

VPLYV NANOČASTÍC ŽELEZA NA IMUNITNÚ ODPOVEĎ *IN VITRO*

The effect of iron nanoparticles on the immune response *in vitro*

Simona MESIARIKOVÁ^{1*}, Vitalii PATSULA², Jana TULINSKÁ¹, Miroslava LEHOTSKÁ MIKUŠOVÁ¹, Aurélia LÍŠKOVÁ¹, Vlasta MAŠÁNOVÁ¹, Iveta UHNÁKOVÁ¹, Štěpánka TRACHTOVÁ³, Alena ŠPANOVÁ³, Mária DUŠINSKÁ⁴, Fedor ČIAMPOR⁵, Ivo VÁVRA⁶, Bohuslav RITTICH³, Monika URSÍNYOVÁ¹, Mira HORVÁTHOVÁ¹, Michaela SZABOVÁ¹, Silvia ILAVSKÁ¹, Daniel HORÁK²

¹ *Lekárska fakulta, Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava, Slovenská republika*

² *Ústav makromolekulárnej chémie, Akadémie vied Českej republiky, Praha, Česká republika*

³ *Ústav chémie potravín a biotechnológií, Vysoké učení technické v Brne, Česká republika*

⁴ *Health Effects Laboratory, Department of Environmental Chemistry, NILU-Norwegian Institute for Air Research, Kjeller, Norway*

⁵ *Virologický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika*

⁶ *Elektrotechnický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava, Slovenská republika*

SÚHRN

Nanomateriály vyrobené z oxidu železa prinášajú množstvo klinicky užitočných aplikácií od magnetického rezonančného zobrazenia (MRI), transportu liekov na miesto účinku, magnetickej hypertermie až po *in vitro* diagnostiku.

Po vstupe do tela môžu nanočastice (NPs) interagovať s imunitným systémom hostiteľa a byť pohltené bunkami mononukleárneho fagocytového systému. Interakcia medzi časticami a imunitnými bunkami môže viesť k imunosupresii alebo imunostimulácii, preto je dôležité porozumieť interakciám medzi časticami a imunitným systémom, aby sa minimalizovali nežiaduce reakcie organizmu.

V tejto štúdií sa hodnotil vplyv NPs modifikovaných kyselinou hydroxámovou (HA), kyselinou fosforitou (PA) (PA-PEG@Fe₃O₄, HA-PEG@Fe₃O₄) a konvenčných maghemitových (γ -Fe₂O₃) NPs na imunitnú odpoveď. *In vitro* expozícia buniek časticami PA-PEG@Fe₃O₄ a HA-PEG@Fe₃O₄ neindukovala žiadny cytotoxický účinok ani zmenu bunkovej imunitnej odpovede. Nebola potlačená proliferatívna odpoveď T-lymfocytov, T-závislých B-buniek, ani fagocytová aktivita monocytov, granulocytov a respiračné vzplanutie fagocytov. Zmeny *in vitro* produkcie cytokínov, ktoré sa prejavili ako zvýšené hladiny faktoru stimulujúceho kolónie granulocytov a makrofágov (GM-CSF) a znížené

hladiny interleukínu IL-6, IL-8, interferónu- γ (IFN- γ) a tumor nekrotizujúceho faktoru- α (TNF- α) môžu naznačovať moduláciu produkcie cytokínov, hoci pozorované zmeny boli väčšinou bez jasnej dávkovej závislosti.

Hodnotil sa aj príjem nanočastíc mononukleárnymi bunkami ľudskej periférnej krvi. Nízka internalizácia častíc PA-PEG@Fe₃O₄ bunkami predlžuje cirkuláciu a polčas v krvnom riečisku, čo je vysoko prospešné pre aplikáciu nanočastíc ako kontrastnej látky pre MRI. Na druhej strane sú nanočastice HA-PEG@Fe₃O₄ vďaka vysoko účinnej internalizácii do buniek vhodné na *in vitro* označovanie buniek.

Interakcie nanočastíc železa s ľudskými bunkami predstavujú komplexný problém, ktorý je potrebný aj naďalej riešiť. Cieľom je získať nové, účinné a bezpečné látky pre diagnostiku a terapiu závažných ochorení vrátane rakoviny.

Kľúčové slová: Nanočastice oxidu železa, Cytotoxicita, Imunotoxicita, Fagocytóza, Respiračné vzplanutie, Cytokíny

Abstract

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles can bring many clinically useful applications as contrast agents for magnetic resonance imaging, magnetically targeted carriers in drug delivery systems, magnetic hyperthermia or *in vitro* diagnostics.

Once NPs enter the body, they can interact with the host's immune system and be engulfed by cells of the mononuclear phagocyte system. The interaction between the particles and the immune cells may result in immunosuppression or immunostimulation. Therefore, it is critical to understand the interactions between the particles and the immune system to minimize the undesirable reactions of the organism. In this study, the effect of NPs modified with phosphonic acid- (PA) and hydroxamic acid (HA) (PA-PEG@Fe₃O₄, HA-PEG@Fe₃O₄) and conventional maghemite (γ -Fe₂O₃) NPs on the immune response was assessed. *In vitro* exposure to PA-PEG@Fe₃O₄ and HA-PEG@Fe₃O₄ NPs did not induce cytotoxic effect not even changes of cellular immune response. Proliferation activity of T-lymphocytes, T-dependent B-cell response, phagocytic activity of monocytes, granulocytes and respiratory burst of leukocytes, were not altered.

Changes in *in vitro* production of cytokines displayed as increased levels of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and suppressed levels of interleukin IL-6, IL-8, interferon- γ (IFN- γ) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) might indicate modulation in cytokine production however without clear dose-dependence.

Moreover, cellular uptake of NPs into mononuclear cells of human peripheral blood was assessed. Low cell internalization of PA-PEG@Fe₃O₄ NPs prolongs circulation and half time in bloodstream what is highly beneficial for NP application as contrast agent for MRI. On the other hand, internalization of HA-PEG@Fe₃O₄ NPs into cells is highly suitable for *in vitro* cell labelling.

Interaction of iron oxide NPs with human cells is complex problem need to be further studied with the aim to obtain new, efficient and safe diagnostic and therapeutic compounds for treatment of serious diseases including cancer.

Key words: Nanoparticles of iron oxide, Cytotoxicity, Immunotoxicity, Phagocytosis, Respiratory burst, Cytokines

Úvod

Nanotechnológie sú vo svete veľmi aktuálne a majú veľký potenciál v budúcnosti. Široké možnosti ich využitia nás veľmi zaujali a preto sme si vybrali túto tému. Cieľom inovačných nanotechnológií je vyvinúť malé, monodisperzné nanočastice s nízkou toxicitou. Nedávno sa zistilo, že superparamagnetické nanočastice (NPs) oxidu železa s vysokou magnetizáciou a veľkým špecifickým povrchom interagujú s bunkami. Tým sa rozšírilo ich využitie v medicíne a biotechnológii vo forme kontrastných látok pre zobrazovanie magnetickou rezonanciou (MRI), magneticky značených nosičov pre transport liekov, magnetickej hypertermie až po *in vitro* diagnostiku.

Po vstupe do tela môžu NP interagovať s imunitným systémom hostiteľa a byť pohltené bunkami mononukleárneho fagocytového systému. Interakcia medzi časticami a imunitnými bunkami môže viesť k imunosupresii alebo imunostimulácii, čo môže zvýšiť alebo znížiť ich liečebné účinky. Je veľmi dôležité vedieť, ako bude reagovať náš imunitný systém na častice ešte pred ich podaním do organizmu. To je dôvod, prečo sa robila táto štúdia bezpečnosti novosyntetizovaných NP oxidu železa *in vitro*. Cieľom bolo, aby sme lepšie porozumeli interakciám medzi časticami a imunitným systémom a tak minimalizovali nežiaduce reakcie na častice.

Naša štúdia sledovala imunitnú odpoveď na novosyntetizované častice vytvorené v Ústave makromolekulovej chémie ČAV. Jedná sa o nanočastice oxidu železa modifikované polyetylén glykolom (PEG), kyselinou fosforitou (PA) a kyselinou hydroxámovou (HA): PA-PEG@Fe₃O₄ a HA-PEG@Fe₃O₄, špecificky povrchovo upravené tak, aby dosiahli čo najlepšiu biokompatibilitu. Cieľom práce bolo zistiť internalizáciu nanočastíc do buniek.

V ďalšom kroku otestovať cytotoxicitu a vplyv špecificky upravených magnetických NP oxidu železa na imunitnú a zápalovú odpoveď buniek ľudskej periférnej krvi *in vitro*. Špecifickými cieľmi bolo zhodnotenie vplyvu NP na špecifickú a nešpecifickú imunitnú odpoveď pomocou panelu testov. Hodnotil sa najmä vplyv na proliferáciu funkciu lymfocytov, vplyv na fagocytovú aktivitu a respiračné vzplanutie leukocytov. Taktiež sa sledovala protilátková imunita a zápalová odpoveď pomocou *in vitro* produkcie cytokínov. Merali sa hladiny faktora stimulujúceho granulocyty a makrofágy (GM-CSF), faktora nekrotizujúceho nádory (TNF)- α , interleukínu (IL)-6, IL-8 a interferónu (IFN)- γ .

Materiál a metódy

Magnetické nanočastice Fe₃O₄ (s priemerom 12 nm) sa pripravili tepelným rozkladom Fe-oleátu. Pre dosiahnutie koloidnej stability, dispergovateľnosti vo vode a bunkovom kultivačnom médiu boli NP modifikované polyetylén glykolom (PEG), kyselinou fosforitou (PA) a kyselinou hydroxámovou (HA). Výsledkom postupu boli nanočastice PA-PEG@Fe₃O₄ a HA-PEG@Fe₃O₄. Polydisperzné γ -Fe₂O₃ nanočastice (priemer 6 nm) sa získali konvenčným spôsobom koprecipitácie a slúžili ako kontrola (1). Testované nanočastice sa narieslili v kultivačnom médiu na koncentrácie: 0,12; 0,6; 3; 15 a 75 $\mu\text{g} / \text{cm}^2$, t.j. 0,17; 0,85; 4,24; 21,21 a 106 $\mu\text{g} / \text{ml}$ a pridali sa k bunkám.

V štúdiu sa sledoval obsah internalizovaného železa pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS). Dôležitou časťou bolo hodnotenie imunotoxicity a cytotoxicity pomocou proliferácie aktivity lymfocytov (kvapalinová scintilácia), *in vitro* produkcie cytokínov (ELISA), fagocytovej aktivity a respiračného vzplanutia leukocytov (prietoková cytometria). Detailné informácie o použitých materiáloch a metódach sú popísané v publikácii (1).

Výsledky

Obsah internalizovaných NP v bunkách

Koncentrácia železa ako indikátora internalizovaných NP v bunkách bola analyzovaná pomocou AAS. Obmedzenie metódy spočíva v tom, že meria internalizované ale aj povrchovo adherované častice.

V tejto štúdiu bol obsah internalizovaných a povrchovo adherovaných nanočastíc HA-PEG@Fe₃O₄ v mononukleárných bunkách ľudskej periférnej krvi 72 pg Fe na bunku, čo

predstavuje približne dvojnásobnú hodnotu v porovnaní s konvenčnými časticami γ -Fe₂O₃ (38 pg Fe na bunku) a PA-PEG@Fe₃O₄ časticami (25 pg Fe na bunku). Nízka internalizácia častíc PA-PEG@Fe₃O₄ bunkami predlžuje cirkuláciu a polčas rozpadu v krvnom obeh, čo je výhodné pri aplikácii ako MRI kontrastnej látky (1).

Hodnotenie cytotoxicity

Zhodnotenie cytotoxicity je dôležité pre stanovenie netoxických koncentrácií NP oxidu železa pre následné hodnotenie imunotoxicity. Po 24 a 72 hodinách inkubácie sa nezistili žiadne významné cytotoxické účinky častíc PA-PEG@Fe₃O₄, HA-PEG@Fe₃O₄ a γ -Fe₂O₃ (0,12–75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) na ľudské periférne krvné bunky. Nízka koncentrácia častice HA-PEG@Fe₃O₄ zvýšila proliferáciu krvných buniek (Graf č. 1), avšak stimulácia bazálnej proliferatívnej bunkovej aktivity bola významná len v kultúrach vystavených nízkej koncentrácii častíc HA-PEG@Fe₃O₄ (0,12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) počas 72 hodín.

Proliferačná odpoveď ľudských periférnych T-lymfocytov a T-závislých B-buniek

Proliferačia T-lymfocytov a T-závislých B-buniek bola hodnotená po stimulácii lymfocytov fytohemaglutinínom (PHA), konkanavalínom (Con A) a pokeweed mitogénom (PWM) v kultúrach periférnej krvi po 24 a 72 hodinovej expozícii γ -Fe₂O₃, PA-PEG@Fe₃O₄ a častice HA-PEG@Fe₃O₄ (Graf č. 2 a-c). Bez ohľadu na použitý mitogén, PA- a HA-PEG@Fe₃O₄ častice v celom koncentračnom rozsahu (0,12-75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a v oboch časových intervaloch významne neovplyvnili proliferačnú odpoveď lymfocytov. Jediné významné potlačenie proliferačnej aktivity T-lymfocytov sa pozorovalo v kultúrach ošetrených γ -Fe₂O₃ NPs (75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) počas 72 hodín pri stimulácii Con A (Graf č. 2b).

Hodnotenie produkcie cytokínov

Hodnotenie *in vitro* produkcie cytokínov po 48 hodinovej expozícii NPs v supernatantoch bunkovej kultúry ukázalo, že vysoké koncentrácie HA-PEG@Fe₃O₄, PA-PEG@Fe₃O₄ a γ -Fe₂O₃ NPs stimulovali produkciu cytokínu GM-CSF v bunkových kultúrach aktivovaných PHA mitogénom (Graf č. 3a). Na rozdiel od toho, produkcia GM-CSF v supernatantoch buniek exponovaných strednej dávke PA-PEG@Fe₃O₄ (3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) bola potlačená.

V supernatantoch z kultúr ošetrených nanočasticami neboli dokázané žiadne významné zmeny v produkcii IL-6 oproti kontrolám (Graf č. 3b).

Produkcia IL-8 bola významne potlačená po inkubácii s vysokou koncentráciou HA-PEG@Fe₃O₄ (75 µg/cm²) v kultúrach stimulovaných PHA (Graf č. 3c). Podobne koncentrácia 15 µg/cm² PA-PEG@Fe₃O₄ významne znížila produkciu IL-8 chemokínu v PWM- stimulovaných kultúrach; zmeny nezáviseli od dávky.

V supernatantoch bunkových kultúr stimulovaných PHA a vystavených strednej dávke častíc PA-PEG@Fe₃O₄ (3 µg/cm²) a vyššej dávke častíc HA-PEG@Fe₃O₄ (15 µg/cm²) boli zistené signifikantne znížené hladiny prozápalového cytokínu IFN-γ (Graf č. 3d).

Hladiny TNF-α boli významne potlačené v bunkových kultúrach vystavených 15 - 75 µg/cm² nanočastíc HA-PEG@Fe₃O₄ a stimulovaných PHA (Graf č. 3e). Okrem toho produkcia TNF-α bola významne znížená v kultúrach stimulovaných PWM po expozícii HA-PEG@Fe₃O₄ (3 a 5 µg/cm²). Táto redukcia bola závislá od dávky v kultúrach vystavených nanočasticiam PA-PEG@Fe₃O₄.

Hodnotenie fagocytovej aktivity

Fagocytová aktivita monocytov bola významne potlačená iba v bunkových kultúrach vystavených strednej dávke γ-Fe₂O₃ (15 µg/cm²) inkubovaných 24 hodín (Graf č. 4a). Po 48 hodinách inkubácie bolo potlačenie fagocytovej aktivity monocytov závislé od dávky ešte výraznejšie a viditeľné už pri nižšej koncentrácii γ-Fe₂O₃ NPs. Respiračné vzplanutie fagocytov bolo významne znížené aj pri vystavení nízkej dávke γ-Fe₂O₃ NPs (0,12 µg/cm²) počas 24 hodín (Graf č. 4c). Keďže tento účinok nebol zistený po 48 hodinách expozície, považujeme tento nález za nevýznamný. Pri expozícii buniek nanočasticiam PA-PEG@Fe₃O₄ a HA-PEG@Fe₃O₄ neboli zistené žiadne významné zmeny vo fagocytovej aktivite monocytov, granulocytov, ani v respiračnom vzplanutí leukocytov, okrem vysokej koncentrácie 75 µg PA-PEG@Fe₃O₄/cm² (48 h), ktorá zvýšila fagocytovú aktivitu granulocytov (P=0,05) (Graf č. 4a-c). Tieto zistenia ukazujú, že PEGylované nanočastice Fe₃O₄ nemali žiadny vplyv na fagocytovú aktivitu profesionálnych fagocytov.

Diskusia

V tejto štúdií sa hodnotil vplyv PA-PEG@Fe₃O₄, HA-PEG@Fe₃O₄ NPs a konvenčných maghemitových (γ-Fe₂O₃) NPs na imunitnú odpoveď. Sledoval sa aj obsah internalizovaného železa do mononukleárných buniek ľudskej periférnej krvi. Funkčné skupiny (kyselina fosforitá alebo hydroxámová) v polymérnom obale významne ovplyvnili príjem častíc bunkami. Nami zistené internalizované množstvo železa do buniek bolo omnoho vyššie v porovnaní s nálezmi iných autorov. Obsah Fe v ľudských pľúcnych diploidných

embryonálnych bunkách HEL 12469, ktoré boli inkubované s časticami Fe_3O_4 obalenými oleátom sodným dosahoval 9,7 pg Fe na bunku, pre NPs $\text{PEG@Fe}_3\text{O}_4$ obalené oleátom sodným 3,7 pg Fe na bunku a pre Fe_3O_4 NP obalené PEG a oleátom sodným 2,2 pg Fe na bunku (2), zatiaľ čo v bunkách karcinómu pľúc A549 bolo zistených iba 0,1 až 0,5 pg Fe (2). Naproti tomu v ľudských bunkách karcinómu pľúc SPC-A1 sa našlo podstatne väčšie množstvo (202 pg Fe/bunku) (3). Bunky RAW 264.7 podobné makrofágom značené nanočasticami $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ obalenými dimerkaptojantárovou kyselinou obsahovali 38 pg Fe na bunku (4). Môžeme teda predpokladať, že internalizácia nanočastíc do buniek je komplexným javom, ktorý závisí od typu buniek, času inkubácie, povrchových chemických zložiek častíc a náboja. Nízka internalizácia častíc PA- $\text{PEG@Fe}_3\text{O}_4$ bunkami predlžuje cirkuláciu a polčas rozpadu v krvnom obeh, čo je výhodné pri aplikácii ako MRI kontrastnej látky.

V ďalšej časti sme hodnotili biologickú bezpečnosť častíc. Začali sme hodnotením cytotoxicity. Nezistili sme žiadne významné cytotoxické účinky častíc $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, PA- $\text{PEG@Fe}_3\text{O}_4$ a HA- $\text{PEG@Fe}_3\text{O}_4$ ($0.12\text{--}75 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) na ľudské periférne krvné bunky. Podobné výsledky pozorovali Yan et al. a Laskar et al. (5-6), keď zistili, že NPs oxidu železa významne neovplyvnili životnosť Jurkat buniek (bunky ľudskej T-bunkovej leukémie) ani U937 (bunky ľudského histiocytového lymfómu) a THP1 buniek (bunky ľudskej akútnej monocytovej leukémie). Podobne NPIO nanočastice obalené amino-PVA neovplyvnili životnosť ľudských imunitných buniek (7), zatiaľ čo negatívne nabité častice oxidu železa obalené kyselinou polyakrylovou, pozitívne nabité častice oxidu železa obalené polyetylénimínom, a neutrálne PEG-potiahnuté častice oxidu železa vykazovali nízku toxicitu voči ľudskej monocytovej bunkovej línii (8). Na druhej strane Rajiv et al. (9) pozorovali pokles životnosti ľudských lymfocytov vystavených $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, Co_3O_4 a iným časticiam. Tieto kontroverzné výsledky nie sú prekvapujúce, pretože výsledky hodnotenia cytotoxicity závisia v prvom rade na použítom teste. Po druhé, výsledky závisia od veľkosti častíc, tvaru, obalu, náboja a bunkového modelu použitého na testovanie.

Hodnotenie vplyvu testovaných nanočastíc na proliferačnú aktivitu T-lymfocytov, T-závislých B-lymfocytov, fagocytovú aktivitu a respiračné vzplanutie fagocytov neukázalo žiadne výrazné účinky na funkciu imunitných buniek. Podobný nevýrazný vplyv na imunitnú odpoveď, ako v našich výsledkoch, bol zistený u nanočastíc oxidu železa stabilizovaných dextránom vyvinutých pre hypertermiu (10).

Predpokladáme, že pozorovaná stimulácia produkcie cytokínu GM-CSF bola spôsobená kompenzačným obranným mechanizmom, ktorý zvýšil počet buniek likvidujúcich častice. Uvoľňovanie cytokínu GM-CSF vylučovaného makrofágmi, T-bunkami, NK-bunkami a

ďalšími bunkami viedlo k produkcii granulocytov a monocytov. Na rozdiel od zvýšenej produkcie GM-CSF po expozícii vysokým koncentráciám γ -Fe₂O₃, PA-PEG@Fe₃O₄ a HA-PEG@Fe₃O₄, produkcia GM-CSF v supernatantoch buniek exponovaných strednej dávke PA-PEG@Fe₃O₄ (3 μ g/cm²) bola potlačená a to limituje jednoznačnosť takéhoto záveru.

Na druhej strane pod vplyvom vysokej dávky HA-PEG@Fe₃O₄ NP a strednej dávky PA-PEG@Fe₃O₄ bola potlačená produkcia IL-8, ktorý je vylučovaný hlavne makrofágmi a pôsobí ako neutrofilný chemotaktický faktor. Supresia produkcie IL-8 pod vplyvom PA-PEG@Fe₃O₄ nebola jasne závislá od dávky.

Signifikantne znížená bola aj hladina prozápalového cytokínu IFN- γ , ktorý je produkovaný hlavne makrofágmi. Produkcia IFN- γ , ktorý je silným aktivátorom makrofágov a induktor expresie MHC II (hlavný histokompatibilný systém), bola vplyvom častíc potlačená nezávisle od dávky častíc. Výraznejší účinok stredných dávok častíc PA-PEG@Fe₃O₄ a HA-PEG@Fe₃O₄ na produkciu IFN- γ možno pripísať rôznym pomerom povrchu k objemu častíc v jamke pri rôznych koncentráciách častíc. Inak povedané, so zvyšujúcou koncentráciou NP v jamke môže dochádzať k agregácii NP a nedochádza k ich interakcii s bunkami.

Ďalej sme sledovali supresiu produkcie TNF- α v kultúrach exponovaných HA-PEG@Fe₃O₄ NP aj PA-PEG@Fe₃O₄ NP. TNF- α je produkovaný hlavne aktivovanými makrofágmi ako aj inými typmi buniek, napr. CD4 lymfocytmi, NK bunkami a neutrofilmi. Okrem toho je aj bunkový signálny proteín, ktorý hrá úlohu pri vzniku systémového zápalu v organizme.

Literatúra popisujúca vplyv častíc oxidu železa na sekréciu cytokínov sa v záveroch líši. Niektoré práce neuviedli žiadny vplyv nanočastíc oxidu železa na produkciu prozápalových cytokínov TNF- α , IL-6 a IL-1 β (11). Iné práce popísali schopnosť NP oxidu železa spôsobiť od dávky závislú, LPS indukovanú supresiu aktivácie nukleárneho faktora- κ B a supresiu produkcie prozápalových cytokínov v *in vitro* kultúrach ľudských monocytov (11). Zmenená sekrécia cytokínov bola tiež zistená v ľudských imunitných bunkách vystavených časticiam oxidu železa obaleného amino-PVA (7). V bunkách U937, THP1 a v primárnych monocytoch, ktoré boli vystavené NP oxidu železa, bola pozorovaná zvýšená sekrécia TNF- α , IL-10 a potlačená sekrécia IL-6 (6, 12).

Záver

Hodnotenie cytotoxicity, imunotoxicity a príjmu novosyntetizovaných monodisperzných PEGylovaných magnetických NP primárnymi ľudskými periférnymi krvnými leukocytmi prienieslo sľubné výsledky.

Nízka internalizácia častíc PA-PEG@Fe₃O₄ bunkami predlžuje cirkuláciu a polčas v krvnom riečisku, čo je vysoko prospešné pre aplikáciu nanočastíc ako kontrastnej látky pre MRI. Na druhej strane sú nanočastice HA-PEG@Fe₃O₄ vďaka vysoko účinnej internalizácii do buniek vhodné na *in vitro* označovanie buniek.

In vitro expozícia buniek časticami PA-PEG@Fe₃O₄ a HA-PEG@Fe₃O₄ neindukovala žiadny cytotoxický účinok ani zmenu bunkovej imunitnej odpovede. Nebola potlačená proliferácia odpoveď T-lymfocytov, T-závislých B-buniek, fagocytová aktivita monocytov, granulocytov ani respiračné vzplanutie fagocytov. Zmeny *in vitro* produkcie cytokínov, ktoré sa prejavili ako zvýšené hladiny GM-CSF a znížené hladiny IL-8, IFN- γ a TNF- α môžu naznačovať moduláciu produkcie cytokínov, hoci pozorované zmeny boli väčšinou bez jasnej dávkovej závislosti.

Interakcie magnetických PEGylovaných nanočastíc železa s ľudskými bunkami a ich toxicita predstavujú zložitý a komplexný problém, ktorý je potrebný aj naďalej riešiť. Cieľom je dosiahnuť úspešný výsledok a získať nové, účinné a bezpečné látky pre diagnostiku a terapiu závažných ochorení vrátane rakoviny.

PodĎakovanie

Ďakujeme za finančnú podporu projektom: EC FP7 QualityNano, Contract: 2010-262163; EC FP7 NanoTEST, Contract: 201335, EEA and Norwegian Financial Mechanisms and štátnemu rozpočtu Slovenskej republiky (Project SK0020).

Práca bola podporená „Association for Regional Cooperation in the Fields of Health, the Science and Technology (RECOOP HST Association) and the participating Cedars-Sinai Medical Center - RECOOP Research Centers“.

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu "Centrum excelentnosti environmentálneho zdravia", ITMS č. 24240120033, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj, financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Ďakujeme Helene Nagyovej a Edite Mrvíkovej za excelentnú technickú pomoc.

Literatúra

1. PATSULA, V., TULINSKÁ, J., TRACHTOVÁ, Š. et al.: Toxicity evaluation of monodisperse PEGylated magnetic nanoparticles for nanomedicine. *J. Nanotoxicology*, 13, 2019, č. 4, s. 510-526.
2. MESAROSOVA, M., CIAMPOR, F., ZAVISOVA, V. et al.: The intensity of internalization and cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with different surface modifications in human tumor and diploid lung cells. *Neoplasma*, 59, 2012, č. 5, s. 584-597.
3. MA, Y. J., GU, H. C.: Study on the endocytosis and the internalization mechanism of aminosilane-coated Fe₃O₄ nanoparticles in vitro. *J Mater Sci Mater Med.*, 18, 2007, č. 11, s. 2145– 2149
4. GU, J. L., XU, H. F., HAN, Y. H. et al.: The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264.7 cell. *Sci. China Life Sci*, 54, 2011, č. 9, s. 793-805.
5. YAN, L., LIU, X., LIU, W. X. et al.: Fe₂O₃ nanoparticles suppress Kv1.3 channels via affecting the redox activity of Kvβ2 subunit in Jurkat T cells. *Nanotechnology*, 26, 2015, č. 50, s. 505-103.
6. LASKAR, A., GHOSH, M., KHATAK, S. I. et al.: Degradation of superparamagnetic iron oxide nanoparticle-induced ferritin by lysosomal cathepsins and related immune response. *Nanomedicine (Lond)*, 7, 2012, č. 5, s. 705–717.
7. STREHL, C., GABER, T., MAURIZI, L. et al.: Effects of PVA coated nanoparticles on human immune cells. *Int J Nanomedicine*, 10, 2015, s. 3429–3445.
8. XU, Y., SHERWOOD, J. A., LACKEY, K. H. et al.: The responses of immune cells to iron oxide nanoparticles. *J Appl Toxicol*, 36, 2016, č. 4, s. 543–553.
9. RAJIV, S., JEROBIN, J., SARANYA, V. et al.: Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes in vitro. *Hum Exp Toxicol*, 35, 2016, č. 2, s. 170–183.
10. EASO, S.L., MOHANAN, P. V.: In vitro hematological and in vivo immunotoxicity assessment of dextran stabilized iron oxide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 134, 2015, s. 122– 130.
11. GROSSE, S., STENVIK, J., NILSEN, A. M.: Iron oxide nanoparticles modulate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in primary human monocytes. *Int J Nanomedicine*, 11, 2016, s. 4625–4642.

12. GONNISEN, D., QU, Y., LANGER, K. et al.: Comparison of cellular effects of starch-coated SPIONs and poly(lactic-co-glycolic acid) matrix nanoparticles on human monocytes. *Int J Nanomedicine*, 11, 2016, s. 5221–5236.

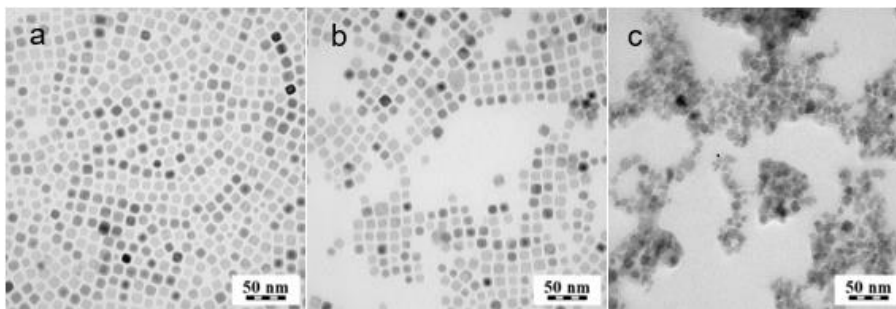
Názvy a legendy obrázkov a grafov

Obrázok č.1. TEM mikrofotografie nanočastíc

(a) PA-PEG@Fe₃O₄, (b) HA-PEG@Fe₃O₄ a (c) γ -Fe₂O₃ nanočastice

Figure 1. TEM micrographs of nanoparticles

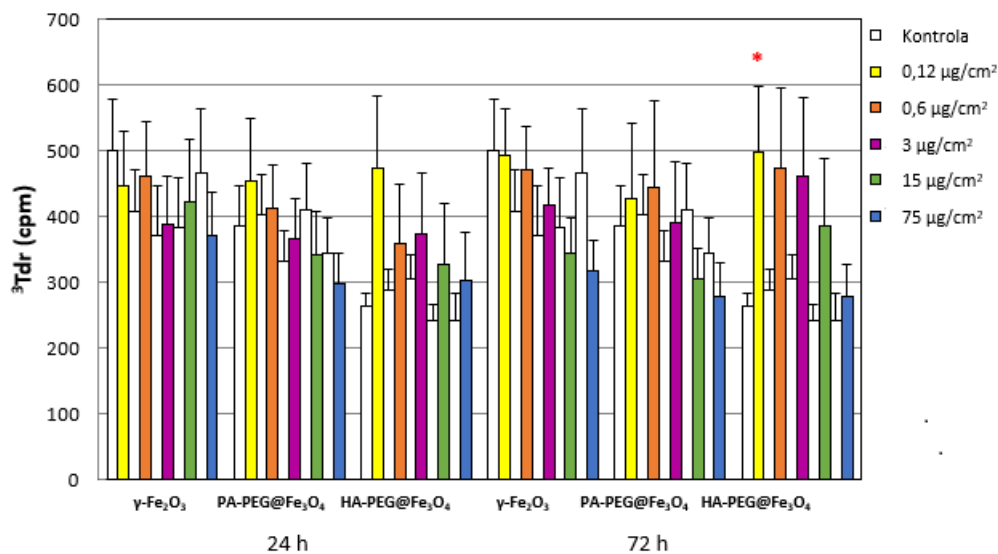
(a) PA-PEG@Fe₃O₄, (b) HA-PEG@Fe₃O₄ and (c) γ -Fe₂O₃ nanoparticles



Graf č. 1 Proliferačná odpoveď nestimulovaných buniek v ľudskej periférnej krvi exponovaných nanočasticami

Figure 1 Proliferative response of non-stimulated human peripheral blood cells exposed to nanoparticles

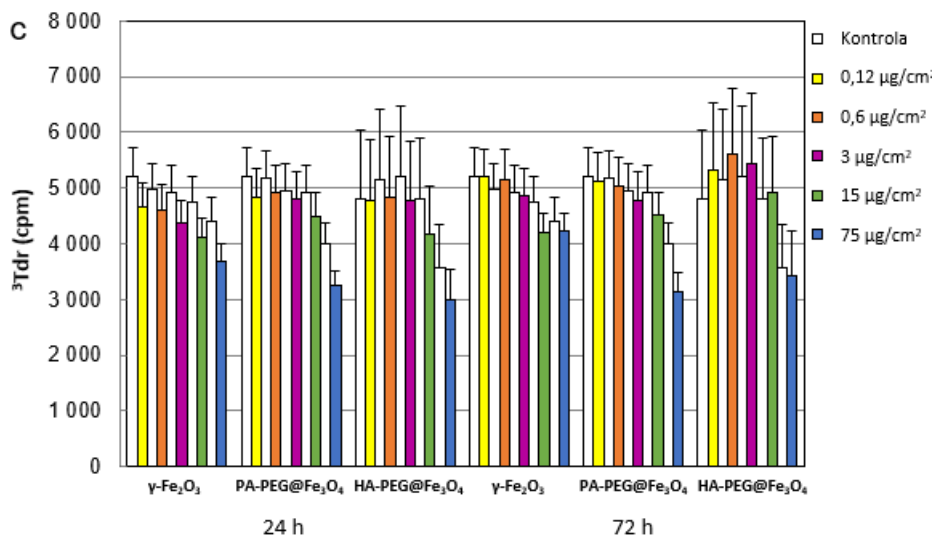
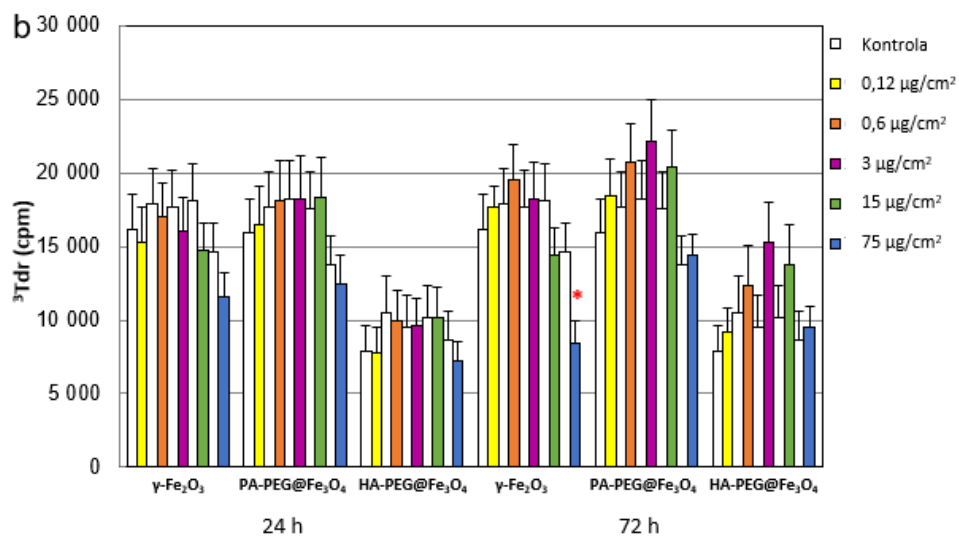
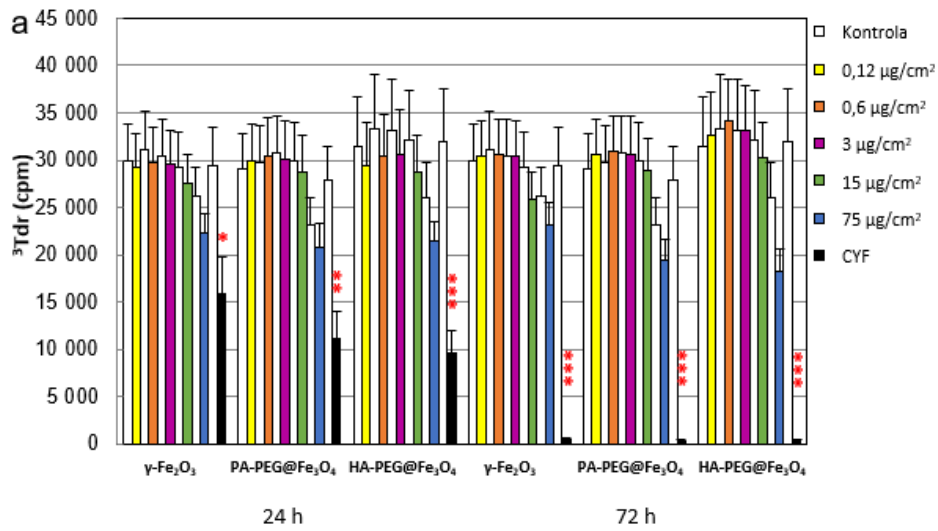
Proliferačia bola meraná ako inkorporácia ^3H -tymidínu (^3Tdr) do replikujúcich sa buniek. Výsledky boli vyjadrené ako priemerný počet zábleskov za minútu (cpm) na kultúru meraných scintilačným spektrofotometrom. Stĺpce zobrazujú priemerný počet cpm za skupinu + stredná chyba priemeru (SEM). Štatistická významnosť: * $p < 0,05$.



Graf č.2a-c Proliferačná odpoveď T-lymfocytov a T-závislých B-buniek v ľudskej periférnej krvi

Figure 2a-c Proliferative response of T-lymphocytes and T-dependent B-cell human peripheral blood

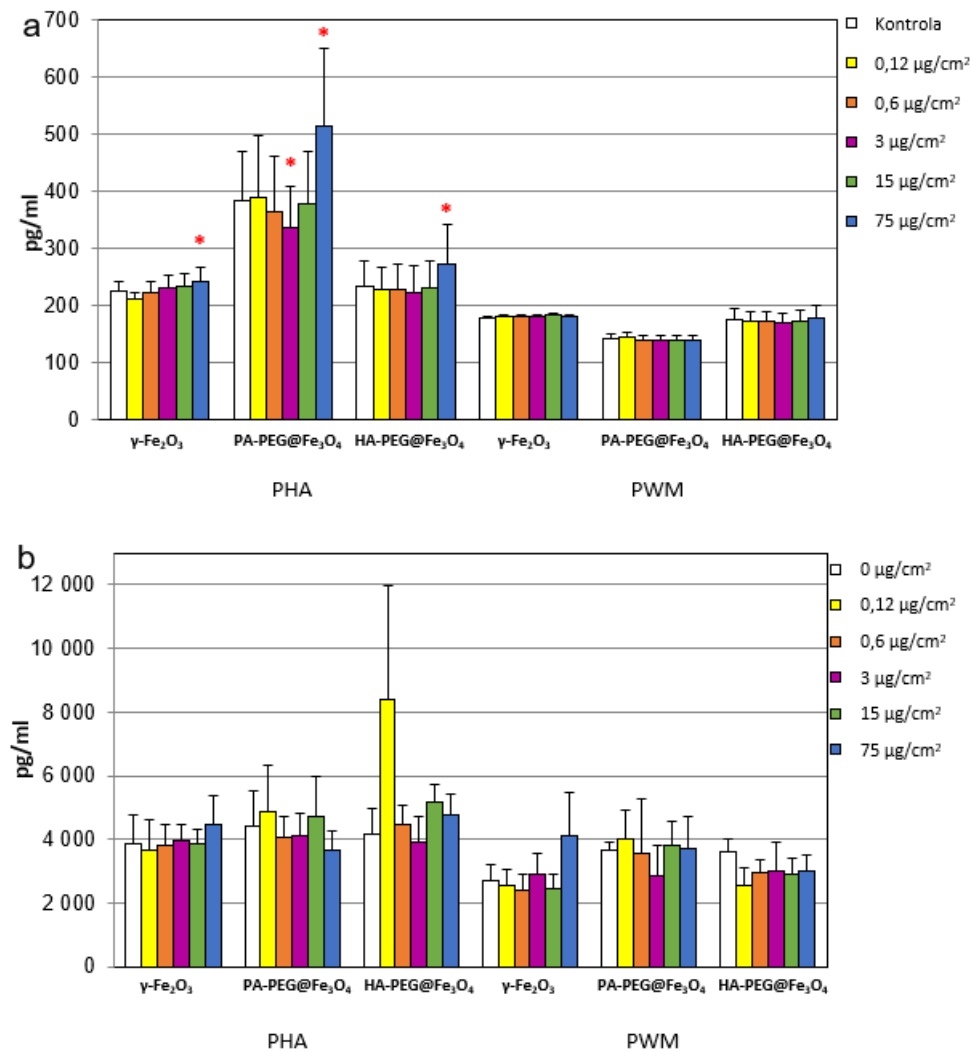
Proliferačia bola meraná ako inkorporácia ^3H -tymidínu (^3Tdr) do replikujúcich sa buniek. Bunkové kultúry boli *in vitro* stimulované pomocou (a) fytohemaglutinínu (PHA), (b) konkanavalínu A (Con A) a (c) pokeweed mitogénu (PWM), CYF-cyklofosfamid. Výsledky boli vyjadrené ako priemerný počet zábleskov za minútu (cpm) na kultúru meraných scintilačným spektrofotometrom. Stĺpce zobrazujú priemerný počet cpm za skupinu + stredná chyba priemeru (SEM). Štatistická významnosť: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, and *** $p < 0,001$.

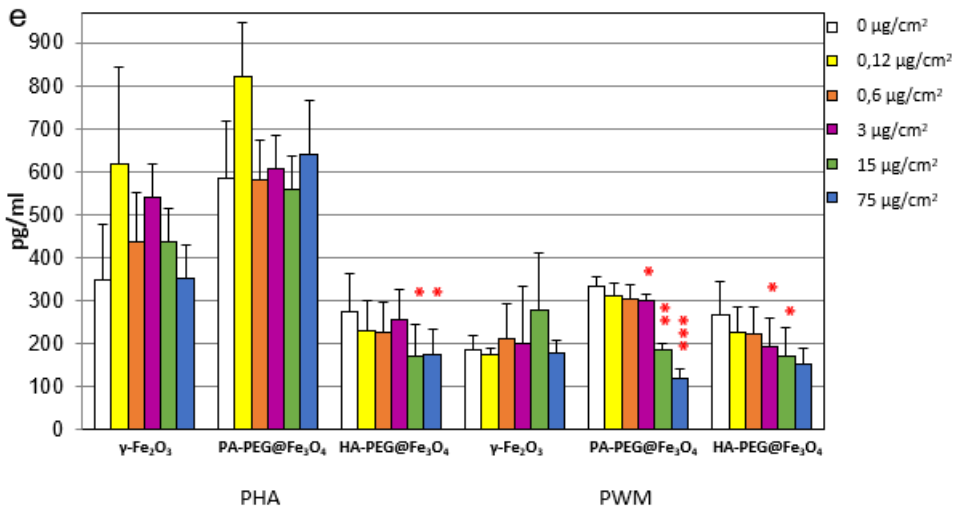
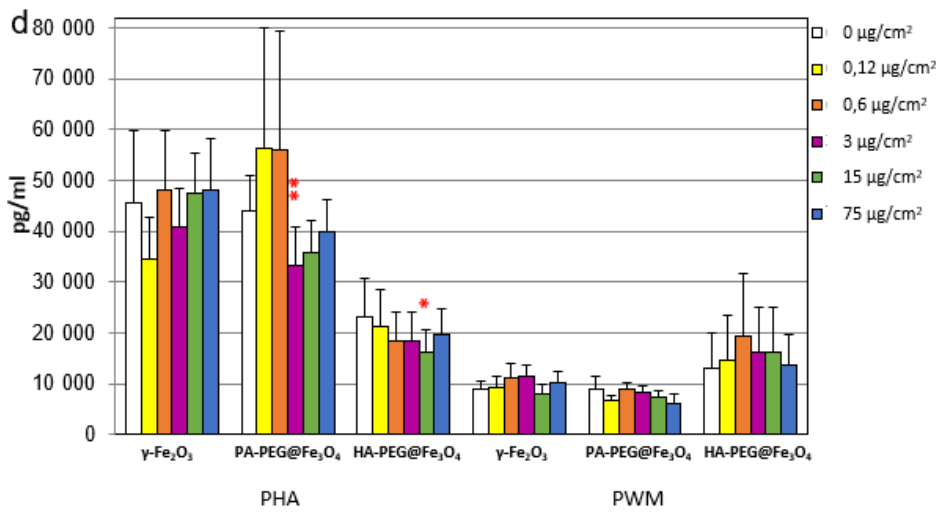
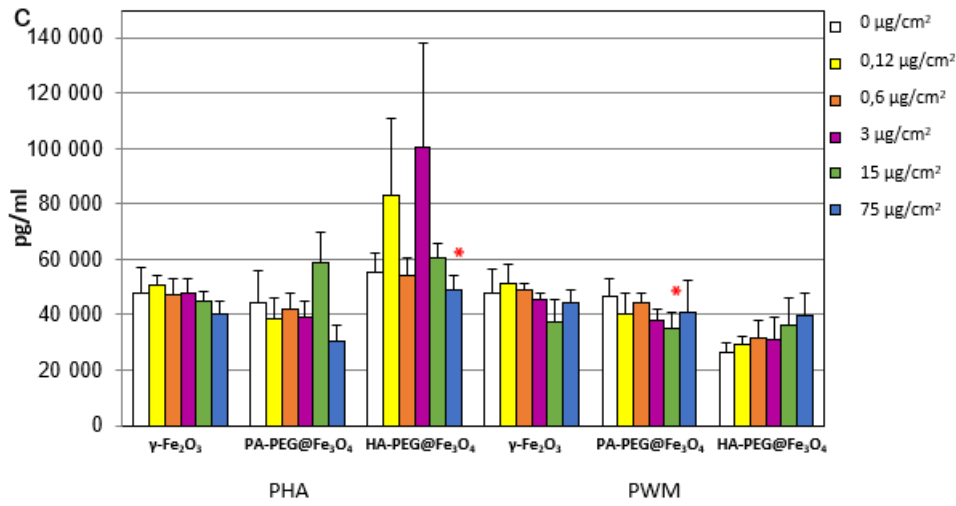


Graf č.3a-e *In vitro* produkcia cytokínov

Figure 3a-e *In vitro* production of cytokines

Cytokíny boli merané pomocou ELISA: (a) faktor stimulujúci kolónie granulocytov a makrofágov (GM-CSF), (b) interleukín-6 (IL-6), (c) interleukín-8 (IL-8), (d) interferón- γ (IFN- γ) a (e) faktor nekrotizujúci nádory- α (TNF- α) v supernatantoch bunkových kultúr periférnej ľudskej krvi po stimulácii fytohemaglutinínom (PHA) a pokeweed mitogénom (PWM). Stĺpce označujú priemerné hodnoty skupín + stredná chyba priemeru. Štatistická významnosť: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, and *** $p < 0,001$.





Graf č. 4a-c Fagocytová aktivita a respiračné vzplanutie leukocytov

Figure 4a-c Phagocytic activity and respiratory burst of leukocytes

Percento (a) fagocytujúcich monocytov, (b) granulocytov a (c) respiračného vzplanutia fagocytov v periférnej ľudskej krvi boli merané pomocou prietokovej cytometrie. CYF-cyklofosamid. Stĺpce označujú priemerné hodnoty skupín + stredná chyba priemeru (SEM). Štatistická významnosť: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, and *** $p < 0,001$.

