující mezní nebo žádnou toxicitu v *in vitro* testech mohou být přesunuty na *in vivo* testování. Při *in vivo* testování jsou, jako experimentální organismy, využívána drobná laboratorní zvířata. V těchto podmínkách je monitorován dlouhodobý efekt SPIONs na organismus. Pokud *in vivo* studie vykazují povzbudivé výsledky z hlediska terapeutické účinnosti a bezpečnosti SPIONs, mohou být tyto nanočástice dále schváleny pro klinické použití příslušnými regulačními orgány⁷¹.

4. *In vivo* toxicita magnetických nanočástic

Dalším krokem po *in vitro* testech jsou pokusy prováděné na drobných laboratorních zvířatech, nejčastěji myších nebo potkanech, ale také např. králících nebo morčátech. Před zahájením těchto testů je nutné opatřit si souhlas od příslušných orgánů. *In vivo* testy jsou nenahraditelné pro zkoumání biologických účinků v situacích, které nemohou být namodelovány *in vitro*⁷². *In vivo* studie poskytují údaje o farmakokinetických vlastnostech (absorpci, distribuci a eliminaci) SPIONs. Tyto studie umožňují získat informace také o systémových toxických účincích včetně vlivu na imunitní, nervový, reprodukční a kardiovaskulární systém. *In vivo* studie mohou také odhalit případné karcinogenní účinky SPIONs⁴⁴.

Nanočástice mohou být do organismu vpravovány různými cestami, od inhalace, přes perorální a kožní podání, až po injekční aplikaci⁷². Cesta podání, náboj, chemické složení, povrchové vlastnosti a velikost SPIONs mají vliv na biologický poločas a distribuci SPIONs do jednotlivých tkání a orgánů⁷³. Vhodně zvolená velikost SPIONs je proto velice důležitou charakteristikou před začátkem testování. Částice větší než 200 nm jsou snadno vychytávány slezinou a naopak částice s rozměrem pod 10 nm jsou silně odstraňovány renální clearance. Vhodným rozměrem nanočástic pro *in vivo* testování se zdá být rozmezí 10–100 nm (cit.⁷⁴). Biodistribuce SPIONs je typicky soustředěna do několika orgánů: 80–90 % v játrech, 5–8 % ve slezině a 1–2 % v kostní dřeni⁷³. Zvířatům jsou zpravidla SPIONs dávkovány v různých koncentracích a v průběhu časového intervalu několika týdnů jsou zvířata podrobována testům. V určitém časovém intervalu (např. jednou týdně) je odebrán vzorek krve, ve kterém jsou prováděny běžné hematologické a biochemické testy. Často stanovenými biochemickými parametry jsou aspartáttransaminasa (AST), alanintransaminasa (ALT), alkalická fosfatasa (ALP), celková hladina bílkovin, albumin, bilirubin, glukosa, cholesterol, triglyceridy, močovina nebo kreatinin⁷⁵. Kromě těchto základních parametrů byla ve studii Kima a spol. analyzována také celková hladina železa a celková vazebná kapacita pro železo⁷⁵. Z hematologických testů může být stanoven klasický krevní obraz⁷⁵ a také základní koagulační vyšetření⁴⁴. V některých studiích byla odebrána rovněž

bronchoalveolární laváž ke stanovení zánětlivých markerů^{46,72}. Po usmrcení testovaného organismu jsou odebrány tkáně k histopatologické analýze. Nejčastěji zkoumanými orgány jsou plíce^{72,75,76}, játra, ledviny, slezina^{75,76}, mozek, srdce, varlata nebo děloha⁷². Často nechybí také analýza biomarkerů oxidačního stresu, jako jsou hydroxyperoxydylipidů⁷⁶.

Většina *in vivo* studií se shoduje v tom, že SPIONs jsou netoxické, biokompatibilní, a tudíž použitelné v biomedicínských aplikacích^{75–78}. Za všechny lze uvést studii Kima a spol.⁷⁵ a Jaina a spol.⁷⁶. Kim a spol. studovali toxicitu SPIONs obalených vrstvou SiO₂ obsahující rhodamin B isothiocyanát (RITC) na myších. Bylo zjištěno, že tyto nanočástice mohou prostupovat hematoencefalitickou bariérou a přetrvávat v těle dlouhý čas bez toho, aniž by působily na organismus toxicky⁷⁵. Také Jain a spol. uvádějí, že injekčně podávané SPIONs funkcionalizované kyselinou olejovou a kopolymerem Pluronic nevyvolávají dlouhodobé změny ve funkci jaterních enzymů a neindukují oxidační stres u potkanů, a jsou tak vhodné pro cílenou dopravu léčiv a také jako kontrastní látky. Většina změn způsobená podáním těchto SPIONs byla pouze přechodného charakteru a autoři uzavírají, že pro injekční aplikace SPIONs jako kontrastních látek, nebo pro cílenou dopravu léčiv, by intervaly neměly být mezi opakovanými podáními krátké, aby se tělo mohlo dostat zpět do fyziologického stavu⁷⁶. Toxicita SPIONs byla pozorována pouze u koncentrací, které výrazně překračují terapeutické dávky⁷⁹. Důsledkem je pak vysoká koncentrace volného železa v séru, a tím i jeho toxicita. Vysoká koncentrace volného železa má za následek enormní zvýšení oxidačního stresu s následným poškozením tkání volnými radikály⁸⁰.

I přes deklarovanou biokompatibilitu SPIONs ukazuje recentní *in vivo* studie Haniniho a spol.⁴¹ rozdílnou citlivost jednotlivých buněčných typů k působení SPIONs. Po intravenózním podání fluorescenčně značených maghemitových nanočástic potkanům pozorovali autoři 50% zvýšení počtu leukocytů a také poškození jater, ledvin a plic. Naopak srdce a mozek byly bez jakýchkoli známek poškození⁴¹. Tato studie tak potvrzuje výsledky *in vitro* studií, ve kterých byly různé buněčné linie k působení stejných SPIONs jinak citlivé^{38,53,64}.

5. Závěr

Díky svým unikátním fyzikálně chemickým vlastnostem jsou SPIONs využívány v mnoha oblastech biomedicíny. Se vzrůstajícím používáním SPIONs nabývají na významu také otázky týkající se toxicity SPIONs. V poslední době tak roste počet studií zabývajících se toxicitou SPIONs. Většina studií však analyzuje jeden, případně pouze několik málo typů SPIONs na jedné, nebo několika buněčných liniích. Značná nejednotnost panuje také v testech používaných k hodnocení viability, proliferace, poškození DNA, oxidačního stresu a indukce apoptózy. Autoři často používají různá časová schémata, různé koncentrace a udávají množství nanočástic v rozdílných jed-

notkách. Pokud toto vše spojíme s obrovským množstvím různých typů SPIONs lišících se chemickým složením i vlastnostmi (hydrofobicitou/hydrofilita, morfologie povrchu, náboj a velikost), dostaneme nepřeberné množství různých kombinací, které prakticky znemožňují vzájemné srovnání výsledků stanovení toxicity. Vzhledem k této nejednotnosti a roztržitosti volají někteří autoři po standardizování testů toxicity nanočástic. Podle Díaze a spol. je nejlepším způsobem, jak standardizovat testování toxicity nanočástic, souběžné testování několika druhů nanočástic za použití odlišných testů toxicity a odlišných buněčných linií. Pro predikci *in vivo* toxicity SPIONs je důležité objasnit mechanismus jejich cytotoxického působení. I přes vzrůstající množství studií zabývajících se změnami v expresi genů, poškozením DNA, vlivem SPIONs na strukturu cytoskeletu, indukci oxidačního stresu, zůstává mechanismus cytotoxického působení řady SPIONs naprosto neznámý a čeká na své objasnění. Obdobně chybí dlouhodobější *in vivo* studie, zvláště u těch typů SPIONs, kde *in vitro* studie naznačují narušení buněčných funkcí.

Tato práce byla podpořena prostředky z grantu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky ROUTER CZ.1.07/2.3.00/30.0058.

LITERATURA

- Suh W. H., Suslick K. S., Stucky G. D., Suh Y-H.: *Prog. Neurobiol.* 87, 133 (2009).
- Emerich D. F., Thanos C. G.: *Expert Opin. Biol. Ther.* 3, 655 (2003).
- Moroz P., Jones S. K., Gray B. N.: *Int. J. Hyperthermia* 18, 267 (2002).
- Gazeau F., Levy M., Wilhelm C.: *Nanomedicine* 3, 831 (2008).
- Dobson J.: *Drug Dev. Res.* 67, 55 (2006).
- Klostergaard J., Seeney C. E.: *Nanomedicine* 8, 37 (2012).
- Malvindi M. A., Greco A., Conversano F., Figuerola A., Corti M., Bonora M., Lascialfari A., Doumari H. A., Moscardini M., Cingolani R., Gigli G., Casciaro S., Pellegrino T., Ragusa A.: *Adv. Funct. Mater.* 21, 2548 (2011).
- Yi P., Chen G., Zhang H., Tian F., Tana B., Dai J., Wang Q., Deng Z.: *Biomaterials* 34, 3010 (2013).
- Wei W., Quanguo H., Changzhong J.: *Nanoscale Res. Lett.* 3, 397 (2008).
- Na H. B., Song I. C., Hyeon T.: *Adv. Mater.* 21, 2133 (2009).
- Corot C., Robert P., Idee J. M., Port M.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 58, 1471 (2006).
- Lago-Cachón D., Rivas M., López-Larrea C., López-Vázquez A., Martínez-Paredes G., García J. A.: *Phys. Status Solidi C* 11, 1043 (2014).
- Wilhelm C., Gazeau F.: *Biomaterials* 29, 3161 (2008).
- Plank C., Zelphati O., Mykhaýlyk O.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 63, 1300 (2011).
- Tartaj P., Morales M. P., Veintemillas-Verdaguer S., González-Carreño T., Serna C. J.: *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36, R182 (2003).
- Lu A-H., Salabas E. L., Schüth F.: *Angew. Chem.* 46, 1222 (2007).
- Klabunde K. J. (ed.): *Nanoscale Materials in Chemistry*. J. Wiley, New York 2001.
- Cornell U., Schwertmann U.: *The Iron Oxides: Structures, Properties, Reactions, Occurrences and Uses*. Wiley-VCH, Weinheim 2003.
- Hyeon T.: *Chem. Commun.* 8, 927 (2003).
- Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Elst V. L., Muller R. N.: *Chem. Rev.* 108, 2064 (2008).
- Chin A. B., Yaacob I. I.: *J. Mater. Process. Technol.* 191, 235 (2007).
- Basak S., Chen D. R., Biswas P.: *Chem. Eng. Sci.* 62, 1263 (2007).
- Sun J., Zhou S., Hou P., Yang Y., Weng J., Li X., Li M.: *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 80, 333 (2007).
- Gupta A. K., Gupta M.: *Biomaterials* 26, 3995 (2005).
- McCarthy J. R., Weissleder R.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 60, 1241 (2008).
- Sabaté R., Barnadas-Rodríguez R., Callejas-Fernández J., Hidalgo-Alvarez R., Estelrich J.: *Int. J. Pharm.* 347, 156 (2008).
- Hao R., Xing R., Xu Z., Hou Y., Gao S., Sun S.: *Adv. Mater.* 22, 2729 (2010).
- Qian Z. M., Li H., Sun H., Ho K.: *Pharmacol. Rev.* 54, 561 (2002).
- Gupta A. K., Berry C., Gupta M., Curtis A.: *IEEE Trans. Nanobiosci.* 2, 256 (2003).
- Pečová M., Zajoncová L., Poláková K., Čuda J., Šafaříková M., Šebela M., Šafařík I.: *Chem. Listy* 105, 524 (2011).
- Chomoucká J., Drbohlavová J., Húska D., Adam V., Kizek R., Hubálek J.: *Pharmacol. Res.* 62, 144 (2010).
- Mistlberger G., Klimant I.: *Bioanal. Rev.* 2, 61 (2010).
- Ankamwar B., Lai T. C., Huang J. H., Liu R. S., Hsiao M., Chen C. H., Hwu Y. K.: *Nanotechnology* 21, 075102 (2010).
- Kai W., Xiaojun X., Ximing P., Zhenqing H., Qiqing Z.: *Nanoscale Res. Lett.* 6, 480 (2011).
- Malvindi M. A., De Matteis V., Galeone A., Brunetti V., Anyfantis G. C., Athanassiou A., Cingolani R., Pompa P. P.: *PLoS One* 9, e85835 (2014).
- Shukla S., Jadaun A., Arora V., Sinha R. K., Biyani N., Jain V. K.: *Toxicol. Rep.* 2, 27 (2015).
- Mahmoudi M., Laurent S., Shokrgozar M. A., Hosseinkhani M.: *ACS Nano* 5, 7263 (2011).
- Díaz B., Sanchez-Espinel C., Arruebo M., Faro J., de Miguel E., Magadán S., Yagüe C., Fernández-Pacheco R., Ibarra M. R., Santamaría J., González-Fernández A.: *Small* 4, 2025 (2008).
- Soenen S. J. H., Nuytten N., De Meyer S. F., De Smedt S. C., De Cuyper M.: *Small* 6, 832 (2010).
- Buyukhatipoglu K., Clyne A. M.: *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 96, 186 (2011).
- Hanini A., Schmitt A., Kacem K., Chau F., Ammar S., Gavard J.: *Int. J. Nanomed.* 6, 787 (2011).

42. Mbeh D. A., Franca R., Merhi Y., Zhang X. F., Veres T., Sacher E., Yahia L.: *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 100, 1637 (2012).
43. Xing, J. Z., Zhu, L., Jackson J. A., Gabos S., Sun X. J., Wang X. B., Xu X.: *Chem. Res. Toxicol.* 18, 154 (2005).
44. Markides H., Rotherham M., El Haj A. J.: *J. Nanomater.* 2012, 1 (2012).
45. Xing J. Z., Zhu, L., Gabos S., Xie L.: *Toxicol. In Vitro* 20, 995 (2006).
46. Verma N. K., Crosbie-Staunton K., Satti A., Gallagher S., Ryan K. B., Doody T., McAtamney C., MacLoughlin R., Galvin P., Burke C. S., Volkov Y., Gun'ko Y. K.: *J. Nanobiotechnol.* 11, 1 (2013).
47. Sedlák M., Bhosale D. S., Beneš L., Palarčík J., Kalendová A., Královec K., Imramovský A.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 23, 4692 (2013).
48. Villanueva A., Cañete M., Roca A. G., Calero M., Veintemillas-Verdaguer S., Serna C. J., Del Puerto Morales M., Miranda R.: *Nanotechnology* 20, 115103 (2009).
49. Huang J., Bu L., Xie J., Chen K., Cheng Z., Li X., Chen X.: *ACS Nano* 4, 7151 (2010).
50. Ge Y., Zhang Y., Xia J., Ma M., He S., Nie F., Gu N.: *Colloids Surf., B* 73, 294 (2009).
51. Wu X., Tan Y., Mao H., Zhang M.: *Int. J. Nanomed.* 5, 385 (2010).
52. Xia T., Kovochich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T., Sioutas C., Yeh J. I., Wiesner M. R., Nel A. E.: *Nano Lett.* 6, 1794 (2006).
53. Mesárošová M., Kozics K., Bábelová A., Regendová E., Pastorek M., Vnuková D., Buliaková B., Rázga F., Gábelová A.: *Toxicol. Lett.* 226, 303 (2014).
54. Laskar A., Ghosh M., Khattak S. I., Li W., Yuan X. M.: *Nanomedicine* 7, 705 (2012).
55. Chen Y. C., Hsiao J. K., Liu H. M., Lai I. Y., Yao M., Hsu S. C., Ko B. S., Chen Y. C., Yang C. S., Huang D. M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 245, 272 (2010).
56. Apopa P. L., Qian Y., Shao R., Guo N. L., Schwegler-Berry D., Pacurari M., Porter D., Shi X., Vallyathan V., Castranova V., Flynn D. C.: *Part. Fibre Toxicol.* 6, 1 (2009).
57. Ahamed M., Alhadlaq H. A., Alam J., Majeed Khan M. A., Ali D., Alarafi S.: *Curr. Pharm. Des.* 19, 6681 (2013).
58. Gupta A. K., Naregalkar R. R., Vaidya V. D., Gupta M.: *Nanomedicine* 223, (2007).
59. Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.: *Chem. Biol. Interact.* 160, 1 (2006).
60. Sioutas C., Delfino R.J., Singh M.: *Environ. Health Perspect.* 113, 947 (2005).
61. Bedard K., Krause K. H.: *Physiol. Rev.* 87, 245 (2007).
62. Singh N., Manshian B., Jenkins G. J. S., Griffiths S. M., Williams M. P. B., Maffei T. G. G., Wright Ch. J., Doak S. H.: *Biomaterials* 30, 3891 (2009).
63. Singh N., Jenkins G. J. S., Asad R., Doak S. H.: *Nano Rev.* 1, 5358 (2010).
64. Ding J., Tao K., Li J., Song S., Sun K.: *Colloids Surf., B* 79, 184 (2010).
65. Lynch I., Dawson K. A.: *Nano Today* 3, 40 (2008).
66. Tenzer S., Docter D., Rosfa S., Wlodarski A., Kuhrrev J., Rekić A., Knauer S.K., Bantz C., Nawroth T., Bier C., Sirirattanapan J., Mann W., Treuel L., Zellner R., Maskos M., Schild H., Stauber R. H.: *ACS Nano* 5, 7155 (2011).
67. Lundqvist M., Stigler J., Elia G., Lynch I., Cedervall T., Dawson K. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14265 (2008).
68. Mahmoudi M., Serpooshan V.: *J. Phys. Chem. C* 115, 18275 (2011).
69. Capriotti A. L., Caracciolo G., Cavaliere C., Crescenzi C., Pozzi D., Laganà A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 1195 (2011).
70. Li Y., Chen Z. W., Gu N.: *Chin. Sci. Bull.* 57, 3972 (2012).
71. Gil P. R., Huhn D., Del Mercato L. L., Sasse D., Parak W. J.: *Pharmacol. Res.* 62, 115 (2010).
72. Oberdörster G., Maynard A., Donaldson K., Castranova V., Fitzpatrick J., Ausman K., Carter J., Karn B., Kreyling W., Lai D., Olin S., Monteiro-Riviere N., Warheit D., Yang H.: *Part. Fibre Toxicol.* 2, 1 (2005).
73. Duguet E., Vasseur S., Mornet S., Devoisselle J. M.: *Nanomedicine* 1, 157 (2006).
74. Shubayev V. I., Pisanic T. R., Jin S.: *Adv. Drug Delivery Rev.* 61, 467 (2009).
75. Kim J. S., Yoon T.-J., Yu K. N., Kim B. G., Park S. J., Kim H. W., Lee K. H., Park S. B., Lee J.-K., Cho M. H.: *Toxicol. Sci.* 89, 338 (2006).
76. Jain T. K., Reddy M. K., Morales M. A., Leslie-Pelecky D. L., Labhasetwar V.: *Mol. Pharmaceutics* 5, 316 (2007).
77. Muldoon L. L., Sándor M., Pinkston K. E., Neuwelt E. A.: *Neurosurgery* 57, 785 (2005).
78. Ma H. L., Qi X. R., Ding W. X., Maitani Y., Nagai T.: *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 84, 598 (2008).
79. Lacava L. M., Garcia V. A. P., Kückelhaus S., Azevedo R. B., Sadeghiani N., Buske N., Morais P. C., Lacava Z. G. M.: *J. Magn. Magn. Mater.* 272, 2434 (2004).
80. Puntarulo S.: *Mol. Aspects Med.* 26, 299 (2005).

L. Kučírková^a, K. Královec^a, R. Havelek^a, L. Brůčková^a, and M. Sedlák^b (^a*Department of Biological and Biochemical Sciences,* ^b*Institute of Organic Chemistry and Technology, Faculty of Chemical Technology, University of Pardubice*): **Toxicity of Magnetic Nanoparticles**

In recent years, Fe oxide nanoparticles have been increasingly used in a wide range of biomedical applications, including magnetic resonance imaging, magnetic hyperthermia, targeted drug and gene delivery, cell tracking and magnetic cell separation. Although the number of studies examining the toxicity of Fe oxide nanoparticles is

growing exponentially, the in-depth toxicity studies are scanty and the mechanisms underlying their cytotoxicity remain still mostly unclear. This review focuses on the assessment of the *in vitro* and *in vivo* toxicity of Fe oxide nanoparticles and discusses the biological processes underlying their toxicity including cellular uptake, production of reactive O species, modulation of actin and microtubular cytoskeleton, DNA damage and activation of intracel-

lular signalling pathways. The significance of the proteins associated with Fe oxide nanoparticles and assays for assessing their cytotoxicity are also considered. We have tested cytotoxic effects of silica-coated Fe oxide nanoparticles on human lung adenocarcinoma, epithelial cell line A549 using the xCELLigence system for label-free and real-time monitoring of cell viability.